



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS

**CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA DE UN COMPARTIMENTO
SUBCELULAR PUTATIVO EN LA RAÍZ DE LA HALOFITA**
Mesembryanthemum crystallinum.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
Maestro en Ciencias
PRESENTA:

Biol. María Fernanda Gómez Méndez

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Rosario Vera Estrella
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL
Dra. Marina Gavilanes Ruíz, Facultad de Química
Dr. Gustavo Pedraza Alva, Instituto de Biotecnología

CUERNAVACA, MORELOS, JULIO 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La realización de este trabajo fue posible por el apoyo a los proyectos de investigación números IN202514 (DGAPA) y 178232 (CONACyT) y por la beca número 512986, a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

<i>CONTENIDO</i>	<i>Página</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>iii</i>
ÍNDICE DE TABLAS	<i>v</i>
ABREVIATURAS	<i>vi</i>
RESUMEN	<i>ix</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La salinización de los suelos	1
1.2 El efecto de la salinidad en las plantas	1
1.3 Diferencias entre las glicófitas y las halófitas	4
1.4 Mecanismos moleculares que enmarcan la tolerancia a la salinidad	5
1.5 La raíz y su importancia en la absorción de agua durante el estrés salino	7
1.6 Las acuaporinas y su importancia fisiológica en la tolerancia a la salinidad	10
1.7 Las acuaporinas como modelo de estudio para la investigación de la dinámica sub-celular de las proteínas de membrana	13
1.8 La proteómica como herramienta para el estudio de la localización de proteínas de membrana	14
2. ANTECEDENTES	17
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1 Material Biológico	21
6.2 Aislamiento de microsomas de raíz de <i>M. crystallinum</i>	21
6.3 Electroforesis zonal de flujo libre	22
6.4 Cuantificación de proteína	22
6.5 Precipitación de proteínas por medio ácido tricloroacético y acetona	22
6.6 Cromatografía líquida acoplada a MS/MS	22
6.7 Análisis bioinformático	23
6.8 Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes	24
6.9 Inmunolocalización tipo “Western blot”	24
7. RESULTADOS	25
7.1 Separación de fracciones de membrana por EZFL de los microsomas aislados de raíz de <i>M. crystallinum</i>	25
7.2 Fracciones de membrana analizadas por LC-MS/MS	26
7.3 Proteínas identificadas por LC-MS/MS	29
7.4 Determinación de las proteínas presentes en cada una de las fracciones mediante un análisis <i>in silico</i>	50
7.5 Clasificación funcional de las proteínas identificadas	52
7.6 Análisis de enriquecimiento de GO, para la evaluar las propiedades funcionales de las proteínas identificadas	56

7.7 Corroboración experimental del enriquecimiento de GO de componente celular, sobre cada una de las fracciones de vesícula de membrana aisladas por EZFL	59
7.8 Identificación de las proteínas que cambian de abundancia en fracciones aisladas por EZFL	64
7.9 Validación <i>in vitro</i> de las proteínas que cambian de abundancia en las fracciones 83 y 84 aisladas por EZFL	73
7.10 Análisis de enriquecimiento de GOs en las proteínas que cambian de abundancia	75
8. DISCUSIÓN	76
8.1 Las fracciones de vesícula de membrana contiene componentes que participan en el tránsito intracelular de proteínas	77
8.2 El tránsito vesicular entre el sistema endomembranal y los diferentes compartimentos subcelulares, permite el intercambio de macromoléculas	80
8.3 Las fracciones de vesículas de membrana analizadas por LC-MS/MS, contienen proteínas implicadas en la formación de vesículas tipo CCV, COPI y COPII	82
8.4 El tráfico de proteínas por medio de vesículas CCV está regulado positivamente por el tratamiento con NaCl y permite la transducción de señales	84
8.5 La salinidad provoca una dinámica de acuaporinas <i>McPIP1</i> y <i>McPIP2</i> en la raíz de <i>M. crystallinum</i>	88
8.6 Modelo de la regulación de acuaporinas por medio de la endocitosis dependiente de clatrina.	91
8.7 Las fracciones de vesículas de membrana 80 a 85, tienen vesículas que pueden estar en diferentes estados de maduración o en etapas de tránsito intracelular	92
8.8 Proteínas identificadas en las fracciones 80 a 85 que cambian su abundancia; y reportadas como proteínas importantes para la tolerancia a la salinidad.	97
9. CONCLUSIONES	102
10. PERSPECTIVAS	103
11. LITERATURA CITADA	104
12. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA	114
13. ANEXO	120

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
Figura 1. Resumen esquemático sobre el estrés salino	3
Figura 2. Modelo del crecimiento en dos fases en la respuesta a salinidad en las halófitas y las glicófitas	5
Figura 3. Esquematización del mecanismo de inclusión-exclusión de Na ⁺ y reajuste osmótico	7
Figura 4. Rutas de transporte radial del agua en las células vegetales	9
Figura 5. Modelo del movimiento de agua en el sistema suelo-raíz-hoja-atmósfera	10
Figura 6. Estructura y función de las acuaporinas	12
Figura 7. Identificación por EZFL de fracciones únicas provenientes de microsomas de la raíz de <i>M. crystallinum</i>	19
Figura 8. Perfil de distribución de las proteínas de las fracciones separadas por EZFL de los microsomas de la raíz de <i>M. crystallinum</i>	26
Figura 9. Evaluación de la cantidad y calidad de las fracciones diferenciadas por EZFL, para seleccionar aquellas útiles para la identificación de las proteínas contenidas en las fracciones características de la raíz de <i>M. crystallinum</i>	28
Figura 10. Diagrama de Euler, que muestra el número y el porcentaje de proteínas compartidas en las fracciones 80 a 85	51
Figura 11. Clasificación de las anotaciones GO identificadas en las 403 secuencias de las proteínas identificadas por LC-MS/MS	54
Figura 12. Anotación funcional de las proteínas identificadas por LC-MS/MS	55
Figura 13. Análisis de enriquecimiento de GO en las fracciones aisladas por EZFL de microsomas provenientes de plantas de <i>M. crystallinum</i> crecidas en ausencia de NaCl	58
Figura 14. Análisis de enriquecimiento de GO en las fracciones aisladas por EZFL de microsomas provenientes de plantas de <i>M. crystallinum</i> crecidas en presencia de 200 mM de NaCl	60
Figura 15. Inmunodetección para corroborar experimentalmente del enriquecimiento de GO de componente celular, sobre cada una de las fracciones de vesícula de membrana aisladas por EZFL	63

Figura 16. Validación in vitro de algunas proteínas que incrementan de abundancia por inmunodetecciones tipo Western Blot.	74
Figura 17. Rutas de transporte vesicular en plantas.	82
Figura 18. Modelo del reciclaje activo entre la membrana plasmática y el TGN de AQPs	92
Figura S1. Proteínas que cambian de abundancia en la fracción 80 aisladas por EZFL	114
Figura S2. Proteínas que cambian de abundancia en la fracción 81 aisladas por EZFL	115
Figura S3. Proteínas que cambian de abundancia en la fracción 82 aisladas por EZFL	116
Figura S4. Proteínas que cambian de abundancia en la fracción 83 aisladas por EZFL	117
Figura S5. Proteínas que cambian de abundancia en la fracción 84 aisladas por EZFL	118
Figura S6. Proteínas que cambian de abundancia en la fracción 85 aisladas por EZFL	119

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Proteínas identificadas como únicas en cada una de las fracciones analizadas por LC-MS/MS	30
Tabla 2. Número de proteínas identificadas en cada una fracción analizadas por LC-MS/MS.	50
Tabla 3. Proteínas identificadas como únicas en cada una de las fracciones analizadas por LC-MS/MS.	52
Tabla 4. Proteínas que cambian de abundancia en la fracción S80.	67
Tabla 5. Proteínas que cambian de abundancia en la fracción S81	68
Tabla 6. Proteínas que cambian de abundancia en la fracción 82 por salinidad	69
Tabla 7. Proteínas que cambian de abundancia en la fracción 83 por salinidad	70
Tabla 8. Proteínas que cambian de abundancia en la fracción 84 por salinidad	71
Tabla 9. Proteínas que cambian de abundancia en la fracción 85 por salinidad	72
Tabla 10. GO enriquecidos en las proteínas que cambian de abundancia como consecuencia del tratamiento con NaCl en las fracciones analizadas	76
Tabla 11. La acuaporina <i>McPIP2;5</i> incrementa su abundancia conforme se avanza de la fracción S80 a la S83	88
Tabla 12. La fracción S83 es la fracción que contiene el mayor número de acuaporinas que incrementa de abundancia por el tratamiento con NaCl	89
Tabla 13. Las fracciones 80 a 85 poseen vesículas de membrana con componentes implicados en tráfico vesicular y en diferente estado de maduración o de tránsito intracelular	96
Tabla A1. Anticuerpos primarios utilizados	120

ABREVIATURAS

µg	Microgramos
µl	Microlitros
2DE	Electroforesis en dos dimensiones
2-PG	Enolasa
ABC	Proteína ABC (ATP-Binding Cassette)
ABP	Proteínas de unión a actina
ADP	Difosfato de Adenosina
AFR	Monodehidroascorbato reductasa
ALDO	Fructosa bifosfatasa-aldolasa
AP	Complejo Adaptador de Clatrina
AQP	Acuaporina
ARF	Factor de Ribosilación de ADP
ASC1	Proteína de unión a nucleótidos de Guanina
ATP	Trifosfato de Adenosina
ATPase 2C2	Transportador de Calcio
BPG	2,3 bisfosfoglicerato mutasa
BSA	Albumina de suero bovino
C	Condición de crecimiento en ausencia de NaCl
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas
CCV	Vesículas recubiertas de clatrina
CDC48	ATPasa AAA
CHC	Cadena pesada de Clatrina
CHX	Antiportador de cationes
Cix	Calnexina
COP	Proteína de cubierta vesicular
D24SR	Delta 24 esteroil reductasa
D2B	Dinamina 2B
DAG	Diacilglicerol cinasa
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
dS/m	deciSiemens por metro
EC _e	Conductividad eléctrica del suelo en su extracto de saturación
EE	Endosoma temprano
EEF1D	Factor de elongación 1 delta
EGTA	Ácido tetra-acético-etileno-glicol
ESCRT	Señal requerida para el transporte endosomal
EZFL	Electroforesis Zonal de Flujo Libre
F1F0 _α	ATP sintasa subunidad α
FAS	Acil-CoA sintetasa
FTSH10	Metalopeptidasa de Zinc dependiente de ATP
G3PDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GAD	Glutamato decarboxilasa
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GO	Ontologías
GTPasas	Trifosfatasa de guanosina
H ⁺	Protón
H2A.6	Histona H2A.6
HIP	Proteínas Híbridas Intrínsecas

HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Hsp	Proteína de choque térmico
IP3	Inositol 1,4,5 trifosfato
kDa	Kilodaltons
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LE	Endosoma tardío
Log ₁₀	Logaritmo base 10
Log ₂	Logaritmo base 2
L _p	Conductividad hidráulica de la raíz
MALDI-TOF	Técnica cuyo nombre es un acrónimo del inglés Matriz- Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight
MDH	Malato deshidrogenasa mitocondrial
MetE	5-metil-tetrahidroteroil-triglutamato
MIP	Proteína Intrínseca de Membrana
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MVB	Cuerpo multivesicular
<i>n</i>	Número de experimentos independientes
NA	No aplica
NC	No cambia
NIP	Proteína parecidas a la Nodulina-26
PA	Ácido fosfatídico
P-ATPasa	ATPasa translocadora de protones de la membrana plasmática
PEP	Fosfoenol-piruvatocarboxilasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
pH	Potencial de hidrógeno
PH	Homólogo a plestrina
PI(4,5)P2	Fosfatidil-inosilto-4,5 bifosfato
PI4P	Fosfatidil-inositol-4 fosfato
PIP 2;5	Acuaporina PIP;5
PIP	Proteína Intrínseca de Membrana Plasmática
PIP1;1	Acuaporina PIP1;1
PK	Piruvato cinasa
PMSF	Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo
PSV	Compartimentos de almacenamiento proteico
PVP	Polivinilpirridona
RABA1f	Proteína relacionada a Ras
RE	Retículo endoplasmático
RHD3	Proteína defectiva de la raíz 3
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPL8	Proteína de ribosoma 60S subunidad L8
RPS14	40 S Proteína ribosomal 14-3
S	Condición de Tratamiento con NaCl
SDS-PAGE	Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes
SERK3	Receptor implicado en la formación de CCVs cuyo nombre es un acrónimo del inglés, Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 3
SH3	Dominio SH3
SH3Ps	Proteínas con dominio SH3
SHMT	Serina hidroximetiltransferasa
SIP	Proteína Intrínsecas Básicas Pequeñas

SNARE	Proteínas de membrana cuyo nombre es un acrónimo del inglés Soluble N-ethylmaleimide Attachment Protein Receptor
TALDO	Transaldolasa
TBS	Buffer Salino de Tris
TCA	2,4,6- ácido tri-cloro acético
TEA	Trietanolamina
THF	Tetrahidrofolato
TIP	Proteína Intrínseca del Tonoplasto
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UBP	Proteasa específica de ubiquitina
Valor- <i>P</i>	Valor estadísticamente significativo
V-ATPasa	ATPasa translocadora de protones del tonoplasto
VIAFM	Microscopía de fluorescencia de ángulo variable
V-PPasa	Pirofosfatasa
VSR	Receptor vacuolar de clasificación
XIP	Proteína Intrínsecas X
Ψ_w	Potencial hídrico

RESUMEN

Debido a que las raíces son el primer órgano de las plantas en lidiar con los cambios ambientales, tales como la limitación de agua y la salinidad, entender cómo responde la raíz a estos cambios, constituye un aspecto relevante dentro del estudio de la fisiología vegetal.

El presente estudio se enfoca en el estudio del sistema radical de *Mesembryanthemum crystallinum*, una halófito, que puede crecer en condiciones de salinidad elevada y particularmente se centra en la caracterización proteica de fracciones subcelulares que se purificaron por medio de la técnica **E**lectroforesis **Z**onal de **F**lujo **L**ibre (EZFL), la cual separa una mezcla compleja de microsomas en fracciones discretas de membranas subcelulares con diferentes características. Por medio de esta técnica se aislaron e identificaron a partir de los microsomas de raíz, fracciones subcelulares de membranas con características particulares, las cuales no se identifican al fraccionar microsomas de las hojas de *M. crystallinum*.

En base a esta observación, el presente trabajo tuvo como finalidad identificar la participación de dichas fracciones de membrana en la raíz de *M. crystallinum*, así como entender su cambio de abundancia en respuesta a la salinidad. Para llevar a cabo la identificación de los componentes membranales contenidos en estas fracciones, se utilizó una estrategia proteómica libre de marca, la cual nos permitió no sólo identificar las proteínas contenidas en estas fracciones, sino también, nos sugirió qué tipos de membranas subcelulares están enriquecidas en estas fracciones aisladas por EZFL. También se investigó por medio de análisis estadísticos, que proteínas contenidas en estas fracciones responden diferencialmente a la salinidad y por ensayos de inmunolocalización se validó la presencia y el cambio de abundancia de algunas de las proteínas identificadas. El conocimiento de las proteínas responsivas al tratamiento con sal en estas fracciones de vesícula, permitió proponer el papel fisiológico que llevan a cabo éstas proteínas en respuesta a la condición de salinidad y permitió sugerir si participan en la tolerancia a la salinidad en la raíz de *M. crystallinum*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *La salinización de los suelos*

La salinización de suelos se define como la acumulación de sales solubles en agua, las cuales se depositan en el *solum* y *regolith*, que corresponden respectivamente a la parte superior del perfil del suelo incluyendo los horizontes A y B, y al área compuesta por manto de roca fragmentada y consolidada (Rengasamy, 2006). De acuerdo al laboratorio de salinidad USDA, un suelo para considerarse como salino debe de tener una conductividad eléctrica en su extracto de saturación (EC_e) por arriba de $4dS\ m^{-1}$, lo que equivale a una concentración de 40 mM de NaCl (Rengasamy, 2006). La generación de los suelos salinizados se debe principalmente al uso de fertilizantes y la exacerbada y acelerada irrigación de cultivos agrícolas, debido a que se aportan grandes cantidades de sales que no se encuentran de manera natural en los suelos (Carrillo *et al.*, 2011). El agua de irrigación de cultivos contiene Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+ , cuando esta agua se evapora, el Ca^{2+} y el Mg^{2+} normalmente se precipitan en forma de carbonatos (Serrano *et al.*, 1999), dejando así al Na^+ de manera libre en el suelo, provocando que la concentración de este aumente hasta dos órdenes de magnitud en comparación con la concentración de un macronutriente (Grattana & Grieveb, 1999).

La salinización de suelos está considerada como uno de los problemas ambientales más severos, ya que afecta cerca de 830 millones de hectáreas a nivel mundial (Läuchli & Grattan, 2007) y cerca de 2 millones de hectáreas cultivables a nivel global se pierden cada año como consecuencia de la salinización del suelo, con lo cual se estima que para mediados del siglo XXI más del 50% de la tierra cultivable se perderá por esta causa (Mahajan & Tuteja, 2005). En México se ha reportado estimaba que el 15% de las 300,000 hectáreas irrigables se encontraban afectadas por problemas de salinización (Osterbaan, 1995). A partir de estas cifras podemos concluir que, la salinización de suelos se ha convertido en uno de los problemas ambientales más graves, que limitan la producción agrícola y afectan la economía y la salud ambiental, impactando de manera directa a la población humana en constante crecimiento.

1.2 *El efecto de la salinidad en las plantas*

La salinización de suelos conlleva tanto a la generación de estrés osmótico, como de estrés iónico en las plantas (Munns, 2002), en donde la acción de ambos estreses, provoca la deficiencia en el metabolismo celular.

Efecto osmótico: Se refiere a situaciones fisiológicas donde las plantas se encuentran limitadas en la disponibilidad del agua, tales como la sequía y la salinidad (Zhu *et al.*, 1997). Los principales efectos osmóticos a los que se enfrentan las plantas al exponerse a suelos con altas concentraciones de Na^+ (>100 mM) se deben a que la alta concentración de iones Na^+ en el medio conduce a la deshidratación de las células, debido al cambio en el balance hídrico entre la planta y su medio (Munns, 2002). Este balance hídrico está dado por el potencial hídrico (ψ_w) que hace referencia a la energía potencial y libre dentro de las moléculas de agua para poder realizar trabajo. El potencial hídrico cuantifica además la tendencia del agua a fluir de un área a otra, en donde el agua se mueve de un sitio de mayor hacia uno de menor potencial hídrico (Salisbury & Ross, 1992). Por lo tanto, la diferencia entre los valores del potencial hídrico entre una planta y su medio, determinara la dirección a la cual el agua se moverá entre estos dos sistemas.

El aumento de Na^+ en los suelos provoca una disminución en el potencial hídrico; como consecuencia, las plantas sujetas a esta condición ambiental reducen su capacidad de absorber agua, lo que lleva a la deshidratación y a la pérdida de volumen celular (Koyro, 2006; Läuchli & Grattan, 2007). Otra consecuencia que experimenta una planta al estar en un suelo salinizado, es que al no poder absorber agua eficientemente las concentraciones de los solutos intracelulares aumenta en relación a la pérdida de agua. Aunado a esto, se induce el cierre de estomas lo que limita el intercambio de gases con la atmósfera (de Oliveira *et al.*, 2013).

Efecto iónico: La presencia excesiva de sal a la cual se enfrenta una planta bajo condiciones de salinidad también lleva a un desequilibrio iónico. Esto se debe a que bajo condiciones fisiológicas normales, las plantas mantiene una relación intracelular alta de K^+ (100-200 mM) y baja de Na^+ (1-10 mM); esta relación origina un potencial de membrana negativo de -140 mV (Higinbotham, 1973). Pero bajo estrés salino, la relación entre los cationes K^+/Na^+ se favorece hacia el Na^+ , ya que el aumento significativo en la concentración extracelular de Na^+ , lleva a la producción de un gradiente de potencial a favor del transporte del Na^+ desde el ambiente extracelular, con alta concentración de sodio al ambiente intracelular, con baja concentración de sodio (Blumwald *et al.*, 1999). Provocando que la entrada de K^+ al interior de la célula disminuya, y como consecuencia la disipación del potencial de membrana. (Pantoja *et al.*, 2000; Munns, 2002; Tuteja, 2007). La síntesis proteica también se ve afectada por la disminución en la concentración de K^+ , ya que es un ion necesario para la unión de los tRNA a los ribosomas (Blaha *et al.*, 2000). Además, el exceso de Na^+ intracelular altera el balance osmótico, la función estomática y

facilita la entrada de Cl^- al citosol (Tuteja, 2007). El Na^+ , además produce efectos tóxicos a nivel celular porque inhibe la función enzimática y provoca la clorosis y necrosis del tejido vegetal en donde se acumula Na^+ (Munns, 2002). De hecho, las enzimas, la clorofila y los carotenoides componentes de los fotosistemas se dañan por la acumulación de Na^+ en los tejidos (Devenport *et al.*, 2005). Por otra parte el Na^+ compite con la entrada de nutrientes como Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ y NO_3^- , lo que induce una deficiencia de macro y micronutrientes, indispensables para el desarrollo óptimo de la planta (Jouyban, 2012; Läuchli & Grattan, 2007).

En la Figura 1, se muestran algunos de los efectos negativos que provoca el estrés salino sobre las plantas, lo que está asociado tanto a la inducción de un estrés osmótico, como de un estrés iónico por exceso de Na^+ que en conjunto influyen negativamente en la homeostasis, en el desarrollo y en la supervivencia de las plantas, sujetas a este tipo de estrés abiótico (Munns & Tester, 2008).

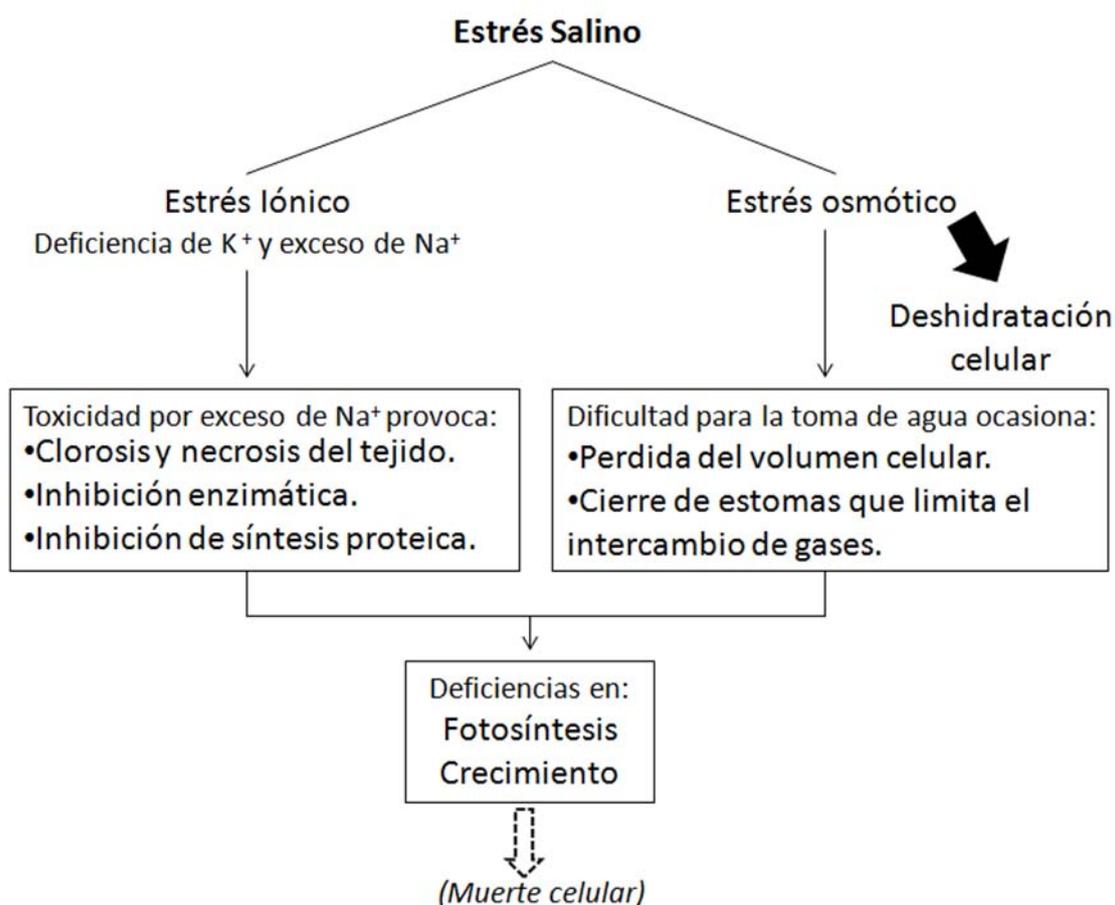


Figura 1. Resumen esquemático sobre el estrés salino. El estrés salino produce estrés iónico, inducido específicamente por el exceso del ion Na^+ y estrés osmótico, referido a la alteración en el consumo de agua por parte de la planta expuesta a salinidad. Modificado de Horie *et al.*, 2012.

1.3 Diferencias entre las glicófitas y las halófitas

Aquellas plantas que no pueden crecer en suelos salinos se denominan GLICÓFITAS, estas plantas se afectan fisiológicamente e incluso ya no son viables, si se encuentran creciendo bajo concentraciones mayores a 50 mM de NaCl en el suelo (Figura 1, Munns & Termaat, 1986). Como representantes de las glicófitas podemos mencionar a la mayoría de los cultivos agrícolas de importancia económica (cerca del 98%) como por ejemplo, el maíz, la soya y el frijol y por lo tanto, la principal causa por la cual se pierde estos cultivos cada año por la salinización de suelos. De forma contraria a las glicófitas, las HALÓFITAS son aquellas plantas que tienen la capacidad de sobrevivir y reproducirse, aun en presencia de concentraciones por arriba de los 200 mM NaCl en el suelo (Shabala, 2013). Las halófitas representan tan sólo el ~1% del total de plantas terrestres. Estas plantas crecen en hábitats con alto contenido de sales, como las regiones costeras, las marismas y los desiertos (Flowers & Colmer, 2008).

Una manera de diferenciar entre una halófitas y una glicófitas, es su capacidad de producir biomasa bajo estrés salino durante un periodo determinado. Este modelo de crecimiento con dos fases bien definidas, fue descrito por Munns (2002) y se caracteriza por las diferencias temporales entre la respuesta de una glicófitas y una halófitas a las condiciones de salinidad (Figura 2). La primera fase se deriva inmediatamente después de entrar en contacto con el exceso de sal en el medio que lleva, primero a la generación de estrés osmótico, por lo cual se le denomina fase osmótica, y tiene como consecuencia la reducción en el crecimiento de ambos tipos de plantas. Durante la segunda fase que corresponde a la fase iónica, la cual se hace evidente días o incluso semanas después de la exposición a la sal, lleva a la producción de estrés iónico debido a la acumulación del Na⁺ en el interior de la planta. Sin embargo, es en este punto en donde se pueden apreciar las principales diferencias entre una glicófitas y una halófitas, ya que en las glicófitas el Na⁺ alcanza niveles tóxicos provocando daños en el metabolismo celular; hecho que no ocurre en las halófitas, que logran contender con el estrés iónico y mantener su crecimiento bajo dichas condiciones (Munns, 2002).

La tolerancia de las halófitas ante el estrés salino, está dado por mecanismos bien definidos y no por rutas metabólicas insensibles al Na⁺. Un ejemplo de esto es que la actividad de la mayoría de las enzimas metabólicas tanto de halófitas como de glicófitas se inhiben en presencia de concentraciones ≥ 100 mM NaCl (Greenway & Osmond, 1972; Munns, 2002). Por lo tanto, la diferencia principal entre una halófitas y una glicófitas, no es que las halófitas puedan continuar con su fisiología de manera normal en presencia de

estrés salino, si no que las halófitas tiene la capacidad de evitar la toxicidad y los efectos negativos que provoca el Na^+ , permitiendo que su metabolismo se mantenga y continúen creciendo en presencia de salinidad elevada.

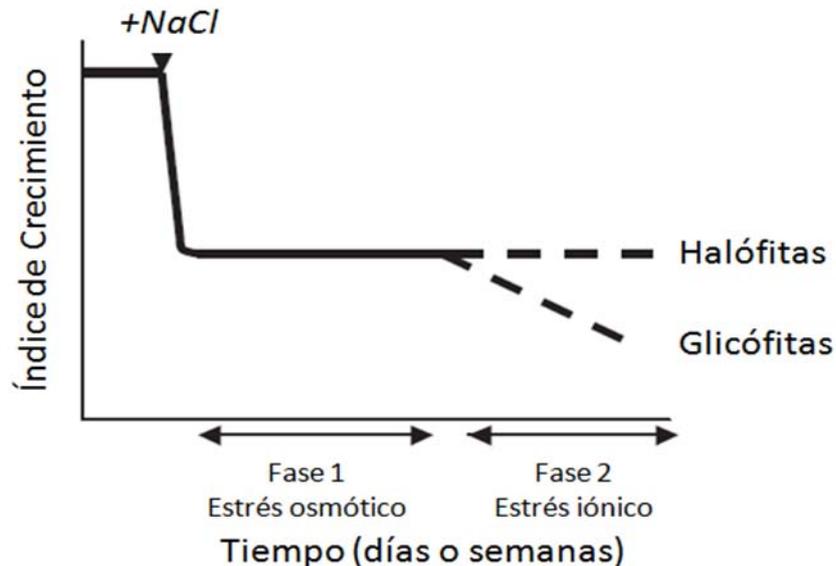


Figura 2. Modelo del crecimiento en dos fases en respuesta a salinidad en halófitas y glicófitas. La variación en el crecimiento entre estos dos tipos de plantas se debe al control de los niveles de Na^+ y por la regulación en la toma de agua, por parte de las halófitas. Modificado de Munns (2002) y Läuchli & Grattan (2007).

1.4 Mecanismos moleculares que enmarcan la tolerancia a la salinidad

Mientras que algunas glicófitas, a través de la inhibición de transporte iónico de la raíz hacia la parte aérea de la planta, evitan la acumulación tóxica del NaCl ; las halófitas tienden a hacer lo contrario, es decir, toman el NaCl del medio y lo transportan hacia la parte aérea de la planta, en donde lo acumulan y lo utilizan para llevar a cabo el ajuste osmótico. Como consecuencia, en las raíces de las halófitas existe una concentración menor de NaCl , lo que favorece el consumo y el transporte del agua al interior de la planta (Adams *et al.*, 1992).

Las halófitas exhiben dos mecanismos globales que les permite tolerar la salinidad, el primero es la capacidad de regular la entrada de NaCl al citoplasma y mantener al mínimo la concentración intracelular de este; el segundo es poder llevar a cabo la regulación osmótica bajo el estrés salino, es decir evitar el estrés osmótico causado por el cambio exceso de sal en el suelo.

1.4.1 La entrada y salida de Na^+ en las halófitas está regulada por transportadores implicados en la inclusión, exclusión y almacenamiento de Na^+ :

La entrada de Na^+ del medio hacia el interior de la planta ocurre principalmente a través de transportadores de K^+ , debido a la similitud en la identidad química entre el Na^+ y el K^+ (Flowers & Colmer, 2008). Los transportadores para K^+ , como AKT1, HKT, NORC y VIC se encuentran implicados en la toma (“influx”) de Na^+ del medio; de manera contraria, los intercambiadores Na^+/H^+ funcionan para la exclusión (“efflux”) del Na^+ del citoplasma de las células hacia el ambiente extracelular (Figura 3). Esto es posible debido a que la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática transporta protones del medio intracelular al medio extracelular generando un gradiente de pH, que permite el intercambio de un ion Na^+ por cada H^+ (Blumwald *et al.*, 1999). La función de estos intercambiadores de Na^+/H^+ , permiten la exclusión del Na^+ del citoplasma de células por ejemplo de la raíz, con el fin de evitar la acumulación y la toxicidad de este ion (Figura 3). El secuestro y/o compartimentalización del ion Na^+ en la vacuola central de la célula, es uno de los principales mecanismos de tolerancia a la salinidad en halófitas suculentas, las cuales poseen vacuolas muy grandes (90-95% del volumen celular) en donde se puede almacenar de forma más eficiente el Na^+ y el H_2O (Flowers & Colmer, 2008). Por lo tanto, la acumulación de Na^+ en la vacuola representa una manera de reducir su concentración en el citosol y la toxicidad que puede causar en los procesos celulares. Los transportadores implicados en el proceso de secuestro intracelular del Na^+ son de tipo NHX, que son intercambiadores de Na^+/H^+ , que utilizan la fuerza protón motriz para poder translocar los iones Na^+ al interior vacuolar. El gradiente de pH utilizado por estos transportadores se genera por las proteínas V-PPasa y la V-ATPasa de la membrana vacuolar (tonoplasto, TP) (Blumwald *et al.*, 1999) (Figura 3). Además de la acumulación vacuolar de Na^+ en las células del mesófilo en el 50% de las halófitas se ha desarrollado un tipo celular especializado en el almacenamiento del Na^+ en sus vacuolas; a estas células epidérmicas modificadas se les denomina células tipo vejiga (“salt bladder cells”) y representan una forma de aislar al Na^+ en la vacuola de forma más eficiente y poder mantenerlo lejos de los sitios metabólicamente activos (Flowers & Colmer, 2008; Barkla *et al.*, 1999b).

1.4.2 Reajuste osmótico.

A medida que se secuestra el Na^+ en las vacuolas celulares, el potencial osmótico del citoplasma debe de ser balanceado con el de las vacuolas; en las halófitas esto es posible debido a la síntesis y acumulación en el citoplasma celular de solutos compatibles (Figura 3). Los solutos compatibles, también conocidos como “osmolitos” e caracterizan por ser moléculas orgánicas neutras altamente solubles en agua y, lo más importante que su

presencia no interfiere con las reacciones del metabolismo celular (Shomer *et al.*, 1991). Las principales moléculas que funcionan como solutos compatibles son los metabolitos secundarios provenientes de compuestos cuaternarios de amonio (betainas) y polioles (pinitol y manitol), además metabolitos centrales como los azúcares (sacarosa) y los aminoácidos (prolina) (Flowers & Colmer, 2008). La principal función de estos compuestos es el balance osmótico a nivel intracelular y la protección de las estructuras celulares ya que al ser moléculas típicamente hidrofílicas reemplazan al agua de la superficie molecular. Por ejemplo, en las proteínas estos osmolitos actúan como osmoprotectores y como chaperonas de bajo peso molecular (Hasegawa *et al.*, 2000).

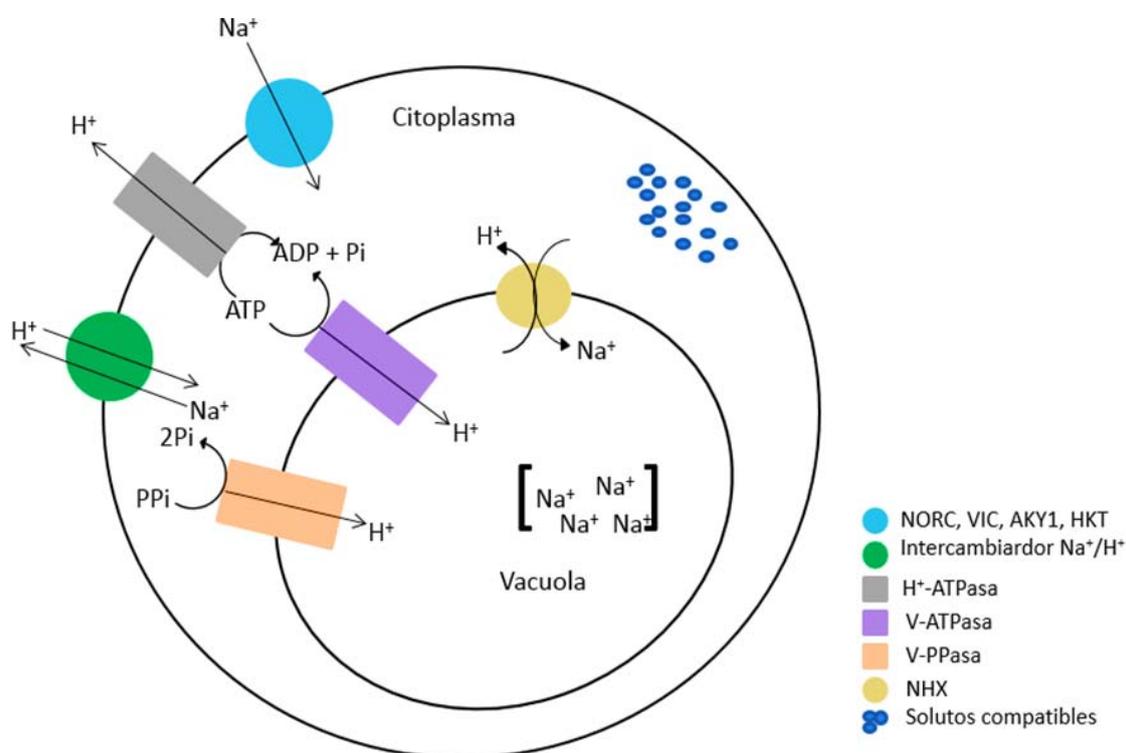


Figura 3. Esquemización del mecanismo de inclusión-exclusión de Na^+ y reajuste osmótico. Los transportadores NORC, VIC, AKY1 y HKT participan en la inclusión de Na^+ hacia el citoplasma de las células. La exclusión del Na^+ del citoplasma es mediado por los intercambiadores Na^+/H^+ y NHX, que son impulsados por el bombeo de protones por la ATPasa de la membrana plasmática (P-ATPasa) y del tonoplasto (V-ATPasa), y la H^+ pirofosfatasa vacuolar (V-PPasa). La síntesis de solutos compatibles en el citoplasma, como prolina, pinitol, manitol y sacarosa son fundamentales para el reajuste del potencial osmótico del citoplasma respecto al de la vacuola. El secuestro de Na^+ en la vacuola está representado con corchetes (Hasegawa *et al.*, 2000; Blumwald *et al.*, 1999; Flowers & Colmer, 2008).

1.5 La raíz y su importancia en la absorción de agua durante el estrés salino.

La raíz de las plantas es el primer órgano en enfrentarse de manera directa a la salinidad. Por ello, la habilidad de la raíz de responder de manera eficiente a este tipo de

estímulo externo, es primordial para mantener las funciones vitales de absorción de agua y nutrientes durante las condiciones de salinidad y así, poder cumplir con las necesidades fisiológicas de la planta (Chen *et al.*, 2011). Como se describió anteriormente (Figura 2), el estrés salino induce directa o indirectamente la deficiencia de agua, provocando deshidratación celular (Rajendran *et al.*, 2009). Esta deshidratación está relacionada al desequilibrio entre la absorción de agua y la pérdida de agua, es decir, la pérdida de agua por transpiración es mucho más elevada que la cantidad de agua absorbida por las raíces, ya que estas raíces al estar en suelos salinos, se encuentran en condiciones de osmolaridad elevada (Aroca, 2001).

Las diferentes rutas del transporte radial de agua en el interior de las plantas están divididas en *i*) apoplástica, *ii*) simplástica y *iii*) transcelular (Steudle & Peterson, 1998; Figura 4). Bajo este panorama, una planta que sufre de estrés salino tiende a evitar la pérdida de agua por transpiración, por medio del cierre de los estomas. Consecuentemente se induce que la entrada del agua por medio de la vía del apoplasto disminuya, el potencial hídrico del apoplasto se vuelva más negativo al del simplasto y que el movimiento intracelular e intercelular de agua se reduzca, llevando así a la deshidratación (Aroca, 2012). Por esto, es que en condiciones que originan un gradiente osmótico, como el estrés salino, la vía transmembrana y la vía del simplasto (que conjuntamente forman la vía célula-célula), representan la principal forma del movimiento de agua hacia el interior de las células vegetales (Steudle, 2000).

Otro importante factor en la raíz para el movimiento óptimo del agua hacia el resto de la planta, está dado por la conductividad hidráulica de la raíz (Lp_r), la cual hace referencia a la permeabilidad al agua en las raíces por unidad de área y que resulta de la suma de las fuerzas hidrostática y osmóticas a las que las raíces estén sometidas en cierto tiempo o condición dada (Steudle, 2000). En la Lp_r influye directamente el potencial hídrico (Ψ_w) de las plantas, debido a que al medir el valor de la Lp_r y la capacidad de absorción de agua, se observó que existe una correlación directa entre la capacidad y eficiencia en la toma de agua y los valores de Lp_r en la raíz (Aroca, 2012; Steudle, 2000). Así, el movimiento del agua hacia el interior de una planta es un proceso pasivo, regulado por las diferencias en el potencial hídrico que dan como resultado una conductividad hidráulica diferencial entre los componente del sistema *suelo – raíz – hoja – atmósfera* (Figura 5).

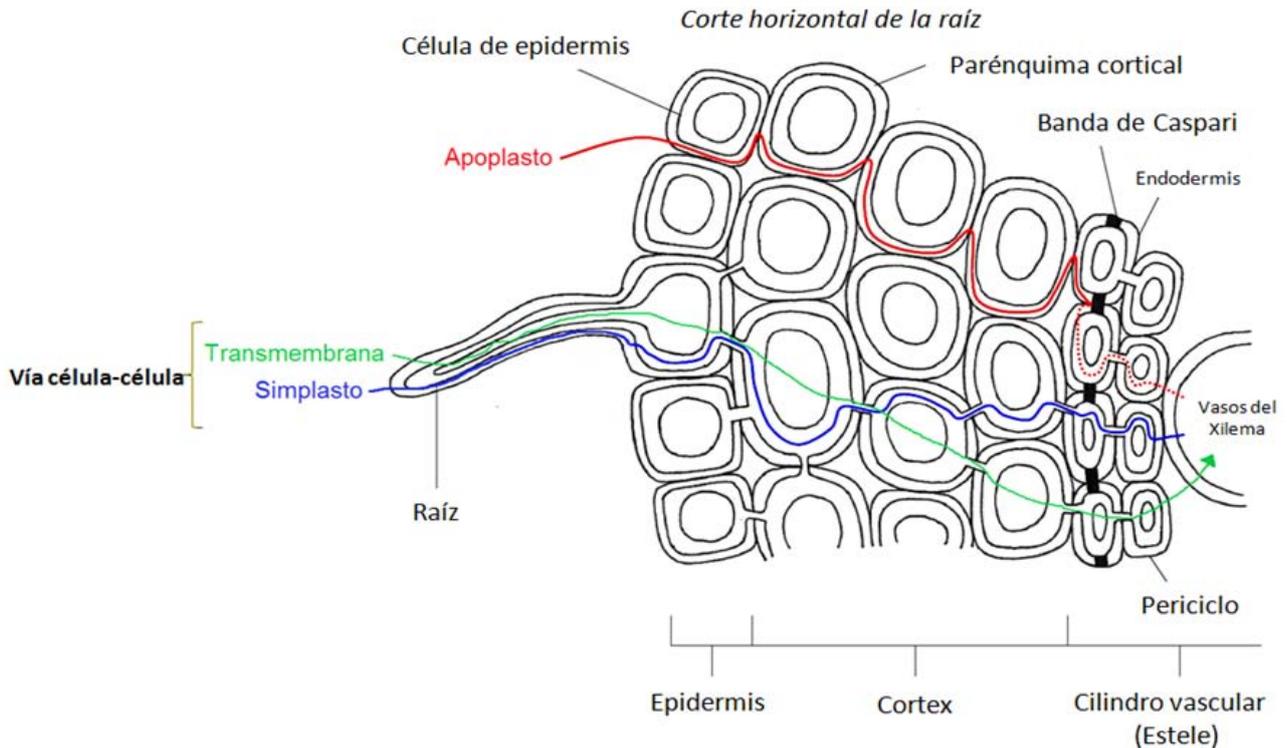


Figura 4. Rutas de transporte radial del agua en las células vegetales. La vía del apoplasto, ocurre a través del espacio extracelular periférico a los protoplastos. La vía simplástica permite el movimiento del agua intracelular a través de los plasmodesmos. La vía transcelular representa el flujo del agua intracelular a través de las membranas celulares. Debido a la dificultad de discernir experimentalmente entre la vía del simplasto y la transmembrana, la suma de ambas representa la vía célula – célula (Steudle & Peterson, 1998).

Cuando las raíces absorben agua y solutos, se crea una Lp_r positiva en las raíces, porque los solutos y el agua recién absorbidos promueven la generación de un ψ_w negativo en el interior de la planta, lo que impulsa una vez más la toma de agua (Lobet *et al.*, 2014). Por lo tanto, la Lp_r de la raíz es una propiedad que depende de factores como el índice de transpiración, la disponibilidad de agua y sales, así como de la Lp_r y el ψ_w propio del suelo. Diversos estudios han demostrado que mantener la Lp_r en las raíces es primordial para permitir la hidratación celular y poder superar condiciones de estrés abiótico (Aroca, 2001; 2012). Es por ello, que al disminuir la Lp_r a consecuencia del estrés salino, se provoca la dificultad de absorción de agua por parte de las raíces, llevando a la deshidratación. Entonces la regulación de la Lp_r durante el tiempo que dure el estrés, es primordial para mantener el balance hídrico en las plantas (Sutka *et al.*, 2011; Muries *et al.*, 2011; Aroca, 2012).

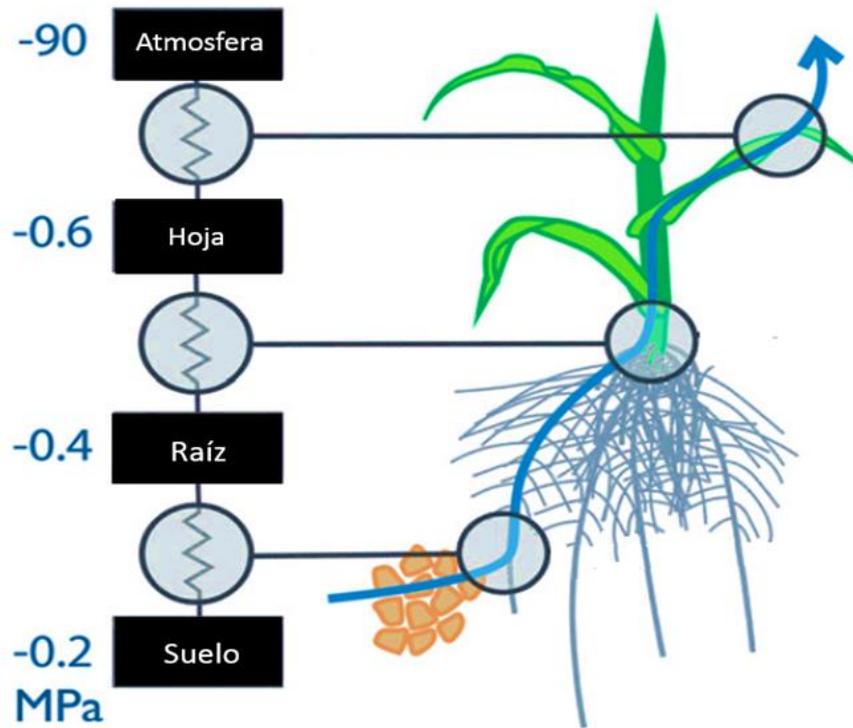


Figura 5. Modelo del movimiento de agua en el sistema suelo-raíz-hoja-atmósfera. La absorción y el movimiento del agua al interior de las plantas dependen de las diferencias en el ψ_w del suelo, la raíz, las hojas y la atmósfera. Mientras se conserve un ψ_w negativo en la planta, la Lp_r se mantiene positiva, con lo cual se mantiene un balance hídrico. La ψ_w se muestra en unidades de presión (MPa) y la Lp_r en el sistema se representa como ω . Modificado de Lobet *et al.*, 2014.

1.6 Las acuaporinas y su importancia fisiológica en la tolerancia a la salinidad.

La capacidad de transportar agua hacia adentro y entre las células de los diferentes tejidos vegetales (Figura 4; vía célula–célula) es fundamental para el desarrollo de plantas, no sólo en condiciones normales de crecimiento, sino también en condiciones de estrés abiótico. Bajo ambas condiciones se ha reportado que las plantas poseen, como los demás organismos, un grupo de proteínas especializadas en el transporte de agua las cuales se han denominado acuaporinas (AQP) (Kaldenhoff *et al.*, 2007). Las AQP pertenecen a una clase de proteínas muy conservada y designada como MIPs (**M**embrane **I**ntrins**e**c **P**rotein). Basándose en su localización subcelular y su secuencia, las AQP se han dividido según su homología en siete subfamilias: proteínas integrales de membrana plasmática (PIPs), proteínas intrínsecas del tonoplasto (TIP), proteínas intrínsecas parecidas a nodulina-26 (NIPs), proteínas intrínsecas básicas pequeñas (SIPs), proteínas intrínsecas parecidas a GlpF (GIPs), proteínas híbridas intrínsecas (HIPs) y proteínas intrínsecas X (XIPs) (Xu *et al.*, 2013; Kaldenhoff *et al.*, 2007). La relación entre la clasificación y la localización

subcelular de las AQP no siempre se cumple, ya que existen reportes *in planta* que muestran que proteínas PIP también pueden ser localizadas en membranas diferentes a la plasmática y las proteínas TIP pueden ser localizadas en membranas diferentes a la del tonoplasto, por ejemplo la membrana plasmática (Barkla *et al.*, 1999a).

En comparación con otros organismos, las plantas poseen un amplio número de genes que codifican para diferentes AQP, por ejemplo, en las angiospermas existen más de 60 genes diferentes para AQPs y cada una de las isoformas exhibe una localización, regulación y particularidad (Danielson & Johanson, 2008). La alta abundancia de AQP en el reino vegetal, indica que, su función fisiológica es indispensable en cada fase del desarrollo y en cualquier tipo de condición ambiental a la que las plantas se encuentren sometidas. Además, la alta necesidad en el control y en el transporte de agua en estos organismos, se observa en la diversidad de AQP presentes en una sola especie vegetal, las cuales además son vitales para el funcionamiento correcto a nivel sistémico (Hachez *et al.*, 2006).

La función fisiológica de las AQP en plantas y animales es para la formación de canales de agua, a través de los cuales el agua puede moverse de forma pasiva y ser transportada entre las diferentes endomembranas celulares (Figura 6A). De hecho, se estima que en las plantas, las AQP contribuyen con el 20 al 80% del flujo radial de agua hacia interior de las raíces (Figura 4; Javot *et al.*, 2003). Sin embargo, algunas AQP son proteínas-canal multifuncionales, ya que pueden transportar solutos neutros, tales como la urea y el glicerol (Schutz & Tyerman, 1997; Hertel & Steudle, 1997; Biela *et al.*, 1999; Dean *et al.*, 1999; Gerbeau *et al.*, 1999; Guenther & Roberts, 2000; Wieg & Jacob, 2000; Ciavatta *et al.*, 2001; Klebl *et al.*, 2003; Fetter *et al.*, 2004; Wallace & Roberts, 2006; Li *et al.*, 2008), Zhao *et al.*, 2008) y otros compuestos tales como la formamida (Jahn *et al.*, 2004; Holm *et al.*, 2005; Wallace & Roberts, 2005), silicón (Ma, 2006; Yamaji *et al.*, 2008), CO₂ (Terashima & Ono, 2002; Uehlein *et al.*, 2003; Hanba *et al.*, 2004; Katsuhara & Hanba, 2008), y arsénito (Ma *et al.*, 2008).

La estructura de las AQP (Figura 6B) está altamente conservada en la escala evolutiva y consta de seis dominios transmembranales con el C-terminal y el N-terminal orientados hacia el citosol (Zhao *et al.*, 2008). Además, cada hélice transmembranal está unida por un lazo (nombrados LA ha LE), en los cuales el LB y LE son hidrofóbicos y contienen la secuencia conservada de Asp-Pro-Ala (NPA), que proveen del poro a través de cual se lleva a cabo el transporte de agua por fuerza electrostática y en relación a su

gradiente de potencial. Además, una AQP generalmente forma homotetrámeros en la membrana, en los cuales cada monómero es funcional (Heymann & Engel, 1999).

Las AQP se han localizado en prácticamente todos los compartimentos subcelulares de las plantas, incluyendo la membrana plasmática, el tonoplasto, el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y el cloroplasto (Li *et al.*, 2013; Amezcua-Romero, 2012). Por ello, la regulación diferencial de la diversidad de AQP existentes, es primordial para contender con los cambios en el uso y disponibilidad de agua.

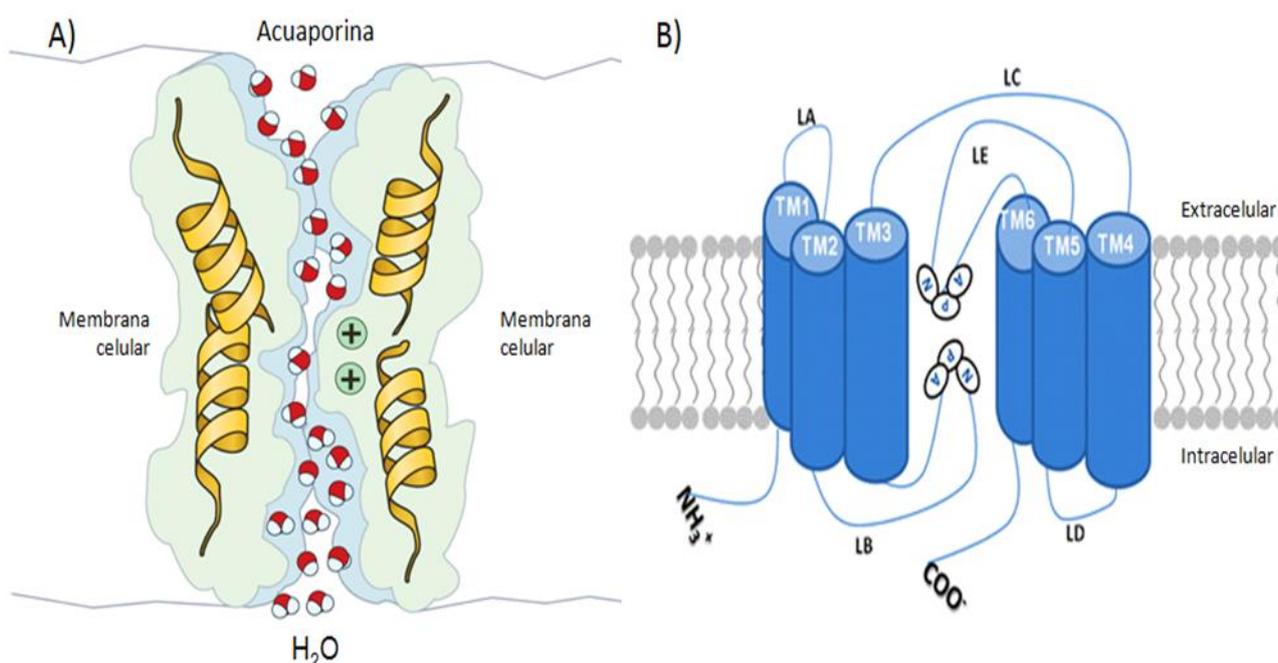


Figura 6. Estructura y función de las acuaporinas. A) Esquema representativo del movimiento del agua a través del canal de una AQP. B) Estructura clásica de un monómero de AQP insertado en una membrana celular. El monómero muestra los seis dominios transmembranales (TM1-TM6) con el C- terminal y el N-terminal orientados hacia el citosol. Los lazos LB y LE contienen la secuencia conservada (NPA), que forman el poro por donde atraviesan las moléculas de agua. Modificado de Zhao *et al.*, (2008) y Hove & Bhawe (2011).

El tráfico vesicular de AQP entre las diferentes endomembranas representa una manera de modular la permeabilidad al agua bajo ciertas condiciones y factores ambientales que afectan la función de las AQPs e involucran procesos de fosforilación, heteroligomerización y gradientes de solutos y/o presión (Vera-Estrella *et al.*, 2004; 2012; Maurel *et al.*, 2008). En este contexto, en condiciones de salinidad se ha observado que existe una relación directa entre la disminución de la Lp_r y la disminución en la expresión de AQP como las PIPs. También se ha observado, que la internalización de algunas PIPs contribuye a la disminución de la Lp_r de la raíz durante la primera fase de estrés salino

(Figura 2), lo cual provoca que el movimiento del agua hacia el apoplasto aumente y como consecuencia, se produzca un choque osmótico (Martínez *et al.*, 2003). En cambio, dentro de la fase iónica del estrés salino (Figura 2), la cual inicia días después de la exposición al estrés, se ha documentado que la L_p de la raíz se recupera, como resultado del aumento de transporte de agua por medio de la vía célula-célula (Figura 4). Lo cual se ha observado principalmente en halófitas y se ha atribuido al aumento en la abundancia de AQP en este tipo de plantas. Lo cual correlaciona directamente con el hecho de que en las raíces existe una mayor expresión de AQP tipo PIPs y TIPs, a diferencia de la abundancia de estas mismas AQP en la parte aérea de la planta (Alexandersson *et al.*, 2005).

1.7 Las acuaporinas como modelo de estudio emergente para la investigación de la dinámica sub-celular de las proteínas de membrana.

Debido a que no todas las AQP funcionan nada más como canales de agua y que no todas se encuentran restringidas a un sólo tipo de membrana celular, se ha postulado que estas proteínas representan un modelo emergente y significativo para el estudio de la dinámica sub-celular de las proteínas de membrana de las células vegetales. Por medio de estudio moleculares y fisiológicos, no sólo se logró esclarecer la funcionalidad de las AQP y su importancia en la respuesta a los cambios ambientales, sino que también se logró identificar su uso potencial como marcadores de compartimentos sub-celulares *in planta* (Luu & Maurel, 2013). Más dado que las AQP, exhiben un alto grado de isoformas, por ejemplo en *Arabidopsis thaliana* y en *Oryza sativa* se reportan 35 y 33 homólogos, respetivamente (Johanson *et al.*, 2001; Sakurai *et al.*, 2005), mientras que en *Populus trichocarpa*, hay alrededor de 60 (Grupta & Sankaramakrishnan, 2009). El patrón de localización sub-celular de todas estas isoformas aún no es completamente claro. Sin embargo, dado que miembros de la familia de AQP como las proteínas tipo TIP presentan una localización multi-membranal en las células vegetal, se identificaron y utilizaron de estas proteínas, como marcadores sub-celulares claves para demostrar la morfología y la funcionalidad de diferentes tipos de vacuolas vegetales (Frigerio *et al.*, 2008).

El primer trabajo en el cual se demostró que el tránsito sub-celular de las diferentes AQPs es un punto clave para regular su localización y su funcionalidad, fue en el cual se observó que además de un aumento en los niveles de abundancia de *McTIP1;2* en el tonoplasto por el estrés osmótico, existe un cambio en la distribución de esta proteína hacia un gran número de cuerpos multivesiculares (MVB, por sus siglas en inglés, **M**ulti **V**esicular **b**ody) que aparecen en el citoplasma de hojas y células en suspensión de *M.*

crystallinum, lo cual se correlaciona con los cambios en el potencial osmótico de las células (Vera-Estrella *et al.*, 2000; 2004). Sin embargo, estos cambios en la distribución de McTIP1; 2 no se presentan en las raíces de la misma planta, donde sólo se observa un incremento en la cantidad de proteína en la fracción correspondiente al tonoplasto (Vera-Estrella *et al.*, 2004). Además, en este trabajo se demostró que el tráfico vesicular está regulado por eventos de fosforilación y glucosilación (Vera-Estrella *et al.*, 2004). Otro claro ejemplo de esto, es que para las vesículas conteniendo *ZmPIP2;5* o *AtPIP2;7* y su correcta localización en la membrana plasmática, es necesario la interacción física de estas AQP con el receptor tipo SNARE (por sus siglas en inglés, **N**-ethylmaleimide-sensitive factor protein **a**ttachment protein **r**eceptor) sintaxina, que media la fusión de la vesícula con la membrana plasmática. Sin embargo, este proceso se inhibió si se expresaba la forma truncada de la sintaxina (SYP121-Sp2), que no sólo afecta la fusión de la vesícula con la membrana, sino también el coeficiente de permeabilidad al agua de los protoplastos que expresaban las AQP *ZmPIP2; 5* o *AtPIP2; 7*, lo cual indicó una relación directa entre la regulación del tráfico de la proteína PIP y su funcionalidad como canal de agua. Así, también se identificó que este receptor no sólo era necesario para el tráfico sub-celular correcto de las AQP *ZmPIP2;5* o *AtPIP2;7*, sino que también funcionaba para la distribución y actividad de canales de K^+ , que a su vez funcionan como reguladores de la homeostasis celular, bajo diferentes condiciones ambientales. Lo cual llevo a postular la hipótesis que a través de este SNARE se logra coordinar conjuntamente la actividad de las AQP *ZmPIP2; 5* y *AtPIP2;7* y del canal de K^+ (Besserer *et al.*, 2012).

El conocimiento de la maquinaria implicada en internalización, localización y reciclado de AQP en el interior del sistema endomembranal de las células vegetales, resulta significativo para el entendimiento de la dinámica de las membranas celulares y su respuesta a la adaptación de los cambios ambientales. Además, la investigación dentro este rubro permitiría identificar otras proteínas claves asociadas a la actividad de las AQP y su control en la homeostasis celular (Luu & Maurel, 2013).

1.8 La proteómica como herramienta para el estudio de la localización de proteínas de membrana.

La localización sub-celular de las proteínas, es fundamental para su función celular y para eventos de señalización, es por ello que la determinación de la localización sub-celular de una proteína puede permitir la elucidación de procesos celulares espacialmente organizados y definidos por sus interacciones moleculares. Por esta razón, la predicción de

la localización de las proteínas es un tema de interés emergente en la comunidad científica. Además, existe la necesidad de la caracterización funcional de organelos y de compartimentos sub-celulares específicos, que cambian su composición según las condiciones ambientales a las que se somete la célula (Yates *et al.*, 2005; Breckels *et al.*, 2013).

El uso de la proteómica resulta bastante útil para la caracterización de la identidad molecular y funcional de los distintos organelos y compartimentos sub-celulares dentro de una célula. Ya que con la proteómica se puede identificar a la mayoría de los componentes proteicos, y asignar por un análisis *in silico* una función y una localización sub-celular a estas proteínas. Es así que combinando la proteómica con técnicas clásicas de la biología celular, se puede llevar a la caracterización funcional de todo un organelo y a la identificación de proteínas claves implicadas en algún proceso fisiológico.

La proteómica de un organelo o un compartimento-subcelular comienza con el aislamiento y purificación del componente celular de interés. Normalmente esto se logra a través de centrifugación diferencial y procesos de purificación y enriquecimiento de los componentes deseados. Una vez llevado a cabo esto, se dispone la muestra, para su estudio proteómico, a nivel cualitativo y cuantitativo (Neilson *et al.*, 2011). La proteómica cuantitativa puede ser separada en dos grandes ramas, la primera es aquella que utiliza el marcaje de las diferentes proteínas con isótopos no-radioactivos o fluóforos, para después someter las muestras a procesos de fraccionamiento. Un ejemplo, es utilizando la electroforesis de dos dimensiones (2DE). La primera dimensión consta de la separación por punto isoeléctrico en condiciones reductoras y desnaturizantes, y en la segunda dimensión las proteínas se separan en base a sus pesos moleculares también en condiciones desnaturizantes. Las proteínas separadas por 2DE son visualizadas gracias al marcaje previo con fluóforos o compuesto radioactivos, lo cual además permite detectar e identificar a las proteínas que cambian su nivel de abundancia. Estos puntos con cambios de abundancia en el 2DE son entonces cortados y digeridos típicamente con tripsina para posteriormente ser analizados e identificados. Dentro de la espectrometría de masas, la denominada como MALDI-TOF (por sus siglas en inglés, **M**atriz- **A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onization-**T**ime-**O**f-**F**light), determina la huella de masas de los diferentes péptidos que se separan de cada punto, a los cuales se les asigna un espectro carga-masa (m/z), que se compara con las diferentes bases de datos bioinformáticas (Neilson *et al.*, 2011). Sin embargo, la técnica de marcaje y separación por 2DE tiene ciertas limitaciones, como lo son la disponibilidad de las marcas y que no siempre estas se pueden aplicar en

todo tipo de muestra, además de que la identificación se reduce a los cambios de abundancia que depende de la sensibilidad de la marca. Aunado a esto, si se trata de muestras provenientes de membranas celulares, como en el caso de organelos, esta técnica no es muy efectiva para llevar a cabo la identificación de péptidos hidrofóbicos (Wang *et al.*, 2008).

Otra forma de llevar a cabo proteómica cuantitativa, derivó de la correlación que existe entre la abundancia de las proteínas y el área bajo la curva o el número de espectros MS/MS que se obtiene de un análisis por espectrometría de masas. A esta variación técnica se le denominó proteómica libre de marca o "*label-free*", y representa una estrategia que permite el estudio de muestras libres de métodos de marcaje y separación como los geles tipo 2DE. Esta técnica, es que permite una mayor identificación de péptidos, beneficiando así la composición global de péptidos que responde a un tipo de estímulo o condición específica, lo cual lleva a la caracterización de bio-marcadores proteicos. Una forma de llevar a cabo este tipo de técnica es por medio de LC-MS/MS (por sus siglas en inglés, **L**iquid-**C**hromatography-Tandem **M**ass **S**pectrometry). La cual combina el fraccionamiento primario de la muestra por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas. Y representa una herramienta bastante confiable y con alta resolución para la identificación de proteínas provenientes de una muestra biológica compleja. Este método parte de la digestión de la muestra proteica con una proteasa, los péptidos son después sometidos a la cromatografía de alta resolución (HPLC), seguido de la MS en tándem, e identificación de péptidos por búsqueda en bases de datos. La abundancia proteica relativa se determinada por el número de espectros o por la intensidad en los picos del cromatograma. El método LC-MS/MS permite el análisis a gran escala, también tiene un alto índice de reproducibilidad, reconoce cambios pequeños pero significativos a nivel biológico y típicamente el número de espectros correlaciona bastante bien con la abundancia proteica en la muestra biológica (Bantscheff & Schirle 2007).

2. ANTECEDENTES

M. crystallinum es una planta halófila que se utiliza como planta modelo para el estudio de los mecanismos de tolerancia a la salinidad y a la sequía. En esta halófila se ha observado que para mantener un balance hídrico óptimo en condiciones de salinidad y/o de estrés osmótico, existe expresión y regulación diferencial de las AQP (Kirch *et al.*, 2000; Vera-Estrella *et al.*, 2004; 2012). Sin embargo, se ha reportado también que no siempre existe una relación entre la regulación a nivel transcripcional de las AQP y la abundancia proteica que se encuentra bajo una condición ambiental definida (Vera-Estrella *et al.*, 2012). Las AQP se regulan a nivel post-traducciona l y por medio de tránsito vesicular (Barkla *et al.*, 1999; Vera-Estrella *et al.*, 2004 y 2012).

Se ha logrado determinar que *M. crystallinum* es capaz de responder de manera concreta al estrés osmótico y al estrés salino, en particular, se ha detectado que existe una expresión diferencial de las AQP dependiendo el tipo de estrés, el tejido y el tipo celular (Vera-Estrella *et al.*, 2000 y 2004). Por ejemplo, bajo condiciones de crecimiento en ausencia de NaCl *M. crystallinum* expresa en el tonoplasto la AQP altamente permeable al agua *McTIP1;2*, la cual incrementa su abundancia en la parte aérea y en la raíz cuando se exponen a estrés osmótico. En la parte aérea de la planta en respuesta a estrés osmótico *McTIP1;2* cambia su localización del tonoplasto a compartimentos multivesiculares (MVB) y en respuesta a estrés iónico, *McTIP1;2* disminuye su abundancia. Otro ejemplo, es la AQP *McPIP1;4*, la cual se caracteriza por ser una acuagliceroporina que se expresa tanto en la parte aérea de la planta como en la raíz y preferencialmente en las células asociadas al floema (Kirch *et al.*, 2000). Cuando hay estrés por salinidad la *McPIP1;4* incrementa su abundancia en la parte aérea de la planta, mientras que bajo estrés osmótico su abundancia decae significativamente (Hernández, 2007). De manera interesante, la AQP *McPIP2;1* con alta permeabilidad al agua, se expresa específicamente en las células de la epidermis y endodermis de la raíz. Además, se sabe que *McPIP2;1* se ubica subcelularmente en el retículo endoplasmático, en el aparato de Golgi, en el tonoplasto y en la membrana plasmática de las células radicales, cuya abundancia incrementa en condiciones de salinidad y estrés osmótico (Amezcu a-Romero, 2012). Aunado a esto, se ha observado que la expresión conjunta de *McPIP1;4* con *McPIP 2;1* en ovocitos de *Xenopus laevis*, provoca un incremento en la permeabilidad al agua (Hernández, 2007), lo que indica que estas proteínas podrían estar formando poros heteroligoméricos

funcionales, proceso que ha sido reportado para las AQP *ZmPIP1;2*, *ZmPIP2;1* y *ZmPIP2;4* de *Zea mays* (Fetter *et al.*, 2004). Sin embargo, es necesario confirmar la formación de estos heteroligómeros en *M. crystallinum*, ya que podría representar un tipo de regulación postraducciona, que no ha sido reportada hasta el momento. Los principales mecanismo de regulación postraducciona que se han reportado para las AQPs *McTIP2;1*, *McPIP1;4* y *McPIP2;1* son un aumento en los niveles de fosforilación, de glucosilación, y regulación por tránsito vesicular y ritmo circadiano (Vera-Estrella *et al.*, 2004; 2012).

Una forma de estudio novedoso de las AQPs a nivel subcelular, surgió a partir del uso de la **E**lectroforesis **Z**onal de **F**lujo **L**ibre (EZFL), la cual permite fraccionar los diferentes tipos de membranas subcelulares por su carga neta (Barkla *et al.*, 2007). Con esta técnica se logró elucidar que la AQP *McPIP1;4*, se localiza específicamente en compartimentos de almacenamiento proteico (PSV) y en presencia de estrés osmótico la *McTIP1;2* se relocaliza del tonoplasto a compartimentos multivesiculares (CMV) en la parte aérea de la planta. Además, mediante el uso de microscopía confocal y electrónica, y por estudios preliminares en la secuenciación de péptidos por espectrometría de masas, se ha encontrado que en estos compartimentos subcelulares se acumulan proteínas que podrían tener una participación directa con la tolerancia a la salinidad (Datos no publicados).

Otro dato interesante, es que al fraccionar por EZFL la proteína microsomal previamente obtenida de la raíz de *M. crystallinum* en *crystallinum* crecidas en ausencia o presencia de 200 mM de NaCl, se obtienen fracciones que han sido caracterizadas por contener Tonoplasto, Membrana Plasmática y Retículo Endoplasmático asociado al Aparato de Golgi (Figura 7). Sin embargo, también se obtienen fracciones con características electroforéticas preferenciales hacia el extremo catiónico (positivo) del sistema de EZFL, lo cual indica que sus componentes están cargados negativamente (Figura 7). De estas fracciones se conoce muy poco, pero resultados preliminares permitieron conocer que dentro estas fracciones se encuentran las AQPs *McPIP1;4* y *McPIP2;1* tanto en condiciones con y sin tratamiento con NaCl. Ante esta información, se postula que si conociéramos la identidad y función de las proteínas contenidas en dichas fracciones, se podrían sugerir mecanismos primordiales para la adaptación y la modulación de las AQPs presentes en estas fracciones de la raíz de *M. crystallinum* cuando se encuentra en condiciones de salinidad. Procesos celulares que podrían ser necesarios para el control en los cambios osmóticos a nivel de la raíz bajo el estrés salino.

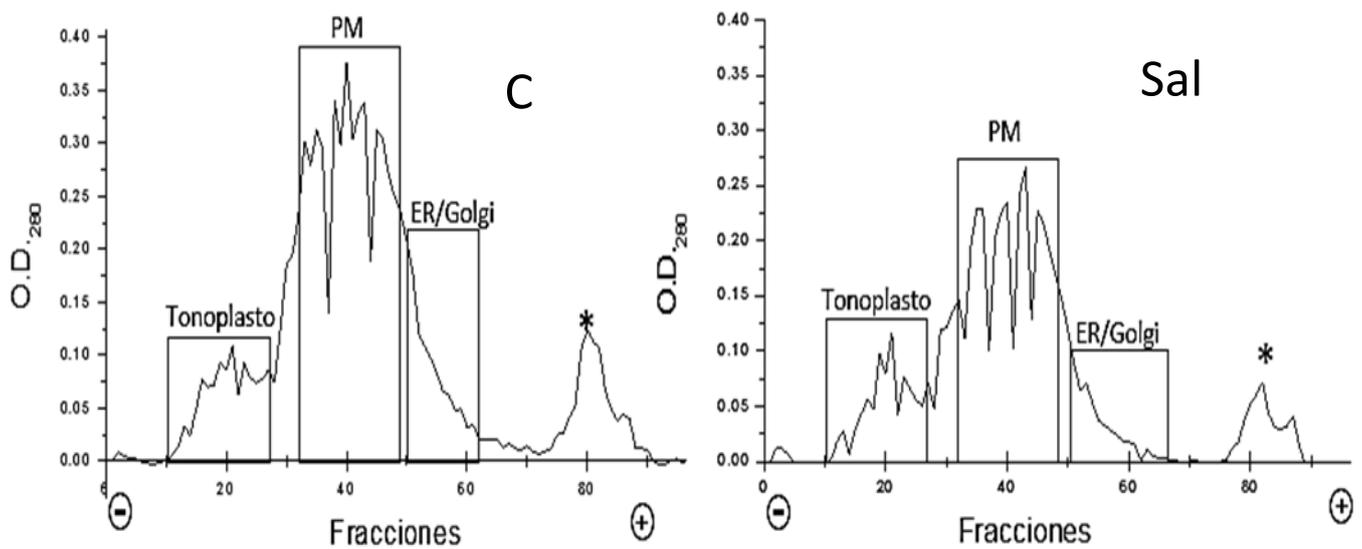


Figura 7. Identificación por EZFL de fracciones únicas provenientes de microsomas de raíz de *M. crystallinum*. Perfiles de separación por EZFL de los microsomas aislados de raíces de *M. crystallinum* en ausencia (Izquierda, C) y en presencia de 200 mM de NaCl (Derecha, Sal). Los rectángulos sobre las gráficas indican la identidad membranal de las fracciones anteriormente caracterizadas por Amezcua-Romero, 2012. La población de microsomas de interés y que poseen una movilidad electroforética preferencial hacia el cátodo se marca con (*).

3. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de los mecanismos de tolerancia a salinidad que exhiben las halófitas, se ha convertido en un tema de importancia dentro del quehacer científico, debido a la necesidad de mantener la producción de cultivos agrícolas. Un punto clave dentro de la resistencia a la salinidad es mantener el balance hídrico dentro de la planta para evitar los daños osmóticos e iónicos inducidos por el estrés salino. La regulación diferencial de las AQP se propone como un mecanismo de tolerancia utilizado por *M. crystallinum* en respuesta a la salinidad. En la literatura existen pocos reportes a nivel proteico, sobre la respuesta que exhiben las raíces de plantas halófitas ante el estrés salino. Conocer estas respuestas, es de suma importancia debido a la funcionalidad que tiene la raíz para la toma y el consumo de agua y nutrientes.

Como se mencionó, en la raíz de *M. crystallinum* se encuentran fracciones subcelulares en ausencia (C) y o presencia de 200 mM NaCl (S) en los cuales se expresan las AQP *McPIP1;4* y *McPIP2;1*. Las proteínas contenidas en estas fracciones nunca han sido estudiadas en cuanto a su composición y función celular; por ello conocer la

composición proteica de estas fracciones permitirá entender qué tipo de membrana celular contienen, como se conforma y cuál es su respuesta durante el estrés salino en la raíz, ya que en él se expresan proteínas como las AQP, que se encuentran implicadas en los mecanismos de tolerancia a la salinidad en esta planta halófila y que pueden utilizarse como marcadores subcelulares de identidad membranal. Además, la identificación de proteínas diferentes a las AQP en estas fracciones microsomales nunca antes estudiadas, permitirá entender la dinámica que sufren estas proteínas contenidas en estas fracciones ante condiciones de estrés salino.

4. HIPÓTESIS

El análisis por proteómica comparativa de las fracciones obtenidas por EZFL y caracterizadas por poseer cargas negativas de la raíz *Mesembryanthemum crystallinum* en condiciones ausencia o presencia de 200 mM NaCl, identificará la identidad y la dinámica de las proteínas contenidas en estas fracciones en condiciones de salinidad.

5. OBJETIVOS

General

Caracterizar a nivel proteómico a las proteínas contenidas en las fracciones aisladas por EZFL de la raíz de *M. crystallinum* en ausencia o presencia de 200 mM de NaCl, enfocándonos en la abundancia de proteínas de membrana.

Particulares

- ❖ Obtener las fracciones más negativas, a partir de preparaciones de microsomas de raíces de plantas de *M. crystallinum* crecidas en ausencia o presencia de NaCl (200 mM), por medio del uso de la técnica de EZFL.
- ❖ Identificar a nivel proteómico a las proteínas contenidas en las fracciones en condiciones de ausencia y presencia de NaCl, mediante el uso de la secuenciación masiva de péptidos (LC-MS/MS).
- ❖ Caracterizar por medio de análisis bioinformático a las proteínas identificadas en las fracciones colectadas por EZFL.
- ❖ Validar por ensayos de inmunodetección tipo Western blot, algunas de las proteínas identificadas en el análisis proteómico de las fracciones aisladas por EZFL.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material Biológico

Las plantas de *M. crystallinum* se crecieron a partir de semillas sembradas en sustrato Metro mix 510 (Scotts, Marysville, OH), mezclado con agrolita (DicaMex, México), en una relación de 4:1 v/v. Tres semanas después de su germinación, las plántulas se transfirieron a recipientes de 10 L para su cultivo hidropónico, conteniendo 0.5 X de solución nutritiva de Hoagland's [0.25 mM (NH₄)₂HPO₄, 1.5 mM KNO₃, 1 mM Ca(NO₃)₂·4H₂O, 0.5 mM MgSO₄·7H₂O, 0.025 mM Na₂EDTA·2H₂O, 0.025 mM FeSO₄·7H₂O, 11.5 μM H₃BO₃, 4.01 μM MnSO₄, 0.19.5 μM ZnSO₄·7H₂O, 0.8 μM CuSO₄·5H₂O, 0.02 μM H₂OO₄·2H₂O] (Hoagland & Arnon, 1938) con aeración constante. Los tratamientos con sal se iniciaron 2 semanas después de haber sido transferidas las plantas a hidroponía o a 6 semanas de la germinación, y consistió en incluir 200 mM de NaCl en la solución de Hoagland's. En todos los procedimiento antes descritos, las plantas y los cultivos hidropónicos se mantuvieron en invernadero bajo radiación y fotoperiodo natural, con un rango de temperatura entre 20-25°C.

6.2 Aislamiento de microsomas de raíz de *M. crystallinum*

Este procedimiento se realizó a 4°C. Treinta gramos de tejido de raíz de *M. crystallinum* cortado en fragmentos pequeños, se trituraron con 5 pulsos de 30 segundos con descansos de 30 segundos entre cada pulso en una licuadora comercial (Waring, México) con 300 mL de medio de homogenización [400 mM manitol, 10%(w/v) glicerol, 5%(w/v) PVP-10, 1 mM PMSF, 30 mM Tris, 2 mM DTT, 5 mM EGTA, 0.5 mM hidroxitolueno butilado, 0.25 mM dibucaína, 1 mM benzamidina y 26 mM metabisulfito de potasio ajustado a pH 8.0 con ácido sulfúrico], el tejido homogenizado, se filtró a través de seis capas de gasa y se centrifugo a 10,000 g en la centrifuga Beckman Avanti J301 con el rotor JA25.2 (Beckman–Coulter, México) durante 20 minutos, lo cual permitió la remoción de los fragmentos celulares derivados de la homogenización. Después se recuperó el sobrenadante, que se centrifugo a 80,000 g por 50 minutos en el rotor Ti45 en la ultracentrifuga Beckman L-80 (Beckman–Coulter, México), este paso permitió concentrar la a los microsomas que contienen las membranas celulares. La pastilla de microsomas se resuspendió en 2 mL de medio de suspensión [Manitol 0.25 M, Glicerol 10%, Tris/Mes 0.3

mM pH 8 y DDT 2 mM]. Por último, las muestras se congelaron con N₂ líquido para almacenarse a -80°C hasta su utilización.

6.3 Electroforesis zonal de flujo libre

La separación de membranas por EZFL, se basa en la separación de las diferentes vesículas de membrana (microsomos) utilizando una capa fina líquida de buffer a la cual se le añade un campo constante de voltaje perpendicular al flujo del medio de separación, lo cual se permite la separación de las vesículas según su carga neta (Barkla *et al.*, 2007; Barkla *et al.*, 2009). Los microsomos se diluyeron a una relación 1:1 v/v en medio de separación (250 mM sacarosa, 2 mM KCl, 10 mM TEA, 10 mM ácido acético, pH 7.4) y se centrifugaron a 14,000 *g* por 20 min a 4 °C. El sobrenadante se reservó y de éste se tomaron 3 mg/mL, y se le añadieron 25 µL de 6 mM MgSO₄, 25 µL de 3 mM ATP. Esta fue la muestra que se inyectó continuamente en el sistema de separación por EZFL, (BD FFE Proteomics, Alemania) a una velocidad de 7-8 mg de proteína h⁻¹, con un flujo del buffer de 1.2 mL h⁻¹, por medio de una bomba peristáltica. Las diferentes membranas de la fracción microsomal de raíz se separaron de forma horizontal, con el medio de separación por las entradas de alimentación 2 y 6; y con el medio de estabilización [40 mM TAE, 40 mM ácido acético, 8 mM KCl y 180 mM sacarosa] por las entradas de alimentación 1 y 7. A una temperatura continua de 4°C, con un voltaje constante de 750 V y una velocidad de flujo y contraflujo de 250 mL/h. Las fracciones de vesícula de membrana resultantes de la separación por EZFL se colectaron en placas de 4 mL de 96 pozos (Sunergia Medical, VA). El perfil de separación se determinó a 280 nm en placas de 250 µL en un lector de microplacas (Power-Wave, Bio-Teck Instruments, Vermont, EUA), lo cual permitió identificar las fracciones de interés. Después de siete placas de 4 mL colectadas, cada fracción se agrupo con sus homólogas con ayuda de una pro-pipeta y una pipeta serológica. Se centrifugaron a 100,000 *g* por 45 min y las pastilla de cada una de las fracciones se resuspendió en buffer de suspensión (250 mM manitol, 10% glicerol, 6 mM tris-MES pH 8.0, 2 mM DTT) para ser congeladas en N₂ líquido y almacenadas a -80°C.

6.4 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se llevó a cabo por el método colorimétrico de Bradford modificado (Bradford, 1976), con albumina de suero bovino (BSA) como estándar. Para cuantificar el contenido de proteína de cada muestra se tomaron dos microlitros y se le añadieron 30 µL de Tritón X-100 al 0.05%, que permite solubilizar las vesículas de

membrana y dejar libres a las proteínas. Después de 5 minutos se añadieron 800 mL de H₂O (MiliQ) y 200 µL del reactivo de Bradford (BIO-RAD, México), estos compuestos se mezclaron con ayuda de un vortex. Con el espectrofotómetro DU (Hewlett Packard, EUA), se cuantificó a una longitud de onda de 595 nm, el contenido total de proteína libre en cada muestra. Cada una de las cuantificaciones proteicas se hizo por duplicado.

6.5 Precipitación de proteínas por medio ácido tricloroacético y acetona

A las fracciones obtenidas del EZFL (4 experimentos independientes separados) se les adicionaron 2% de la solución amortiguadora de TE pH 8.0, 0.06% deoxicolato de sodio, 15% de ácido tricloroacético (TCA) se incubaron por 2 h en hielo, se centrifugaron a 14000 g por 20 min a 4°C. Se aspiró el sobrenadante, y la pastillas se re-suspendió en el volumen inicial pero de acetona al 90%, para después incubarse a -30°C toda la noche. Posterior a esto se centrifugaron a 14000 g por 20 min a 4°C. Se aspiró el sobrenadante y la plastilla resultante se secó en una centrifuga de vacío (Savant, DNA120, Termo Sci., México) por 20 min. Todas las muestras se enviaron a la unidad de proteómica de Montreal (Institut de Recherches Cliniques de Montreal) para su procesamiento y secuenciación.

6.6 Cromatografía líquida acoplada a MS/MS

La adquisición de datos para los LC-MS/MS se realizó utilizando 11 ciclos para cada MS scan adquirido en el Orbitrap. Los espectros se extrajeron en el programa Mascot Daemon versión 2.2.2. Todos las muestras MS/MS se analizaron utilizando Mascot (Matriz Science, Londres, Inglaterra) y X! Tandem (The GMP, thegpm.org; versión 2007.01.01.1). El Mascot se programó para analizar la base de datos nr_20101214. Ambos programas, Mascot y X! Tandem se programaron para buscar los espectros tenían una tolerancia de 0.6 Da de masa y una tolerancia de iones de 12 ppm. Oxidaciones de metionina e iodo acetamida derivadas de cisteína se consideraron como modificaciones en ambos programas.

6.7 Análisis bioinformático

Se utilizó el programa Scaffold (versión 4.0 Proteome Software Inc., Portland, OR, EUA) para validar las identificaciones de los péptidos y proteínas basadas en los espectros de MS/MS y para identificar las proteínas diferencialmente reguladas para las condiciones control y de tratamiento con NaCl. Las identificaciones proteicas se depuraron manualmente, para aceptar únicamente a aquellas con, una probabilidad mayor a 99%, un

porcentaje de cobertura mayor al 95% y que tuvieran al menos dos péptidos únicos, en al menos dos de las cuatro repeticiones experimentales. La anotación funcional y el análisis de enriquecimiento de ontologías (GO) de las proteínas se realizó con la herramienta bioinformática Blast2Go (Conesa *et al.*, 2005 y 2008). La localización subcelular y la anotación funcional asignada por el Blast2Go fue verificada manualmente por medio de Quick-GO de EMBL-EBI (Binns *et al.*, 2009).

6.8 Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes

Para llevar a cabo la electroforesis desnaturalizante de las proteínas de las fracciones obtenidas de los microsomas aislados de raíz de *M. crystallinum*, se precipitaron 25 µg de proteína en una solución de 50% etanol y 50% acetona en una relación 1:50 por al menos 3 horas a -30°C. Las muestras se centrifugaron por 20 minutos a 14,000 *g* en la centrifuga de mesa refrigerada 5415R (Eppendorf, EUA). La pastilla obtenida se secó y se suspendió en buffer de Laemmli 1X con 2.5% de SDS (Laemmli, 1970). Las muestras se calentaron a 60°C por 2 minutos para permitir su desnaturalización. Posteriormente fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 10% o 12% (peso/volumen). La electroforesis SDS-PAGE se llevó a cabo en una solución amortiguadora (25 mM Tris/HCl pH 8.3, 250 mM glicina y 0.1% de SDS) por 45 minutos a un voltaje de 200 V. Los geles se tiñeron por 30 minutos con colorante Azul de Coomassie R250 al 0.25% en una solución de metanol 50%: ácido acético 7%, y se destiñeron con una solución de metanol: ácido acético: H₂O en una proporción 1:1:8 por 24 horas.

6.9 Inmunodetección tipo “Western blot”

La transferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa, se llevó a cabo por medio de una solución amortiguadora de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 190 mM, Metanol 25%), a 100 V por 1 hora 15 minutos. Las membranas de nitrocelulosa, se bloquearon con solución al 5% de leche en polvo sin grasa (Svelty, Nestlé, México) disuelta en TBS (NaCl 150 mM, Tris/HCl 50 Mm a pH 7.5 y azida de sodio 0.05%) durante al menos una hora a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron durante 12 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios específicos dirigidos contra las proteínas de interés a evaluar (Tabla A), a una dilución 1:1000. Terminada la incubación con el anticuerpo primario, las membranas de nitrocelulosas se lavaron de manera sucesiva con TBS, TBS-tween-20 y TBS por 10 min para cada lavado, con lo que se eliminó el anticuerpo primario no unido a proteínas específicas, y después se incubaron por

al menos dos horas con el anticuerpo secundario, IgG H+L conjugado a peroxidasas de rábano a una dilución 1:5000. Las membranas se lavaron en forma sucesiva como en el paso anterior. La detección de la proteína conjugada con el anticuerpo se realizó por quimioluminiscencia con el paquete Luminata (Millipore, MA, EUA). El método se basa en la oxidación del luminol (que provoca la emisión de luz) catalizado por la peroxidasa de rábano y peróxido de hidrógeno en condiciones alcalinas. Para la obtención de las imágenes se utilizó el escáner C-Digit para blots (Li-COR, Lincoln, NE, EUA). Todas las inmunodetecciones se realizaron por duplicado o triplicado, para el análisis de imágenes se utilizó el programa Image J (Imagen Processing and Analysis in Java), el cual mide los cambios en la intensidad de las bandas por área al cuadrado (área - *píxeles* x 10²).

7. RESULTADOS

7.1 Separación de fracciones de membrana por EZFL de los microsomas aislados de raíz de *M. crystallinum*.

Para iniciar con la caracterización de las proteínas contenidas en las fracciones de EZFL de este proyecto (Figura 7); primero se obtuvo todo el material proteico necesario, para la identificación masiva de péptidos (LC-MS/MS). Una preparación de microsomas que se origina del procesamiento de 120 plantas permite obtener cerca de 3 mg/mL de proteína. Sin embargo, para realizar el fraccionamiento de los microsomas en el equipo de EZFL, se necesitan 36 mg de preparación microsomal para una repetición experimental. Esta cantidad de material microsomal representa seis veces más de lo que se logra obtener a partir de una sola preparación microsomal. Por lo tanto una sola repetición experimental represento el procesamiento de alrededor de 720 plantas crecidas en ausencia (**C**) y o presencia de 200 mM de NaCl (**S**). Por esta razón, se hicieron en total 48 preparaciones microsomales, para poder obtener todo el material necesario para las cuatro réplicas experimentales de la condición sin tratamiento y las cuatro réplicas experimentales de la condición de tratamiento con NaCl.

Se llevó a cabo la separación de los microsomas por EZFL, el cual se basa en la separación o fraccionamiento de las vesículas de membrana por su carga neta superficial. El material microsomal se inyectó de forma continua y fluida al interior de la cámara de separación. El fraccionamiento de las vesículas se realizó por la presencia de un campo eléctrico perpendicular al flujo microsomal que permitió la separación de 96 fracciones, de

las cuales se colectaron de la fracción número 11 a la 86. Esta selección de recolección se derivó gracias al perfil proteico determinado con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm, lo cual es un indicio de la cantidad de proteína dentro de las 96 fracciones de los microsomas aislados de *M. crystallinum* tratadas o no tratadas con 200 mM de NaCl (Figura 8).

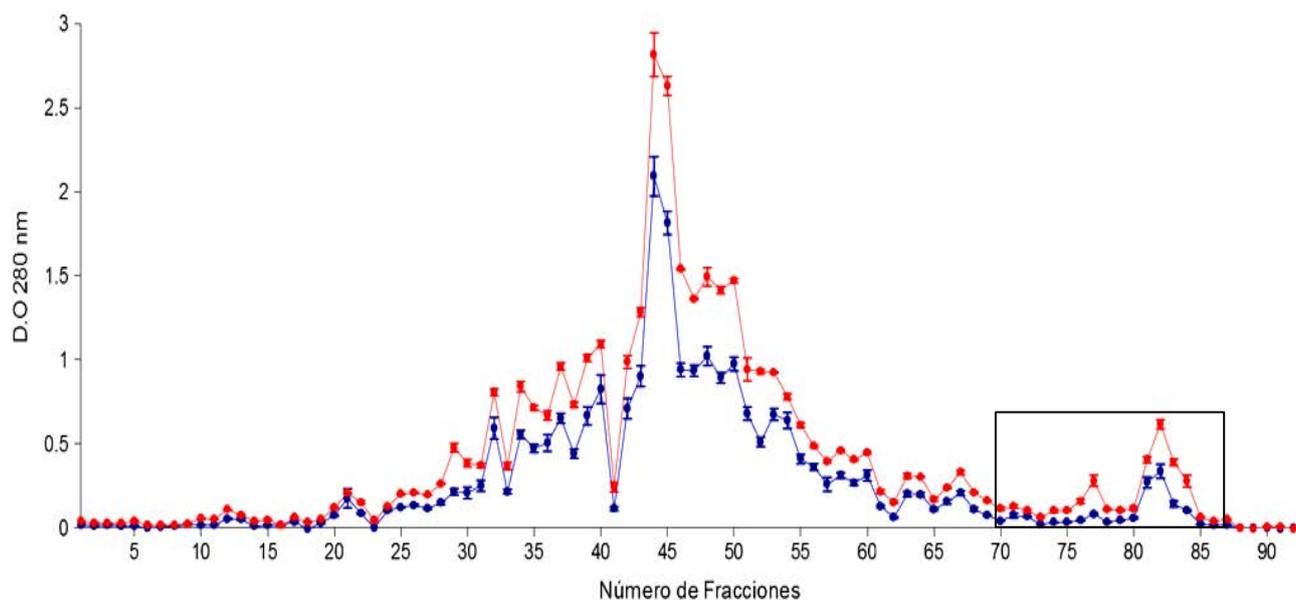


Figura 8. Perfil de distribución de las proteínas contenidas en las fracciones separadas por EZFL de los microsomas de la raíz de *M. crystallinum*. Las fracciones correspondientes a las fracciones aisladas de las raíces crecidas en ausencia (C) o en presencia de 200 mM de NaCl (Sal), se encuentran marcados diferencialmente por los símbolos, ● y ● respectivamente. Se muestra la abundancia relativa de la proteína presente en las 96 fracciones colectadas por el sistema de EZFL, en términos de Densidad Óptica (D.O) registrada a una longitud de onda de 280 nm. Resultados representativos de cuatro replicas biológicas con error estándar. El recuadro marca las fracciones que se estudiaron.

7.2 Fracciones de membrana analizadas por LC-MS/MS

El perfil proteico de las fracciones de interés de este proyecto se ubicó entre las fracciones 70 a 86 (Figura 8 y 9). Uno de los aspectos fundamentales para poder realizar la secuenciación de proteínas por LC-MS/MS de las fracciones de interés (Figura 9), es que las proteínas contenidas en dichas fracciones no estén degradadas y que la concentración de proteína en estas fracciones, sea evaluado tanto por cuantificación de la proteína, como por medio de geles de acrilamida. Para esto, primero se evaluó la calidad de las proteínas provenientes de las fracciones que provienen de microsomas aislados de plantas no tratadas con sal (C). Esto, con el fin de conocer la abundancia de las proteínas contenidas en estas fracciones bajo estas (Figura 9B). Al evaluar el contenido proteico en cada una de estas fracciones, se detectó que las fracciones con mayor cantidad de proteína

correspondían a las fracciones 70 y 82-84 (Figura 9B), a diferencia de las fracciones 71 y 79 que no se pudieron cuantificar ya que la cantidad de material obtenido en estas fracciones no fue suficiente como para poder ser medido. Además, se evaluó la separación de las proteínas de las fracciones 70, 78, 82, 83 y 84 por medio de un gel de SDS-PAGE (Figura 9C). En base a estos resultados, se decidió enviar para el análisis por LC-MS/MS a las fracciones que van desde el número 80 al 85 (Figura 9D), debido a que son las fracciones que contienen mayor contenido proteico y son fracciones continuas. Antes de enviar a secuenciar las fracciones seleccionadas por LC-MS/MS, tanto aquellas derivadas del fraccionamiento de microsomas aislados de plantas crecidas en ausencia (C80 a C85), como de presencia de 200 mM de NaCl (S80 a S85) se cuantificó el contenido proteico de cada una de las fracciones (Figura 9D). El cual sirvió de referencia para poder precipitar 10 mg de proteína de cada una de las fracciones provenientes de cada una de las réplicas experimentales. La precipitación proteica fue por el método de TCA y acetona, como se menciona en **Materiales y Métodos**. Las muestras de las fracciones se enviaron a la unidad de proteómica del Instituto de Ciencias Clínicas de Montreal (*Institut de Recherches Cliniques de Montréal*), en donde fueron procesadas para la identificación de péptidos.

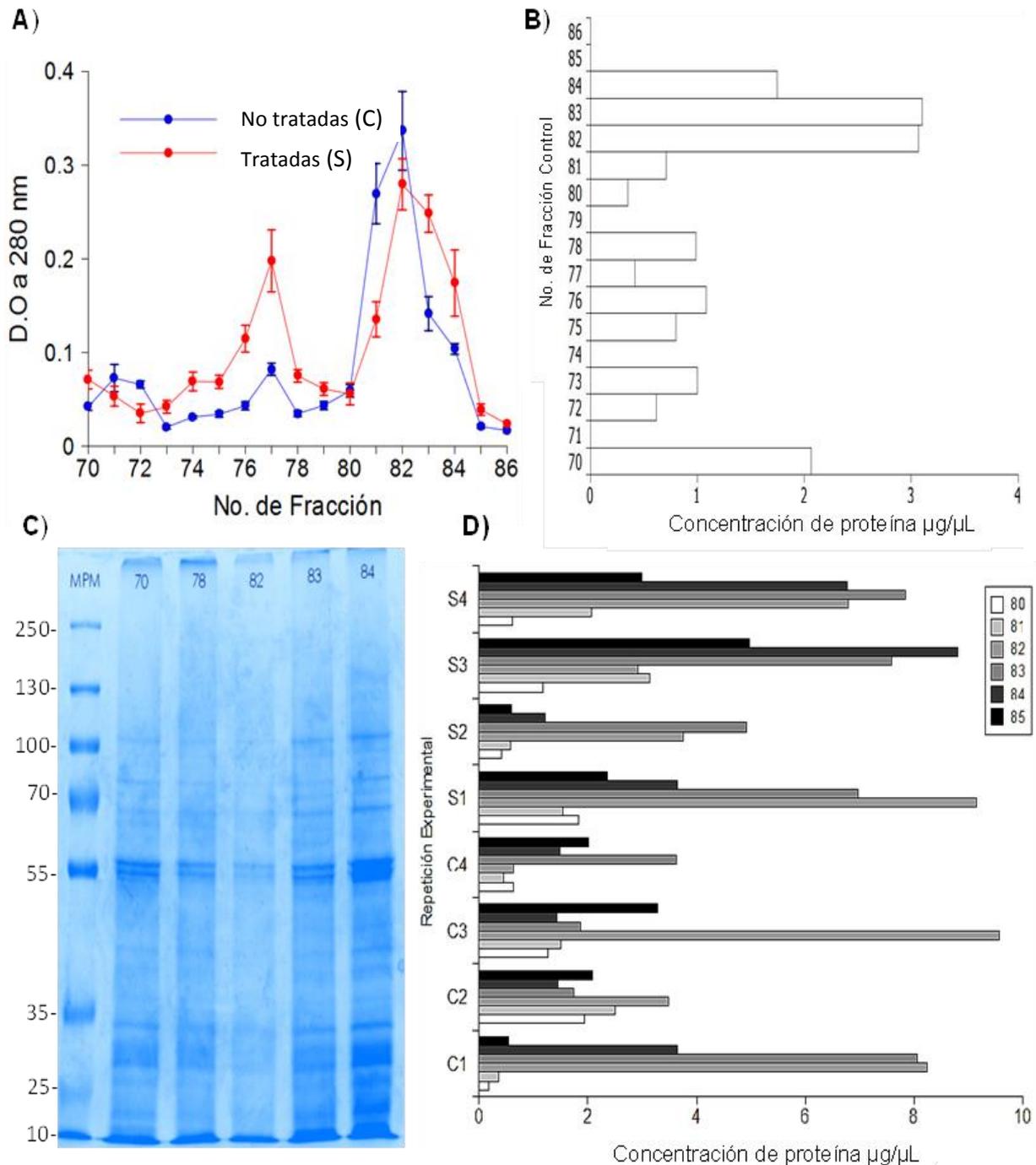


Figura 9. Evaluación de la cantidad y calidad de las fracciones diferenciadas por EZFL, para seleccionar aquellas útiles para la identificación de las proteínas contenidas en las fracciones características de la raíz de *M. crystallinum*. Las fracciones correspondientes a los microsomas aislados de plantas crecidas sin tratamiento con sal se marcan con una (C) o por el símbolo ● y aquellas fracciones provenientes de microsomas aislados de plantas crecidas en presencia de 200 mM de NaCl se marcan con una (S) o por el símbolo ●. **A)** Perfil proteico de las fracciones 70 a 86 aisladas por EZFL. **B)** Contenido proteico de las fracciones en µg/µL, derivado del fraccionamiento de microsomas provenientes de plantas no tratadas. **C)** Gel de SDS-PAGE al 10% cargado con 10 µg de proteína de las fracciones 70, 78, 82, 83 y 84, aisladas de plantas crecidas en ausencia de NaCl. **D)** Cuantificación proteica de todas las repeticiones experimentales C y S (enumeradas del 1 al 4) del fraccionamiento por EZFL para poder precipitar los 10 mg de proteína necesaria de las fracciones 80 a 85 para su secuenciación por LC-MS/MS.

7.3 Proteínas identificadas por LC-MS/MS

La LC-MS/MS de las fracciones 80 a 85 aisladas tanto de microsomas obtenidos de plantas crecidas en ausencia (C) como en presencia de 200 mM de NaCl (S), llevo a la identificación de 615 proteínas. Como se describió en el apartado de **Análisis bioinformático** de la sección de **Materiales y Métodos**, se realizó una depuración de la lista original de 615 proteínas identificadas, lo que dio como resultado una lista final de 402 proteínas (Tabla 1), bajo los parámetros del número de péptidos (>2), el porcentaje de cobertura (> 95%) y su presencia en al menos dos de las repeticiones experimentales. De estas 402 proteínas 285 son compartidas en ambas condiciones, 59 y 58 son proteínas únicas para las condiciones de ausencia y de presencia del tratamiento con NaCl, respectivamente.

Tabla 1. Proteínas identificadas por LC-MS/MS en las fracciones 80 a 85 aisladas por EZFL de plantas de *M. crystallinum* crecidas en ausencia o en presencia de NaCl.

	Nombre de la proteína	No. de acceso	Taxonomía	Fracción o fracciones en las que se ubica la proteína.
1	Fosfatasa de Serina/Treonina 2A	75319459	<i>Setaria italica</i>	S81, S82
2	(S)-adenosil-L-metionina:delta 24-esterol metiltransferasa	162460103	<i>Zea mays</i>	C82
3	14-3-3	526117762	<i>Vitis vinifera</i>	S82, S83, S84, S85
4	14-3-3 SGF14h	351725929	<i>Glycine max</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85
5	Subunidad alfa E2 del proteosoma 20S	15231824	<i>Arabidopsis thaliana</i>	S80, S81,S82,S83,S84,S85
6	Subunidad del Complejo regulatorio Rpn2/Psmd1 del proteosoma 26S	508713415	<i>Theobroma cacao</i>	C81, C82, C83
7	Proteína ribosomal S13 40S	351722010	<i>Glycine max</i>	C81, C82, C83
8	Proteína ribosomal S23 40S	473793860	<i>Triticum urartu</i>	S81, S82, S84, S85
9	Proteína ribosomal S27-1 40S	15225550	<i>Arabidopsis thaliana</i>	S84
10	Proteína ribosomal SA 40S	226491586	<i>Zea mays</i>	C81,C82, C83, C84
11	Complejo I subunidad de 51 kDa	508708965	<i>Theobroma cacao</i>	S80, S81,S83, S85
12	Proteína ribosomal L1 60S	418731475	<i>Solanum tuberosum</i>	C82, C83, C85
13	Proteína ribosomal L17 60S	226507038	<i>Zea mays</i>	S80, S82, S85
14	Proteína ribosomal L37a 60S	413968440	<i>Solanum tuberosum</i>	C83, C85
15	Proteína ribosomal L9 60S	330318708	<i>Camellia sinensis</i>	S81, S82, S83, S84, S85
16	ATP asa tipo AAA	332642761	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85
17	Transportador ABC miembro C2	15226801	<i>Arabidopsis thaliana</i>	S82
18	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad β	430728281	<i>Camellia sinensis</i>	S80, S81,S82,S83,S84,S85
19	Adaptina isoforma 1	508777543	<i>Theobroma cacao</i>	C80, C82, C83
				S80, S81,S82,S83,S84,S85

20	<i>Factor 1 de ribosilación de ADP</i>	15226521	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
21	<i>Factor 3 de ribosilación de ADP</i>	30682545	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C83, C85 S80, S81, S82, S84, S85
22	<i>Factor 8C de ribosilación de ADP</i>	371501274	<i>Nicotiana tabacum</i>	C80, C81, C82 S80, S81
23	<i>Barril TIM tipo aldolasa</i>	15240625	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80, C82, C83, C85 S83
24	<i>Alfa-tubulina 1</i>	456368493	<i>Salix arbutifolia</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
25	<i>Alfa-tubulina, parcial</i>	527192192	<i>Genlisea aurea</i>	C80, C81, C82, C83, C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
26	<i>Acuaporina 7</i>	345649019	<i>Triticum aestivum</i>	S80, S81,S82,S83,S84,S85
27	<i>Acuaporina PIP1-1</i>	145332915	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81, S82, S83, S84, S85
28	<i>Acuaporina PIP1-5</i>	475553464	<i>Aegilops tauschii</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
29	<i>Acuaporina PIP2;1</i>	383479028	<i>Quercus petraea</i>	C80, C82, C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
30	<i>Acuaporina PIP2-5</i>	473960528	<i>Triticum urartu</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
31	<i>Ascorbato peroxidasa</i>	162457709	<i>Zea mays</i>	C80, C81, C82, C83, C85 S81, S82, S83, S84, S85
32	<i>Cassette de union a ATP subfamilia B4 isoforma 1</i>	508703542	<i>Theobroma cacao</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
33	<i>ATP sintasa subunidad beta, mitocondrial</i>	473798701	<i>Triticum urartu</i>	S81, S82
34	<i>ATPasa, tipo AAA, CDC48 isoforma 1</i>	508715986	<i>Theobroma cacao</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
35	<i>ATP sintasa subunidad delta'</i>	645252923	<i>Prunus mume</i>	C83 S82
36	<i>Beta-tubulina, parcial</i>	403329952	<i>Populus trichocarpa</i>	C82, C83, C84, C85
37	<i>Acarreador Mitocondrial de piruvato 2</i>	685292630	<i>Brassica rapa</i>	C83, C85 S82
38	<i>Cinasa señalizadora tipo BR</i>	508723317	<i>Theobroma cacao</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
39	<i>Proteína con dominio C2</i>	566179841	<i>Populus trichocarpa</i>	C85

40	<i>Proteína de unión a Ca⁺² EF</i>	351725291	<i>Glycine max</i>	C83, C85
41	<i>Proteína de unión a Ca⁺² EF isoforma 1</i>	508719001	<i>Theobroma cacao</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81, S82, S83, S84
42	<i>Cinasa dependiente de calcio 26</i>	334187258	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C82
43	<i>ATPasa 9 transportadora de calcio</i>	474315720	<i>Triticum urartu</i>	C85 S84
44	<i>Precursor de calnexina</i>	350539281	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80, C81, C82, C83, C84 S80, S81, S82, S83, S84
45	<i>Calnexina, parcial</i>	527201356	<i>Genlisea aurea</i>	C80, C83 S80, S81, S82, S83, S84
46	<i>Calreticulina-1 precursor</i>	351726214	<i>Glycine max</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
47	<i>Proteína de unión a carbohidratos</i>	15228737	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80, C81, C82, C83, C84 S81, S83
48	<i>Celulosa sintasa A subunidad catalítica 2</i>	15235042	<i>Arabidopsis thaliana</i>	S80, S81, S82
49	<i>Chaperonina CPN60-1, precursor mitocondrial</i>	162458253	<i>Zea mays</i>	C84, C85 S81, S84
50	<i>Quimiosanina</i>	475535645	<i>Aegilops tauschii</i>	S84
51	<i>Cinnamato 4-hidroxilasa</i>	343796371	<i>Leucaena leucocephala</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
52	<i>Complejo adaptador de clatrina subunidad mediana isoforma 1</i>	508705005	<i>Theobroma cacao</i>	C82 S80
53	<i>Cadena pesada de clatrina isoforma 1</i>	508725837	<i>Theobroma cacao</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
54	<i>Coatómero subunidad α-1</i>	645238309	<i>Prunus mume</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
55	<i>Coatómero, subunidad β isoforma 1</i>	508781970	<i>Theobroma cacao</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
56	<i>Proteína asociada a mediación de culinas</i>	508778507	<i>Theobroma cacao</i>	C80, C81, C83, C85 S82, S83, S84, S85
57	<i>D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa</i>	226498082	<i>Zea mays</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81, S82, S83
58	<i>RNA helicasa con caja DEAD/DEAH isoforma 1</i>	508782241	<i>Theobroma cacao</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
59	<i>Proteína G reguladora del desarrollo</i>	15235111	<i>Arabidopsis thaliana</i>	S82

60	<i>Dolichil- difosfo- Oligosacárido- Glico-Transferasa</i>	508699286	<i>Theobroma cacao</i>	S85
61	<i>Proteína con dominio DUF3411</i>	657371477	<i>Medicago truncatula</i>	C85
62	<i>Factor de elongación 1 gama</i>	527200561	<i>Genlisea aurea</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
63	<i>Factor de elongación 1 delta 1</i>	226503896	<i>Zea mays</i>	C82, C83 S81, S83, S85
64	<i>ATPasa del calcio del Retículo Endoplasmático isoforma 1</i>	508786937	<i>Theobroma cacao</i>	C80, C81, C82, C83 S81, S82, S83, S84, S85
65	<i>Homologo Endoplásmico</i>	645228977	<i>Prunus mume</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
66	<i>Aspartil-proteasa eucarionte isoforma 1</i>	508703797	<i>Theobroma cacao</i>	C82
67	<i>Péptido liberador de cadena subunidad 1-1</i>	226506470	<i>Zea mays</i>	C80, C82, C83, C84, C85 S81, S82, S83
68	<i>Factor de iniciación de la traducción 2, isoforma 1</i>	508700833	<i>Theobroma cacao</i>	C82
69	<i>Factor de iniciación de la traducción 3, subunidad C</i>	15228840	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80, C82, C83, C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
70	<i>Factor de iniciación de la traducción 4A1</i>	508782687	<i>Theobroma cacao</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
71	<i>Exportina 1A</i>	15237894	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80, C81, C82, C83, C84 S80, S82, S83, S84, S85
72	<i>Acilo- CoA sintetasa A</i>	475613686	<i>Aegilops tauschii</i>	C82, C84, C85 S80, S81, S82, S83
73	<i>Fructosa-bifosfatasa aldolasa isozima citoplasmática</i>	474210338	<i>Triticum urartu</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
74	<i>Proteína ribosomal S8 40S</i>	162464180	<i>Zea mays</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
75	<i>Transportador ABC familia B miembro 15</i>	645249303	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
76	<i>Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa</i>	469517896	<i>Atropa belladonna</i>	C81, C82, C84 S80
77	<i>Proteína de unión a guanilato inducida por interferon 2</i>	659078588	<i>Cucumis melo</i>	C85
78	<i>Proteína de choque termino 70-1</i>	508786823	<i>Theobroma cacao</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
79	<i>Proteína de choque termino 81-3</i>	474049119	<i>Triticum urartu</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
80	<i>Proteína de choque termino 89.1</i>	145338243	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C83, C85

81	<i>Proteína de choque termino 90-2</i>	315307968	<i>Nicotiana attenuata</i>	S82 C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
82	<i>Proteína de choque termino 90-4</i>	15241102	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
83	<i>Histona H4</i>	15226944	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80, C82 S80, S81,S82,S83,S84,S85
84	<i>Proteína de respuesta a hipersensibilidad 1</i>	15241939	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
85	<i>Proteína de respuesta a hipersensibilidad 2</i>	565392281	<i>Solanum tuberosum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
86	<i>Canal de aniones dependiente de voltaje 1</i>	590649630	<i>Theobroma cacao</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
87	<i>Importina subunidad alfa</i>	350536733	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81, S84, S85
88	<i>Importina subunidad beta-1</i>	473843231	<i>Triticum urartu</i>	C80, C81, C82, C83 S81, S82, S84, S85
89	<i>Isocitrato deshidrogenasa [NAD] subunidad regulatoria 3</i>	18414179	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S84
90	<i>Reducto-isomerasa acida</i>	508700932	<i>Theobroma cacao</i>	C83, C85 S81, S82, S83, S85
91	<i>Cinasa con dominio de repeticiones de tetratricopeptidos, isoforma 1</i>	508777465	<i>Theobroma cacao</i>	C85 S83
92	<i>Cinasa rica en repeticiones de leucina</i>	508783665	<i>Theobroma cacao</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
93	<i>Receptor rico en Leu, cinasa de Serina- Treonina BAK1</i>	18418211	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C83, C84 S84
94	<i>LMBR1 Proteína de membrana</i>	15240980	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80, C84 S81, S82, S83, S84, S85
95	<i>acilo-CoA sintasa 9 de cadena larga isoforma 1</i>	527204220	<i>Theobroma cacao</i>	C83, C85 S82, S84, S85
96	<i>Mediador de la transcripción por la RNA polimerasa II subunidad 36a</i>	18416588	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C81, C82, C83, C85 S83
97	<i>Metalopeptidasa M24 isoforma 1</i>	508715251	<i>Theobroma cacao</i>	C80, C82, C83
98	<i>Deshidrogenasa mitocondrial de</i>	395146543	<i>Linum usitatissimum</i>	S82, S83, S84, S85
99	<i>Peptidasa procesadora de la mitocondria subunidad alfa</i>	475582432	<i>Aegilops tauschii</i>	S84, S85

100	<i>Miosina isoforma 1</i>	508785445	<i>Theobroma cacao</i>	C83 S83, S84
101	<i>NADH deshidrogenasa (ubiquinona) Fe-S protein 7</i>	15239782	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S81, S82, S83, S84, S85
102	<i>NADH deshidrogenasa subunidad 5 (mitocondria)</i>	357197311	<i>Millettia pinnata</i>	C85 S82, S84, S85
103	<i>NADH deshidrogenasa subunidad 7 (mitocondria)</i>	357197331	<i>Millettia pinnata</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
104	<i>NADH deshidrogenasa subunidad 9 (mitocondria)</i>	371925899	<i>Raphanus sativus</i>	C84, C85
105	<i>Proteína de fusión sensible a N-etilmaleimida</i>	515416738	<i>Silene vulgaris</i>	C83
106	<i>Proteína con dominio de unión a nucleasas 1</i>	473923756	<i>Triticum urartu</i>	C82, C84
107	<i>ATPasa Obg 1</i>	356555899	<i>Glycine max</i>	S80, S82
108	<i>Proteína con dominio PAM (PCI/PINT) isoforma 1</i>	508723210	<i>Theobroma cacao</i>	S82
109	<i>Factor de liberación de péptido eRF subunidad 1</i>	332643666	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80, C82, C83 S81, S83
110	<i>Peroxidasa 1</i>	474261569	<i>Triticum urartu</i>	S80, S81, S82, S84, S85
111	<i>Acarreador de fosfatos, mitocondrial</i>	475432642	<i>Aegilops tauschii</i>	S81, S82, S83, S84, S85
112	<i>Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1</i>	482551974	<i>Theobroma cacao</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81, S82, S83, S84
113	<i>Cinasa de Fosfoglicerato isoforma 1</i>	508722207	<i>Theobroma cacao</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
114	<i>Fosfolipasa D delta isoforma 1</i>	508698840	<i>Theobroma cacao</i>	C83, C85 S80, S82, S83, S84
115	<i>Transportador de fósforo</i>	402768974	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
116	<i>Proteína intrínseca de membrana PIP1.2, parcial</i>	378408541	<i>Helianthemum almeriense</i>	S82, S85
117	<i>ATPasa de la membrana plasmática</i>	474262528	<i>Triticum urartu</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
118	<i>H⁺-ATPasa</i>	411107728	<i>Sesuvium portulacastrum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
119	<i>ATPasa transportadora de protones de la membrana plasmática</i>	413919779	<i>Zea mays</i>	C80, C81, C82, C83, C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
120	<i>Proteína resistente a drogas pleiotrópicas (PDR) 12</i>	508784154	<i>Theobroma cacao</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
121	<i>Subunidad 6A regulatoria del proteosoma 26S homologo</i>	449454065	<i>Cucumis sativus</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85

	A			S80, S81,S82,S83,S84,S85
122	Subunidad regulatoria S10B del proteosoma 26S homologo B	449469943	<i>Cucumis sativus</i>	C81, C83, C84, C85 S81, S82, S83, S84, S85
123	Subunidad regulatoria 2 1A del proteosoma 26S	470134514	<i>Fragaria vesca</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
124	Subunidad regulatoria homologa 4 isoforma X1 del proteosoma 26S	356496629	<i>Glycine max</i>	C80, C81, C82, C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
125	Subunidad regulatoria homologa 6 del proteosoma 26S	645268195	<i>Prunus mume</i>	C85 S81, S82, S84
126	Subunidad regulatoria homologa 4 A del proteosoma 26S	460393572	<i>Solanum lycopersicum</i>	C83 S84
127	Proteína ribosomal S3-3-40S	449446618	<i>Cucumis sativus</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
128	Proteína ribosomal S3a-40S	449432676	<i>Cucumis sativus</i>	S82
129	Proteína ribosomal S4-2-40S	502097516	<i>Cicer arietinum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
130	Proteína ribosomal S5-40S	356530665	<i>Glycine max</i>	C80, C82, C83, C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
131	Proteína ribosomal S6-40S	449431994	<i>Cucumis sativus</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
132	Proteína ribosomal S8-40S	645232269	<i>Prunus mume</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
133	Proteína ribosomal L12-60S	470110623	<i>Fragaria vesca</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
134	Proteína ribosomal L15-60S	460382348	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80, C81, C82, C83, C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
135	Proteína ribosomal L18-2-60S	460403860	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
136	Proteína ribosomal L18a-60S	449459356	<i>Cucumis sativus</i>	S80, S83
137	Proteína ribosomal L24-60S	357124341	<i>Brachypodium distachyon</i>	C80, C81, C82, C83 S80, S83, S85
138	Proteína ribosomal L30-60S	356536572	<i>Glycine max</i>	S84, S85
139	Proteína ribosomal L37-3-60S	449465274	<i>Cucumis sativus</i>	C81, C83
140	Proteína ribosomal L7-3-60S	565388349	<i>Solanum tuberosum</i>	C83, C85
141	6-Fosfofructocinasa 6	645274689	<i>Prunus mume</i>	C80, C81, C82, C83, C84 S81, S82, S83, S84

142	<i>Transportador ABC familia B miembro 15</i>	460372885	<i>Solanum lycopersicum</i>	C81, C82, C83, C84, C85 S80, S81, S82, S83, S84, S85
143	<i>Transportador ABC familia C miembro 4</i>	460403906	<i>Solanum lycopersicum</i>	C82, C83
144	<i>Transportador ABC familia F miembro 4</i>	449468287	<i>Cucumis sativus</i>	C85
145	<i>Actina-1 isoforma X1</i>	514749793	<i>Setaria italica</i>	S80, S82, S84, S85
146	<i>Acilo-CoA deshidrogenasa miembro 10</i>	514737074	<i>Setaria italica</i>	S82
147	<i>Cinasa de adenosina 2 isoforma X2</i>	670375784	<i>Zea mays</i>	S81, S82, S83, S85
148	<i>Acarreador de ADP,ATP 1, mitocondrial isoforma X1</i>	502157936	<i>Cicer arietinum</i>	C80, C81, C82, C83, C84, C85 S80, S81, S82, S83, S84, S85
149	<i>Acarreador de ADP,ATP 3, mitocondrial</i>	502144043	<i>Cicer arietinum</i>	C81, C82, C83, C84 S82
150	<i>Complejo AP-1 subunidad mu-1-I</i>	645230316	<i>Fragaria vesca</i>	C81, C83, C85 S84
151	<i>Complejo AP-2 subunidad alfa-2</i>	470115728	<i>Fragaria vesca</i>	C84 S81
152	<i>Complejo AP-2 subunidad mu</i>	460397973	<i>Solanum lycopersicum</i>	C81, C83
153	<i>Proteinasa Aspártica</i>	460373787	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80, C81, C82, C83, C85 S80, S81, S82, S83, S84, S85
154	<i>ATP sintasa subunidad beta, mitocondrial</i>	470127183	<i>Fragaria vesca</i>	C80, C81, C82, C83, C84, C85 S80, S81, S82, S83, S84, S85
155	<i>ATP sintasa subunidad d, mitocondrial</i>	449449330	<i>Cucumis sativus</i>	C80, C81, C82, C83, C84, C85 S80, S81, S82, S83, S84, S85
156	<i>ATPasa familia AAA con dominio 3-B</i>	460379071	<i>Solanum lycopersicum</i>	C83, C85 S81
157	<i>Proteasa Clp dependiente de ATP clpA homologo CD4B</i>	460413829	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80, C81, C82, C83, C85
158	<i>Metaloproteasa de Zn dependiente de ATP FTSH 10, mitocondrial</i>	449450744	<i>Cucumis sativus</i>	C83, C84, C85 S81, S83
159	<i>Proteína bifuncional resistente a polimixina ArnA</i>	460391381	<i>Solanum lycopersicum</i>	S81, S84
160	<i>Intercambiador 2 de nucleótidos de guanina sensible a Brefeldina A</i>	502104766	<i>Cicer arietinum</i>	C83, C85 S85
161	<i>Cinasa dependiente de calcio 9</i>	502099145	<i>Cicer arietinum</i>	S84
162	<i>ATPasa transportadora de calcio 2</i>	460375325	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80, C82, C83, C85 S82
163	<i>Homólogo de calnexina</i>	514801161	<i>Setaria italica</i>	C80, C81, C82, C83 S80, S85

164	<i>Calreticulina</i>	470132760	<i>Fragaria vesca</i>	C82 S81
165	<i>Antiportador de Cationes/H⁽⁺⁾ 18</i>	449457684	<i>Cucumis sativus</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85
167	<i>Sintasa de citrato</i>	449475005	<i>Cucumis sativus</i>	C80, C81, C82 S80, S81, S85
168	<i>Cadena pesada de Clatrina 1</i>	470143989	<i>Fragaria vesca</i>	C82, C83, C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
169	<i>Cadena pesada de Clatrina 1</i>	460390626	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80, C81, C82, C83, C85 S80, S81, S82, S83, S84
170	<i>Coatómero subunidad alfa-1</i>	449461607	<i>Cucumis sativus</i>	C80, C82, C83, C85 S81, S82, S84
171	<i>Coatómero subunidad alfa-1</i>	470129244	<i>Fragaria vesca</i>	C80, C81, C82 S81, S85
172	<i>Coatómero subunidad beta-1</i>	449461669	<i>Cucumis sativus</i>	C83
173	<i>Coatómero subunidad beta'-2</i>	460413932	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
174	<i>Coatómero subunidad gama-2</i>	460370036	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
175	<i>D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa cloroplástica</i>	470136523	<i>Fragaria vesca</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
176	<i>RNA helicase dependiente de ATP 52C</i>	502135084	<i>Cicer arietinum</i>	C81, C82, C83, C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
177	<i>RNA helicase con caja DEAD dependiente de ATP 8</i>	449432163	<i>Cucumis sativus</i>	C81, C82, C83, C85 S81, S84
178	<i>Delta(24)-esterol reductasa</i>	470123483	<i>Fragaria vesca</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
179	<i>Cinasa jota de diacil-glicerol</i>	460405360	<i>Solanum lycopersicum</i>	C81, C82, C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
180	<i>Proteína inducible por daño del DNA 1</i>	470117505	<i>Fragaria vesca</i>	C82 S81, S82, s83
181	<i>DnaJ subfamilia C GRV2</i>	460398613	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80, C81, C83
182	<i>Dolichil- difosfo- Oligosacárido- Glico-Transferasa subunidad STT3A</i>	460412482	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80
183	<i>Proteína con dominio DUF21 At4g14240</i>	670431003	<i>Cucumis sativus</i>	C82
184	<i>Ubiquitin ligasa E3 UPL2</i>	449470076	<i>Cucumis sativus</i>	C80, C81, C82, C83, C85 S81, S82, S84

185	<i>Factor de Elongación 1-alfa</i>	645217142	<i>Prunus mume</i>	C80 S83
186	<i>Homologo endoplásmico</i>	514768357	<i>Setaria italica</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
187	<i>Factor eucarionte de iniciación 4A-2</i>	460399092	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80, C81, C82, C83, C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
188	<i>Factor de liberación de péptidos con unión a GTP subunidad ERF3A</i>	514800345	<i>Setaria italica</i>	C80, C81, C82, C83 S82, s83
189	<i>Factor de iniciación de la traducción 2 subunidad alfa</i>	462414717	<i>Prunus mume</i>	C84, C85 S81, S82, S83, S85
190	<i>Factor de iniciación de la traducción 3 subunidad A</i>	470132798	<i>Fragaria vesca</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
191	<i>Factor de iniciación de la traducción 3 subunidad B</i>	645222995	<i>Prunus mume</i>	C83 S80
192	<i>Factor de iniciación de la traducción 3 subunidad D</i>	502077934	<i>Cicer arietinum</i>	C82 S84
193	<i>Factor de iniciación de la traducción 3 subunidad E</i>	449449799	<i>Cucumis sativus</i>	C81, C82, C83 S81, S82, S84, S85
194	<i>Factor de iniciación de la traducción 3 subunidad H</i>	460405059	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
195	<i>Flavo Proteína WrbA</i>	502084173	<i>Cicer arietinum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
196	<i>Fructosa-bifosfatasa aldolasa isozima citoplasmática</i>	645272212	<i>Prunus mume</i>	S83, S84
197	<i>Anhidrasa carbónica gama 1, mitocondrial</i>	449457524	<i>Cucumis sativus</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
198	<i>Anhidrasa carbónica gama 2, mitocondrial</i>	449520511	<i>Cucumis sativus</i>	C83, C84, C85 S83
199	<i>Anhidrasa carbónica gama 2, mitocondrial</i>	460377054	<i>Solanum lycopersicum</i>	C85
200	<i>Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa, isoforma 1 citoplasmática</i>	460371960	<i>Solanum lycopersicum</i>	C81, C83, C85 S80, S82, S84, S85
201	<i>Glutamato descarboxilasa 1</i>	645243312	<i>Prunus mume</i>	C83, C84, C85
202	<i>Sintasa de glutamina</i>	460409536	<i>Solanum lycopersicum</i>	S85
203	<i>Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa isoforma 1</i>	449441394	<i>Cucumis sativus</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
204	<i>Proteína de unión a GTP SAR1A</i>	460389872	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85

205	Complejo de ribo núcleo-Proteína H/ACA subunidad 4, parcial	449439649	<i>Cucumis sativus</i>	S82
206	Proteína de choque térmico 15	460413941	<i>Solanum lycopersicum</i>	S80, S81
207	Proteína de choque térmico 80	502129011	<i>Cicer arietinum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
208	Proteína de choque térmico 80	470117509	<i>Fragaria vesca</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
209	Importina subunidad alfa-1a	460366235	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81, S82, S83, S84, S85
210	Importina subunidad beta-1	460391038	<i>Solanum lycopersicum</i>	C82 S82
211	Proteína de unión a intrones	514818961	<i>Setaria italica</i>	C83
212	Cinasa de serinas/treoninas BAM1	502160581	<i>Cicer arietinum</i>	C84, C85 S82
213	Oxidasa de L-gulonolactona	514794292	<i>Setaria italica</i>	S82, S83,S84
214	ATPasa 4 de la membrana plasmática (Proteína de baja calidad)	449499538	<i>Cucumis sativus</i>	C83, C85 S81, S82, S84
215	Proteína de unión a calcio CML49 (Proteína de baja calidad)	502179096	<i>Cicer arietinum</i>	C84 S82
216	Pirofosfatasa del tonoplasto (Proteína de baja calidad)	470101604	<i>Fragaria vesca</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
217	Proteína inhibitoria de F_1F_0 -ATPasa	226533090	<i>Brachypodium distachyon</i>	C85
218	Proteína de unión a esteroides de membrana 2	460377193	<i>Solanum lycopersicum</i>	C83, C84, C85 S80, S84
219	Porina de la membrana externa de la mitocondria	460364985	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80, C81, C82, C84, C85 S82, S85
220	Rho GTPasa 1	449442827	<i>Cucumis sativus</i>	S84
221	Peptidasa procesadora mitocondrial subunidad alfa	460412524	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
222	Oxidasa de mono cobre SKU-5	502175770	<i>Cicer arietinum</i>	S80, S83, S84, S85
223	NAD(P)H deshidrogenasa B1	460395490	<i>Solanum lycopersicum</i>	C84
224	NADH deshidrogenasa [ubiquinona] 1 alfa subunidad 9	502114798	<i>Cicer arietinum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
225	NADH deshidrogenasa [ubiquinona] Hierro-Azufre 1	470104382	<i>Fragaria vesca</i>	C84, C85
226	Subunidad Alfa 1 del complejo asociado a péptidos	645251261	<i>Prunus mume</i>	C82, C85

	<i>nacientes</i>			
227	<i>Glucosidasa neutral AB- α</i>	502137140	<i>Cicer arietinum</i>	S84
228	<i>Nicalina</i>	449443466	<i>Cucumis sativus</i>	S80
229	<i>Proteína Niemann-Pick C1</i>	502100128	<i>Cicer arietinum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
230	<i>Fosfolipasa no especifica C4</i>	573961731	<i>Oryza brachyantha</i>	C85 S80, S82, S83
231	<i>Proteína ensambladora del nucleosoma 1 isoforma 1</i>	460412576	<i>Solanum lycopersicum</i>	C82, C83
232	<i>Proteína de la membrana externa A</i>	449470698	<i>Cucumis sativus</i>	C80 S80
233	<i>Patellin-3</i>	470127731	<i>Fragaria vesca</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
234	<i>Peroxidasa 72</i>	502161212	<i>Cicer arietinum</i>	C81 S81, S84
235	<i>Fosfo-2-dehidro-3-deoxiheptona aldolasa 1</i>	645224901	<i>Prunus mume</i>	S82
236	<i>ATPasa 4 de la membrana plasmática</i>	502150272	<i>Cicer arietinum</i>	C81, C84
237	<i>ATPasa 4 de la membrana plasmática</i>	460394639	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S83, S84, S85
238	<i>Proteína de unión a poliadenilato 2</i>	502143621	<i>Cicer arietinum</i>	C82
239	<i>Transportador de potasio 4</i>	460413195	<i>Solanum lycopersicum</i>	S82
240	<i>Factor de procesamiento de Pre-mRNA- 8 (splicing)</i>	460394467	<i>Solanum lycopersicum</i>	C82, C83, C85
241	<i>Alfa,alfa-trehalosa-fosfato sintasa [formadora de UDP] 7</i>	645237488	<i>Prunus mume</i>	C83
242	<i>Acuaporina PIP1-2 isoforma 1</i>	460379004	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80, C81, C84, C85 S83, S84, S85
243	<i>Acuaporina PIP1-4</i>	645255944	<i>Prunus mume</i>	C80, C81, C83 S83, S84, S85
244	<i>Acuaporina PIP1-4-like</i>	470142145	<i>Fragaria vesca</i>	S83, S84
245	<i>Importina-7</i>	460405063	<i>Solanum lycopersicum</i>	C81, C85
246	<i>Cinasa inactiva de serina/treonina scy1 isoforma X1</i>	502116666	<i>Cicer arietinum</i>	C85
247	<i>Receptor LRR de cinasa de serina/treonina At1g56130</i>	460396832	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
248	<i>Metiltransferasa PMT2 isoforma X1</i>	502093761	<i>Cicer arietinum</i>	C83
249	<i>Peptidasa mitocondrial subunidad beta</i>	449438845	<i>Cucumis sativus</i>	C80, C82, C83, C84, C85 S82, S83, S85

250	<i>NADH deshidrogenasa [ubiquinona] 1 alfa subunidad 5, mitocondrial</i>	449445977	<i>Cucumis sativus</i>	C82, C83, C84, C85 S85
251	<i>Proteína nuclear 5-2</i>	645222439	<i>Prunus mume</i>	C83
252	<i>Fosfatasa 2C 9</i>	645263753	<i>Prunus mume</i>	C80, C82, C83, C85 S81, S82, S83, S84, S85
253	<i>Enzima biosintética de 1 Ramosa</i>	449438897	<i>Cucumis sativus</i>	S82, S84
254	<i>UDP-glucosa 6-deshidrogenasa 1</i>	460372721	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80, C81, C83, C85 S82, S83, S84, S85
255	<i>Receptor de cinasa inactivo con repetido de IMK2-like</i>	449457446	<i>Cucumis sativus</i>	S84
256	<i>Subunidad beta 6 del proteosoma</i>	356507848	<i>Glycine max</i>	C80, C81, C82, C85 S81, S83, S84, S85
257	<i>Proteína defectiva de pelos de la raíz 3</i>	645244130	<i>Fragaria vesca</i>	C81, C82, C83, C85
258	<i>Proteína transportadora de proteínas parecida a SEC23</i>	449459830	<i>Cucumis sativus</i>	C80, C81, C83, C85 S80, S81, S82, S83, S84, S85
259	<i>Proteína transportadora de Proteínas parecida a Sec24</i>	470138380	<i>Fragaria vesca</i>	C82, C85 S81, S84, S85
260	<i>Proteína transportadora de Proteínas Sec61 subunidad alfa</i>	460405545	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80, C81, C82, C83, C84 S85
261	<i>Acarreador Mitocondrial de 2-oxoglutarato/malato</i>	449463851	<i>Cucumis sativus</i>	C80, C81, C82, C83, C84, C85 S80, S81, S82, S83, S84, S85
263	<i>Piruvato cinasa, isozima citoplasmática</i>	449451092	<i>Cucumis sativus</i>	S80, S81, S82, S83, S84, S85
263	<i>Proteína relacionada a Ras parecida a RABA1f</i>	470115454	<i>Fragaria vesca</i>	C80, C81, C82, C83, C84, C85 S80, S81, S82, S83, S84, S85
264	<i>Proteína relacionada a Ras parecida a RABA2a</i>	460369176	<i>Solanum lycopersicum</i>	S82, S83
265	<i>Proteína relacionada a Ras parecida a RABG3f isoforma 1</i>	460370214	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80, C81, C82, C83, C84, C85 S80, S81, S82, S83, S84, S85
266	<i>Receptor de cinasa parecida a HERK 1</i>	514743104	<i>Setaria italica</i>	C82, C85 S83, S84
267	<i>Receptor de Rhicadhesina</i>	502112964	<i>Cicer arietinum</i>	C82, C83 S82, S83, S85
268	<i>Factor de splicing rico en Serina/arginina RSZ22</i>	449437054	<i>Cucumis sativus</i>	C80, C81, C82, C83, C85 S82, S84, S85
269	<i>Cinasa de Serina/treonina HT1</i>	470137717	<i>Fragaria vesca</i>	C80, C84 S84, S85
270	<i>Cinasa de Serina/treonina SnRK2A</i>	645223282	<i>Prunus mume</i>	C80, C81, C82, C85 S80, S81, S82

271	<i>Proteína específica de tallo parecida a TSJT1</i>	460404279	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80
272	<i>Succinato deshidrogenasa [ubiquinona] hierro-azufre, subunidad 2, mitocondrial</i>	502161129	<i>Prunus mume</i>	C81, C81
273	<i>Proteína del complejo T 1 subunidad beta isoforma X1</i>	502104044	<i>Cicer arietinum</i>	C80, C81, C83, C85 S80, S81, S82, S83, S84, S85
274	<i>Proteína del complejo T 1 subunidad beta isoforma X1</i>	514773950	<i>Setaria italica</i>	C83, C85 S82, S85
275	<i>Proteína del complejo T 1 subunidad delta</i>	645269890	<i>Prunus mume</i>	C80, C82, C83, C84, C85 S80, S81, S82, S83, S84, S85
276	<i>Proteína del complejo T 1 subunidad épsilon</i>	460386958	<i>Solanum lycopersicum</i>	S81, S85
277	<i>Proteína del complejo T 1 subunidad gama</i>	502162879	<i>Cicer arietinum</i>	C80, C81, C82, C83, C84, C85 S80, S81, S82, S83, S84, S85
278	<i>Tiosulfato/3-mercaptopiruvato sulfurotransferasa 1, mitocondrial</i>	645239442	<i>Prunus mume</i>	S82
279	<i>Activador traduccional GCN1</i>	460383601	<i>Solanum lycopersicum</i>	C83
280	<i>Proteína de translocación homologa a SEC63</i>	670445693	<i>Setaria italica</i>	C82 S82, S83, S84
281	<i>Proteína Transmembrana super familia 9 miembro 3</i>	645223285	<i>Fragaria vesca</i>	C81, C83, C85 S81, S82, S83, S84
282	<i>Proteína Transmembrana super familia 9 miembro 4</i>	502151345	<i>Cicer arietinum</i>	C82
283	<i>Hidrolasa de Ubiquitina carboxilo-terminal 12</i>	470118005	<i>Fragaria vesca</i>	C83
284	<i>Proteína ribosomal S27a Ubiquitin-40S</i>	460415200	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80, C81, C82, C83, C84, C85 S80, S81, S82, S83, S84, S85
285	<i>Descarboxilasa de UDP-Acido glucúronico</i>	460403888	<i>Solanum lycopersicum</i>	C83
286	<i>Proteína no caracterizada LOC101267991</i>	460387332	<i>Solanum lycopersicum</i>	C83, C85 S84
287	<i>Receptor vacuolar de clasificación (VSR) 3</i>	470106922	<i>Fragaria vesca</i>	C80, C81, C82, C83, C84, C85 S80, S81, S82, S83, S84, S85
288	<i>Ligasa de Valina t-RNA</i>	645257188	<i>Prunus mume</i>	S81, S84
289	<i>ATPasa tipo V subunidad B 1</i>	514766662	<i>Setaria italica</i>	C80, C81, C82, C83, C84, C85 S80, S81, S82, S83, S84, S85
290	<i>ATPasa tipo V subunidad H</i>	658016951	<i>Malus domestica</i>	C83, C85 S80, S81, S82, S83, S84, S85
291	<i>Fructoquinasa-1</i>	15224669	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80, C81, C82, C83, C84 S80, S81, S82, S83, S84, S85
292	<i>Proteína activadora del Proteasoma 200 isoforma 1</i>	508719960	<i>Theobroma cacao</i>	C82, C83, C85

293	<i>Cinasa Pto interactor 1</i>	527191513	<i>Genlisea aurea</i>	S81, S83, S84 C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
294	<i>Proteína ribosomal S9 40S ribosomal</i>	413968518	<i>Solanum tuberosum</i>	S80
295	<i>Factor de Elongación Tu</i>	15236220	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
296	<i>Glicerofosforil diester fosfodiesterasa 1</i>	474317218	<i>Triticum urartu</i>	S84, S85
297	<i>Receptor LRR de cinasa de serina/treonina</i>	475562665	<i>Aegilops tauschii</i>	S85
298	<i>Proteína con repetición TPR</i>	590593866	<i>Morus notabilis</i>	C84 S80, S83, S85
299	<i>Factor alfa de inhibición de la disociación de Rab GDP</i>	525313536	<i>Cicer arietinum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S83, S84
300	<i>RAB GTPasa homologo B1C</i>	15235981	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
301	<i>Proteína ARAC 1 parecida a Rac de unión a GTP</i>	145328750	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C82 S81, S83, S85
302	<i>Proteína 14-3-3 9</i>	26454611	<i>Solanum lycopersicum</i>	C81, C82, C83, C84, C85 S81, S82, S83, S84
303	<i>Proteína 14-3-3</i>	5902676	<i>Helianthus annus</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
304	<i>Proteína 14-3-3 D</i>	3912949	<i>Nicotiana tabacum</i>	C81, C82, C83, C84, C85 S80, S83, S85
305	<i>Proteína 14-3-3</i>	3023187	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
306	<i>2,3-bifosfoglicerato mutasa, independiente</i>	3914394	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
307	<i>Proteína ribosomal S11 40S</i>	1173223	<i>Glycine max</i>	S80, S81, S83
308	<i>Proteína ribosomal S14-3 40S</i>	645218145	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
309	<i>5-metiltetrahydropteroltriglutamato- homocisteinasa-S-metiltransferasa</i>	8134568	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
310	<i>Proteína ribosomal acida P0 60S</i>	1710587	<i>Glycine max</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81, S82, S83, S85
311	<i>Proteína ribosomal L11 60S</i>	122169427	<i>Oryza sativa</i>	C85 S84, S85
312	<i>Proteína ribosomal L23a 60S</i>	356568957	<i>Glycine max</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85

313	<i>Proteína ribosomal L26-1 60S</i>	658000815	<i>Malus domestica</i>	S80, S81,S82,S83,S84,S85 C80, C81, C83, C85
314	<i>Proteína ribosomal L5-1 60S</i>	12222375	<i>Oryza sativa</i>	S80, S81,S82,S83,S84,S85 C80, C81, C82
315	<i>Proteína ribosomal L6 60S</i>	464621	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	S80, S81, S82, S83, S84 C80,C81,C82,C83,C84,C85
316	<i>Proteína ribosomal L8 60S</i>	266944	<i>Solanum lycopersicum</i>	S80, S81,S82,S83,S84,S85
317	<i>Actina-1</i>	231495	<i>Pisum sativum</i>	C81 S80, S84, S85
318	<i>Actina-1</i>	122246802	<i>Oryza sativa</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
319	<i>Hidrolasa de S-adenosil-L-homocisteina</i>	6094228	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
320	<i>Cinasa de adenilato B</i>	585338	<i>Oryza sativa</i>	C84 S82, S83, S85
321	<i>ATP sintasa subunidad 9</i>	114506	<i>Triticum aestivum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
322	<i>ATP sintasa subunidad alfa, mitocondrial</i>	114408	<i>Oenothera biennis</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
323	<i>ATP sintasa subunidad beta, mitocondrial</i>	114421	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
324	<i>ATP sintasa subunidad gama, mitocondrial</i>	543867	<i>Ipomoea batatas</i>	C80, C84
325	<i>Calmodulina</i>	122063219	<i>Triticum aestivum</i>	C80, C82, C83, C84, C85 S81, S82, S83, S84, S85
326	<i>Catalasa isozima1</i>	1345676	<i>Ricinus communis</i>	S80, S82, S83
327	<i>Clatrina cadena pesada 1</i>	122232855	<i>Oryza sativa</i>	C81 S80
328	<i>Clatrina cadena pesada 1</i>	30681617	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
329	<i>Delta-1-pirrilidona-5-carboxilato sintasa</i>	6225818	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
330	<i>DnaJ homologo ANJ1</i>	1169384	<i>Atriplex nummularia</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
331	<i>Dinamina-2B</i>	645264556	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85

332	<i>Factor de elongación 2</i>	6015065	<i>Beta vulgaris</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
333	<i>Enolasa</i>	3023714	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
334	<i>Factor de iniciación de la traducción 5A-2</i>	124226	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	C80,C82,C83,C85 S80,S81,S82,S83,S84,S85
335	<i>Fructosa-bifosfatasa aldolasa, isozima citoplasmática</i>	113624	<i>Spinacia oleracea</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
336	<i>Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, citosólica</i>	120671	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
337	<i>Ran-3 nuclear de unión a GTP</i>	514779286	<i>Setaria italica</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
338	<i>Subunidad beta-2 de Proteína de unión a nucleótidos de Guanina</i>	3023839	<i>Nicotiana tabacum</i>	C82, C83, C85 S84, S85
339	<i>Subunidad beta de Proteína de unión a nucleótidos de Guanina</i>	3023847	<i>Medicago sativa</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
340	<i>Histona H2B.6</i>	152032518	<i>Oryza sativa</i>	C80, C81, C82, C83, C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
341	<i>Isocitrato deshidrogenasa [NADP]</i>	2497259	<i>Medicago sativa</i>	C84 S81, S82, S83
342	<i>Proteína de unión luminal 4</i>	729620	<i>Nicotiana tabacum</i>	C80, C81, C82, C83, C84
343	<i>Proteína de unión luminal</i>	3913786	<i>Spinacia oleracea</i>	C80, C81, C82, C83, C84, C85 S80, S81, S82, S83, S84, S85
344	<i>Malato deshidrogenasa, citoplasmática</i>	12229778	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	C80, C81,C82,C83,C84 S80, S81,S83, S84,S85
345	<i>Reductasa de monodehidroascorbato</i>	50400859	<i>Cucumis sativus</i>	C85 S80, S81, S82, S83
346	<i>NADH deshidrogenasa [ubiquinona] hierro-azufre 1, mitocondrial</i>	3122572	<i>Solanum tuberosum</i>	C81, C82, C84, C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
347	<i>NADH-ubiquinona oxidoreductasa cadena 1</i>	266671	<i>Triticum aestivum</i>	C85 S82
348	<i>Cinasa de nucleosidos difosfato 1</i>	6225750	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	C80, C83, C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
349	<i>Fosfoenolpiruvato carboxilasa 2</i>	115581	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
350	<i>Fosfo glucomutasa, citoplasmática</i>	12585308	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	S82

351	<i>Proteína resistente a drogas pleiotrópicas 1</i>	75326590	<i>Nicotiana tabacum</i>	C83, C84, C85
352	<i>Histona H2A.6</i>	195605264	<i>Zea mays</i>	C83, C85 S80, S81, S82, S84, S85
353	<i>Receptor de cinasa con dominio tipo L-lectina S.5</i>	460374962	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
354	<i>Metiltransferasa PMT8</i>	645260064	<i>Prunus mume</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
355	<i>Peroxidasa de glutatión de fosfolípidos hidroperoxidados</i>	20138384	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	C83
356	<i>Piruvato cinasa, isozima citoplásmica</i>	125606	<i>Solanum tuberosum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
357	<i>Proteína relacionada a Ras RAB1BV</i>	3024527	<i>Beta vulgaris</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
358	<i>S-adenosilmetionina sintasa</i>	585786	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
359	<i>Aminopropil transferasa de Putrescina</i>	6094336	<i>Nicotiana sylvestris</i>	C81, C83, C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
360	<i>Superóxido dismutasa [Cu-Zn] 1</i>	3334334	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	S82
361	<i>Proteína del complejo T1 subunidad alfa</i>	135535	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C82 S82, S83
362	<i>Tiorredoxina 1 tipo H</i>	267124	<i>Nicotiana tabacum</i>	C80, C81, C83, C85 S80, S82, S84, S85
363	<i>Trans-cinamato 4-mono-oxigenasa</i>	3915089	<i>Populus sieboldii x Populus grandidentata</i>	C82, C85
364	<i>Tubulina cadena alfa-1</i>	54036494	<i>Gossypium hirsutum</i>	C85 S81, S84
365	<i>Tubulina cadena beta-7</i>	73920810	<i>Oryza sativa</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
366	<i>Enzima E1 1 activadora de ubiquitina isoforma X1</i>	645215498	<i>Prunus mume</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
367	<i>ATPasa tipo V subunidad E</i>	3334410	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
368	<i>Partícula reguladora triple-A 1A</i>	508780159	<i>Theobroma cacao</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
369	<i>Partícula reguladora triple-A ATPasa 3</i>	15237159	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85

370	<i>Proteína ribosomal familia L16p/L10e</i>	571441242	<i>Theobroma cacao</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
371	<i>Proteína ribosomal L3</i>	350539715	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
372	<i>Proteína ribosomal S5/ Factor de Elongación G/III/V</i>	508721863	<i>Theobroma cacao</i>	C80, C81, C82 S80, S81, S82, S84, S85
373	<i>Proteína parecida a SAR</i>	226496333	<i>Zea mays</i>	C83, C84 S84, S85
374	<i>Sec23/Sec24</i>	15229489	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C82
375	<i>Serina hidroximetiltransferasa 2</i>	351723969	<i>Glycine max</i>	C80, C83 S80, S81,S82,S83,S84,S85
376	<i>Inhibidor de proteasas de serina (SERPIN)</i>	508722701	<i>Theobroma cacao</i>	C83 S85
377	<i>Fosfatasa de Serina/treonina 2A subunidad regulatoria A isoforma beta</i>	645276249	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
378	<i>Proteína con dominio SH3</i>	297835892	<i>Arabidopsis lyrata</i>	C83
379	<i>Proteína con dominio SH3 isoforma 3</i>	590582505	<i>Theobroma cacao</i>	C81, C85 S81
380	<i>Proteína de respuesta a estrés</i>	108707932	<i>Zea mays</i>	S81, S82, S84, S85
381	<i>Succinato deshidrogenasa1-1 isoforma 1</i>	508699218	<i>Theobroma cacao</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
382	<i>Sacarosa sintasa</i>	351723161	<i>Glycine max</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
383	<i>Proteína del complejo T- 1 subunidad theta</i>	474142427	<i>Triticum urartu</i>	C80, C82, C83, C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
384	<i>Chaperorina TCP-1/cpn60</i>	508700576	<i>Theobroma cacao</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
385	<i>Chaperonina TCP-1/cpn60 isoforma 1</i>	508774228	<i>Theobroma cacao</i>	C80
386	<i>Transaldolasa</i>	350538673	<i>Solanum lycopersicum</i>	C80, C81, C82, C83, C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
387	<i>Transducina con dominio WD40</i>	334185870	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C83
388	<i>Factor de elongación 1 subunidad alfa 2</i>	402234627	<i>Larix kaempferi</i>	C80, C81, C82, C83, C84, C85 S80, S81, S82, S83, S84, S85
389	<i>Translocon de la membrana externa del cloroplasto 75-III</i>	508786709	<i>Theobroma cacao</i>	C80, C81, C82, C83 S82, S83
390	<i>Tubulina cadena alfa-3</i>	255537890	<i>Ricinus communis</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85

391	<i>Tubulina alfa-5</i>	508785029	<i>Theobroma cacao</i>	S80, S81,S82,S83,S84,S85 C80,C81,C82,C83,C84,C85
392	<i>Tubulina cadena beta-5</i>	162462765	<i>Zea mays</i>	S80, S81,S82,S83,S84,S85 C80,C81,C82,C83,C84,C85
393	<i>Tubulina cadena beta-8</i>	18420724	<i>Arabidopsis thaliana</i>	S80, S81,S82,S83,S84,S85 C80,C81,C82,C83,C84,C85
394	<i>Proteasa especifica de Ubiquitina C19</i>	590617189	<i>Theobroma cacao</i>	S80, S81,S82,S83,S84,S85 S81, S83, S84, S85
395	<i>V-ATPasa subunidad C</i>	508711023	<i>Theobroma cacao</i>	C80 S80, S84, S85
396	<i>ATPasa Vacuolar subunidad d</i>	209981405	<i>Vigna radiata</i>	C83, C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
397	<i>Receptor vacuolar de clasificación 13</i>	396924949	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
398	<i>Proteína asociada a vesícula 726</i>	15220315	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C85 S84, S85
399	<i>VHA-A</i>	15219234	<i>Arabidopsis lyrata</i>	C80,C81,C82,C83,C84,C85 S80, S81, S82, S83
400	<i>Villina 2 isoforma 1</i>	508717326	<i>Theobroma cacao</i>	S82
401	<i>Canal de aniones dependiente de voltaje 1</i>	508711479	<i>Theobroma cacao</i>	C80, C81, C82, C85 S80, S81,S82,S83,S84,S85
402	<i>ATPasa tipo V subunidad catalítica A</i>	363806992	<i>Glycine max</i>	C80, C81, C82, C83, C84, C85 S80, S81, S82, S83, S84, S85

7.4 Determinación de las proteínas presentes en cada una de las fracciones por medio un análisis *in silico*.

Uno de los objetivos del trabajo es lograr identificar si las fracciones de vesículas de membrana (C80 a C85 y S80 a S85) que se separaron diferencialmente por EZFL se tratan de un sólo compartimento subcelular o de una mezcla de compartimentos; por ello se decidió evaluar y conocer el número y la identidad de las proteínas presentes en cada fracción, identificar cuáles de estas proteínas son únicas para una sola fracción, cuantas y cuales proteínas están compartidas entre todas las fracciones de una misma condición. Estos datos sirvieron para identificar cuantas y que proteínas estas ubicadas en cada una de las fracciones. Lo cual es importante ya que permitió saber que tan parecidas o diferentes son las fracciones provenientes de una misma condición. Además, ofreció un panorama general de la distribución de las proteínas en cada una de las fracciones. Todos estos datos representaron una primera aproximación para la caracterización de la identidad de la membrana celular o las membranas subcelulares que están presentes en cada una de fracciones en estudio. Es por esto, que a partir de las 402 proteínas identificadas (Tabla 1), se determinó cuáles de estas proteínas estaban en cada una de las fracciones (Tabla 2).

Tabla 2. Número de proteínas identificadas en cada una fracción analizadas por LC-MS/MS.

Número de Fracción	Número de proteínas en ausencia de NaCl (C)	Número de proteínas en presencia de NaCl (Sal)
80	216	213
81	215	238
82	244	258
83	271	257
84	246	237
85	253	254

Se muestra el número de proteínas identificadas en las fracciones 80 a 85 colectadas por EZFL a partir de microsomas aislados de raíces de M. crystallinum crecidas en ausencia o bajo tratamiento con 200 mM de NaCl (Sal).

Además, se determinó para cada condición el número y la identidad de aquellas proteínas que se comparten en todas las fracciones. Esto se realizó a través del software "VennMaster", el cual construye diagramas de Euler (Kestler *et al.*, 2007). Un diagrama Euler representa a cada una de las fracciones de forma proporcional al número de proteínas que la conforman, y conecta a las diferentes fracciones, en relación a la identidad y número de proteínas que comparten una, dos, o todas.

A partir de esto, se encontró que para todas las fracciones provenientes de la condición de ausencia de sal (C80 a C85), se comparten 131 proteínas y para las fracciones de la condición con sal, todas las fracciones (S80 a S85) comparten 156 proteínas. A partir de estos datos se calculó el porcentaje que representan estas proteínas compartidas en el contexto del número total de proteínas identificadas (402). Resultando así que, para la condición de ausencia de sal las proteínas compartidas (Cc) representan un 38% y para la condición con sal las proteínas compartidas (Sc) representan el 45% (Figura 10). Además, con este análisis se logró también conocer cuántas y cuales proteínas son únicas en cada una de las fracciones (Tabla 3). Lo cual es importante ya que nos permitió saber que tan única y particular es cada fracción.

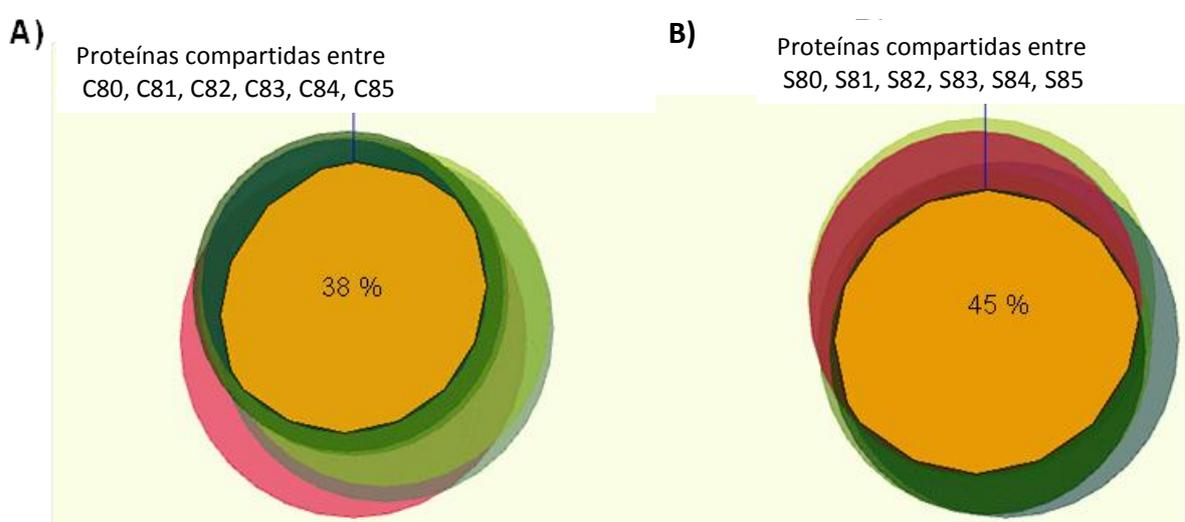


Figura 10. Diagrama de Euler, que muestra el número y el porcentaje de proteínas compartidas en las fracciones 80 a 85. Proteínas compartidas en las fracciones 80 a 85 aisladas por EZFL a partir de microsomas de plantas crecidas en ausencia (A, C) o presencia de 200 mM de NaCl (B, S). Cada fracción se representa con un círculo dentro del diagrama de Euler, siendo el círculo central de color amarillo el que representa a las proteínas que comparten todas las fracciones.

En base a estos resultados se puede observar que las fracciones comparten un 38 y 45% de las proteínas para la condición control y para la condición de sal, respectivamente. Lo cual indica que las fracciones como conjunto no son tan diferentes como para no compartir proteína. También se evaluó el número de proteínas únicas por fracción, en donde se sugirió que si se encontraban un número elevado de proteínas únicas en una fracción dada, eso sería indicativo o sinónimo de una funcionalidad particular y de una identidad diferente al resto de las fracciones. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 3, las proteínas identificadas como únicas en cada una de las fracciones en estudio, no

representan un porcentaje mayor al 10% del total de proteínas identificadas para cada una de las fracciones evaluadas, lo cual no permite ver una diferencia funcional entre fracciones.

Tabla 3. Proteínas identificadas como únicas en cada una de las fracciones analizadas por LC-MS/MS.

Número. de Fracción	Número. y porcentaje de Proteínas Únicas
C80	7 - 3.2%
C81	4 - 1.8%
C82	15 - 6.1%
C83	18 - 8.1%
C84	4 - 2.1%
C85	14 - 5.5%
S80	6 - 2.8%
S81	5 - 2.1%
S82	18 - 6.9%
S83	5 - 2.1%
S84	14 - 5.1%
S85	6 - 2.4%

Datos originados a partir del software VennMaster's (Kestler et al., 2007). El valor porcentual debajo del número de fracción representa el porcentaje de proteínas únicas en esa fracción, en el contexto del 100% del total de proteínas identificadas para esa fracción. El nombre de las proteínas únicas se muestra en la Tabla 1.

A partir de estos análisis también se logró obtener una lista de todas las proteínas presentes en cada una de las fracciones, en las cuales se conocían cuáles eran las proteínas únicas para cada fracción y las proteínas compartidas con el resto de las fracciones y con qué fracciones. Esta información se puede ver reflejada en la última columna de la Tabla 1 que reporta las 402 proteínas identificadas.

7.5 Clasificación funcional de las proteínas identificadas.

Una vez obtenida la lista final de proteínas identificadas (Tabla 1), se procedió a realizar la anotación funcional de las proteínas por medio de la herramienta bioinformática Blast2Go (Conesa et al., 2005; 2008). El programa Blast2Go realiza, una búsqueda por BLAST (por su nombre en inglés: **B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool; Altschul et al., 1990), la cual identifica todas las secuencias homologas a las proteínas identificadas. De este proceso se obtiene de cada identificación, los términos ontológicos o GO (por su nombre en inglés: **G**ene **O**ntology) relacionados a esa secuencia en particular. Con los términos GO de cada secuencia proteica, se puede obtener una clasificación funcional, ya

que en base a un vocabulario controlado y establecido, el Blast2Go conduce a una categorización jerárquica de los GO, que se determina desde tres perspectivas o términos diferentes; i) la función molecular, que describe la actividad bioquímica que realiza el producto génico o proteína. ii) el proceso biológico, que refiere la función celular en la cual participa la proteína y por último, iii) el componente celular, que representa la localización subcelular de la proteína. Cada término se encuentra organizado en niveles jerárquicos, en donde términos generales (padres o nivel 1) son precedentes de términos más específicos (hijos o nivel 2 hasta 15). Por ejemplo, el estroma del cloroplasto (hijo) *es parte del* cloroplasto (padre). Con esta jerarquización se pueden inferir relaciones, pero también se pueden observar particularidades. Es por esto que los términos GO ayudan a anotar las funciones biológicas de las proteínas, además de que, ya que conserva la relación biológica entre los términos, se pueden hacer comparaciones cuantitativas entre los términos GO anotados de un grupo de proteínas de referencia y un grupo de proteínas de interés. Además, los GO incluyen el tipo de evidencia (experimental o computacional) que fue usada para hacer la anotación de la ontología (Li *et al.*, 2007).

La anotación funcional con el Blast2Go de los GO de las 402 proteínas identificadas, identifico 3450 anotaciones funcionales para 390 proteínas. Estas 3450 anotaciones se encuentran desglosadas en función de los tres diferentes términos usados para clasificar las anotaciones de GO: proceso biológico (P), componente celular (C) y función molecular (F). Cada uno de los términos se encuentra dividido en los niveles jerárquico 1 a 15 (Figura 11). Se puede observar una mayor cantidad de anotaciones en el nivel jerárquico 6, para el término P (proceso biológico), 8 para C (componente celular) y 7 para la GO correspondiente a F (función molecular). Algunos de los términos GO encontrados para las proteínas anotadas, en diferentes niveles jerárquicos, se muestran en la Figura 12.

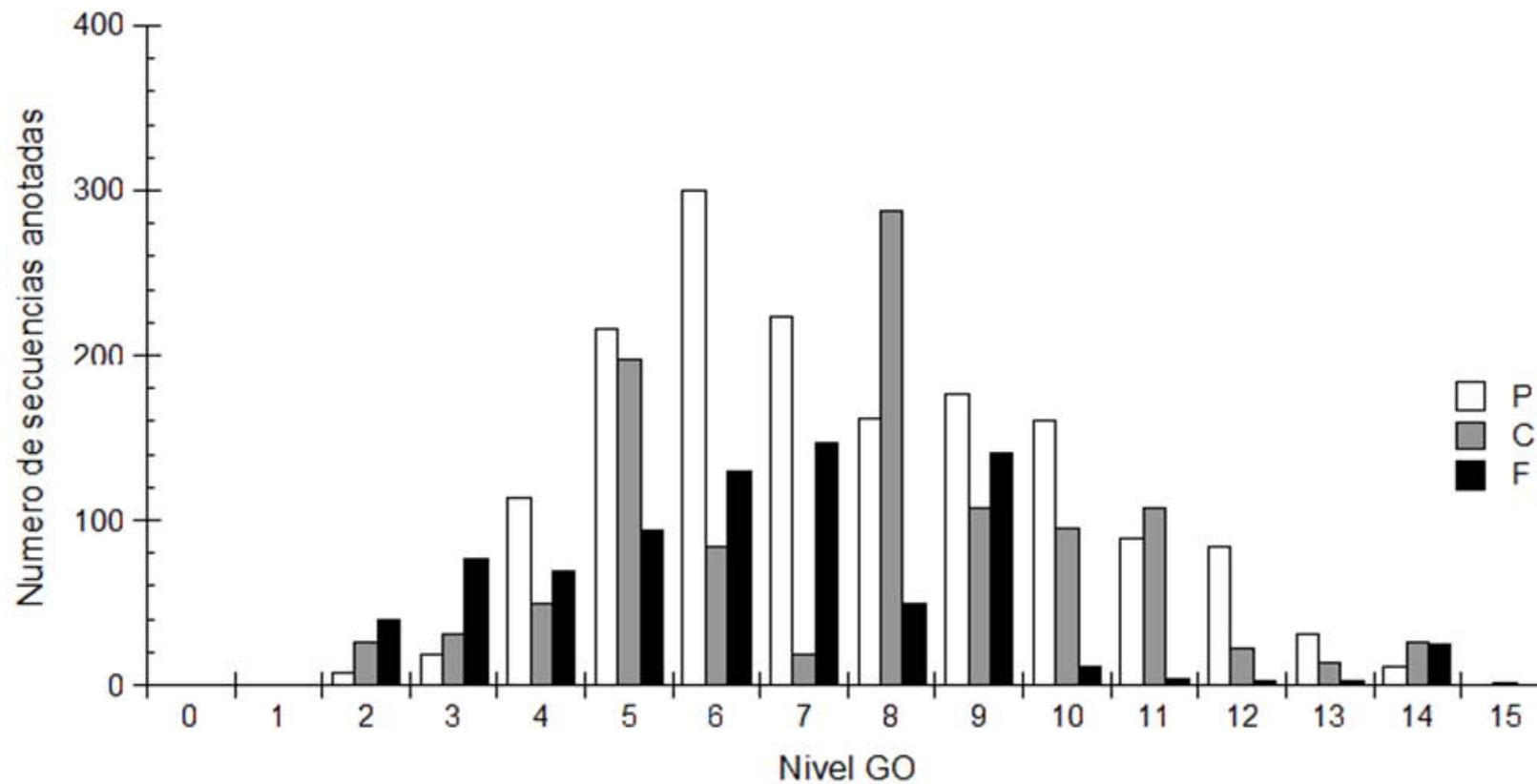


Figura 11. Clasificación de las anotaciones GO identificadas en las 402 secuencias de las proteínas identificadas por LC-MS/MS. Se muestra el número de secuencias anotadas por nivel jerárquico (1 al 15) de los términos GO; (P) proceso biológico, (C;) componente celular y (F) función molecular. Se puede observar que entre los niveles 5, 6, 7 y 8 existe una mayor cobertura de anotaciones.

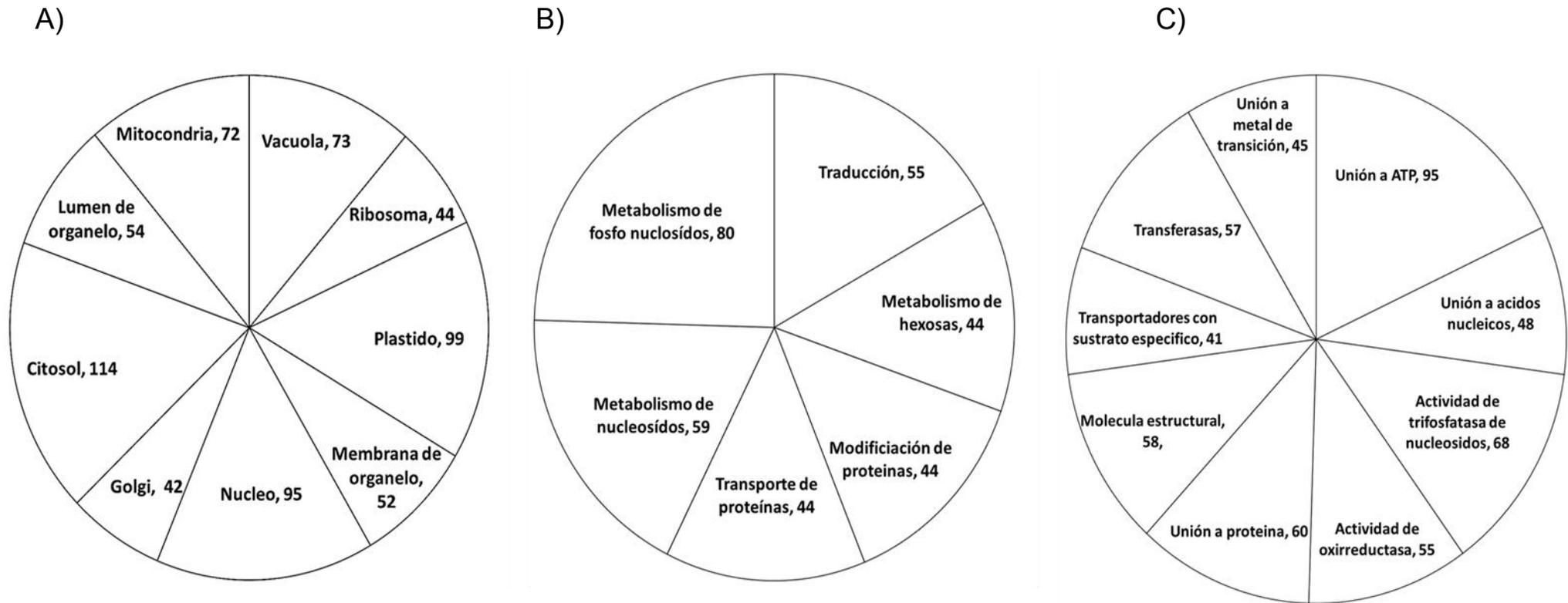


Figura 12. Anotación funcional de las proteínas identificadas por LC-MS/MS. Gráfica tipo pastel que muestran la clasificación basadas en las anotaciones GO. A) Componente celular (Nivel 8), B) Proceso biológico (Nivel 7) y C) Función molecular (Nivel 4) del total de las proteínas identificadas. Las figuras muestran el número de secuencias representadas por cada categoría funcional en el nivel jerárquico especificado.

7.6 Análisis de enriquecimiento de GO, para la evaluar las propiedades funcionales de las proteínas identificadas.

Una proteína puede poseer más de un término GO relacionado a sus características funcionales. Por ejemplo, la AQP *McPIP2;1* se categoriza como una proteína de membrana, pero además posee una actividad de transportador, lo cual le confiere una función molecular específica y una participación dentro de la regulación biológica celular, por ello se le confieren los términos GO específicos de componente celular de membrana (GO:0016020), función molecular de transportador (GO:0005478) y el proceso biológico de transporte (GO: 0006810), entre otros.

Con el fin de entender mejor el perfil funcional de todos los GO que se identificaron en las proteínas anotadas, se realizaron análisis de enriquecimiento de los GO relacionados a Componente Celular (C) y a Proceso Biológico (P) sobre cada una de las fracciones C80-C85 y S80-S85 (Tabla 2). El análisis de enriquecimiento permitió identificar aquellos GO que aparecen más frecuentemente es decir, al momento de comparar un grupo de proteínas de interés anotadas en contra de un grupo de proteínas de referencia anotadas, identificando aquellos términos GO que se encuentra sobre-representados en el grupo de proteínas de interés, respecto al grupo de proteínas de referencia. Los términos GO sobre-representados resultantes, representan aquellos mecanismos celulares y moleculares que delinean la diferencia entre el grupo de proteínas de referencia y de interés. El análisis es significativo, debido a que se utilizan una prueba estadística para validar la importancia del enriquecimiento. La prueba exacta de Fisher, es uno de los métodos más utilizado para validar la significancia de asociación o de contingencia entre los términos GO. El resultado de la prueba origina un *valor-P*, que indica el grado de significancia de dicho GO dentro del grupo de interés (Fisher, 1922). También se realizó el análisis de enriquecimiento sobre el conjunto de proteínas compartidas entre las fracciones C80 a 85 y S80 a 85 (Figura 10), debido a que este análisis permitiría observar que funciones celulares se encuentran también compartidas en este grupo de proteínas, y corrobora funciones significativas dentro del resto de las fracciones individuales. Por último, ayudaría a identificar a aquellos términos GO que están sobre-representados tanto en las fracciones individuales como en las proteínas compartidas entre todas las fracciones. Dado a que conocemos que proteínas se encuentran presentes en cada una de las fracciones (C80 a 85 y S80 a S85), se realizó un análisis de enriquecimiento de GO, en cada una de las fracciones (Tabla 2), así como, sobre el conjunto de proteínas compartidas (Figura 10).

7.6.1 *GO enriquecidos en las fracciones aisladas de plantas crecidas en ausencia de NaCl.* El análisis de enriquecimiento realizado en las fracciones aisladas de plantas crecidas en ausencia de sal; muestra que de la fracción 80 a 83 existe sobre-representación del aparato de Golgi, además en las fracciones 80 a 82 se confina sobre-representación del tonoplasto, en la fracción 84 se identifican términos GO relacionados a mitocondria y por último en la fracción 85 existen componentes celulares relacionados a los microtúbulos (Figura 13A). Además, se identifican sobre-representación de procesos biológicos relacionados a transporte, respuesta a la falta de agua, respuesta biológica y respuesta celular al estímulo, en la mayoría de las fracciones de estas muestras. De manera interesante se pueden observar que en las fracciones 81, 82 y 83, existe una funcionalidad relacionada al transporte de proteínas y al establecimiento final de la localización proteica. Otro GO interesante que esta sobre-representado es el relacionado al transporte mediado por vesículas y respuesta celular al estímulo, en la fracción 85 (Figura 13B).

7.6.2 *GO enriquecidos en las fracciones aisladas de plantas crecidas en presencia de NaCl.* También se llevó a cabo el análisis de enriquecimiento de los términos GO provenientes de cada una de las fracciones (80 a 85), aisladas de microsomas de plantas crecidas en presencia de 200 mM de NaCl por medio de la EZFL. Este análisis indica que en las fracciones 80, 81 y 83 existe sobre-representación del aparato de Golgi, y del tonoplasto en estas mismas fracciones, junto con la fracción 85. Además, existen GO relacionados a membrana plasmática en las fracciones 81, 83 y 85; y de vacuola en las fracciones 80, 82, 83 y 85. En la fracción 82 se identificaron sobre-representaciones de GO relacionados a proteínas integrales o intrínsecas de membrana. Por último, se logra observar enriquecimiento en la fracción 80 para los términos GO de simplasto y plasmodesmos (Figura 14A). El enriquecimiento relacionado a procesos biológicos, se observó que en todas las fracciones existe sobre-representación del término GO, respuesta al estímulo o falta de agua, a diferencia de las fracciones C80 a C85. Otros GO sobre-representados son: establecimiento de la localización, localización proteica en un organelo en la fracción C82. Interesantemente, se observa para la fracción 80 términos GO relacionados a la modificación de proteínas por lípidos, y términos GO como, transporte, establecimiento de localización y transporte mediado por vesículas son sólo observados para las fracciones 82 y 84 (Figura 14B).

A) Enriquecimiento componente celular

<i>Termino GO</i>	C	80	81	82	83	84	85
<i>Aparato de Golgi</i>	0.025	0.022	0.047	0.014	0.049		
<i>Tonoplasto</i>		0.0025	0.016	0.016			
<i>Vesículas asociadas a Golgi</i>				0.021			
<i>Vesícula recubierta</i>				0.019			
<i>Membrana</i>		0.027				0.016	
<i>Membrana mitocondrial interna</i>						0.019	
<i>Envoltura mitocondrial</i>						0.014	
<i>Microtúbulo</i>	0.027						0.045

B) Enriquecimiento proceso biológico

<i>Termino GO</i>	C	80	81	82	83	84	85
<i>Transporte</i>	0.042	0.049	0.00052	0.0055		0.038	
<i>Localización</i>		0.027	0.00085	0.015			
<i>Respuesta al estímulo de agua</i>	0.00059	0.011	0.043	0.01		0.018	
<i>Respuesta a la falta de agua</i>	0.00059	0.011	0.043	0.01		0.018	
<i>Regulación biológica</i>	0.033	0.031	0.0017	0.0042			
<i>Transporte de proteínas</i>			0.0071	0.0068	0.024		
<i>Establecimiento de localización sub-celular</i>			0.00052	0.0026	0.017		
<i>Localización proteica</i>			0.0078	0.0031	0.016		
<i>Estabilización proteica</i>	0.0041	0.041	0.037			0.016	
<i>Respuesta a estímulos con monosacáridos</i>		0.018				0.0057	
<i>Establecimiento de localización</i>	0.042	0.02	0.00052	0.0055		0.038	
<i>Respuesta celular a estímulo</i>	0.02	0.0022	0.0013	0.0089			0.02
<i>Transporte mediado por vesículas</i>							0.039
<i>Plegado de proteína</i>		0.0006			0.039		0.038
<i>Transporte intracelular de proteína</i>			0.037	0.0065	0.023		
<i>Crecimiento</i>						0.0087	
<i>Ensamblado de complejos proteicos</i>						0.012	

Figura 13. Análisis de enriquecimiento de GO en las fracciones aisladas por EZFL de microsomas provenientes de plantas de *M. crystallinum* crecidas en ausencia de NaCl. Los cuadros muestran los términos GO para componente celular A) y para proceso biológico B), sobre-representados en cada fracción aislada (C80 a C85) y además los GO sobre-representados en los GO de las proteínas compartidas por todas las fracciones (C). Los número en cada recuadro representa el *valor-P* de significancia ($P > 0.005$) calculado por la prueba exacta de Fisher.

7.6.3 *GO enriquecidos de las proteínas compartidas por todas las fracciones en ausencia y en tratamiento con sal.* Para las fracciones 80 a 85 que provienen de plantas crecidas en ausencia de NaCl, el análisis de enriquecimiento de las proteínas compartidas por todas las fracciones reveló que, están sobre-representadas los componentes celulares de aparato de Golgi y microtúbulos (Figura 13A), y en los procesos biológicos, comparten los términos GO con el resto de las fracciones

individuales, de transporte, respuesta a la falta o estímulo de agua, regulación biológica, respuesta celular al estímulo y establecimiento de la localización. Para proteínas compartidas de las fracciones 80 a 85 aisladas de microsomas proveniente de plantas tratadas con NaCl, se encontró que el componente celular sobre-representado en estas fracciones es la Vacuola, el Tonoplasto y el Aparato de Golgi (Figura 14A). Y en cuanto a los procesos biológicos que se identificaron como sobre-representados en este grupo de proteínas compartidas fueron los términos GO, respuesta al estímulo o falta de agua, estabilización proteica, respuesta celular al estímulo, transporte, localización, estabilización de la localización subcelular, transporte mediado por vesícula, regulación biológica y regulación positiva mediada por estímulos (Figura 14B).

7.7 Corroboración experimental del enriquecimiento de GO de componente celular, sobre cada una de las fracciones de vesícula de membrana aisladas por EZFL.

El análisis de enriquecimiento de GO, permitió identificar aquellos procesos y compartimentos subcelulares sobre-representados en cada una de las fracciones de membrana en estudio (C80 a C85 y S80 a S85, Figuras 13-14).

Una forma de validar los resultados obtenidos *in silico* para los términos GO de componente celular, fue a través de ensayos de inmunodetección tipo Western Blot, que utiliza anticuerpos específicos, que denotan la presencia de ciertos compartimentos subcelulares, en cada una de las diferentes fracciones. La señal detectada es un indicativo no sólo de la presencia de la proteína marcadora, sino además permitió observar la abundancia de la proteína entre las distintas condiciones, lo cual ayudo a determinar el tipo de compartimento presente de manera más abundante en cada condición. Sin embargo debe de tomarse en cuenta que la abundancia del marcador podría variar entre las fracciones analizadas. Por ejemplo para la fracción S80 la cual esta enriquecida del termino GO para Aparato de Golgi, se esperaría en la inmunodetección con un anticuerpo anti-Aparato de Golgi, originara una señal más fuerte en esta fracción, en comparación a la señal que se podría obtener de la fracción C85, la cual esta enriquecida preferencialmente por el termino GO para Microtúbulos. Sin embargo, encontrar señal en la fracción C85 para el Anti-Aparato de Golgi, si es posible debido a que cuando un término GO se encuentra enriquecido dentro de un grupo de proteínas de interés, no significa que el resto de los términos GO (es decir los GO no significativos, en el contexto de la prueba exacta de Fisher), no estén presentes en el grupo de proteínas identificadas.

A) Enriquecimiento componente celular

Termino GO	S	80	81	82	83	84	85
<i>Aparato de Golgi</i>	0.0006	0.0004	0.005		0.022		
<i>Tonoplasto</i>	0.008	0.0088	0.043		0.0014		0.026
<i>Membrana plasmática</i>			0.0004		0.0024		0.014
<i>Integral de membrana</i>				0.0041		0.014	
<i>Vacuola</i>	0.0017	0.015		0.027	0.0013		0.0096
<i>Intrínseco a membrana</i>				0.017		0.018	0.036
<i>Membrana de organelo</i>				0.049			
<i>Simplasto</i>		0.012					
<i>Plasmodesmo</i>		0.012					

B) Enriquecimiento proceso biológico

Termino GO	S	80	81	82	83	84	85
<i>Lipidación de proteínas</i>		0.003					
<i>Miristolación proteica</i>		0.0011					
<i>Respuesta al estímulo de agua</i>	0.00059	0.0017	0.005	0.0013	0.023	0.014	0.0004
<i>Respuesta a la falta de agua</i>	0.00059	0.0017	0.005	0.0013	0.023	0.014	0.0004
<i>Transporte de cationes monovalentes</i>		0.049					
<i>Estabilización proteica</i>	0.0083	0.034			0.05		
<i>Transducción de señales</i>		0.028				0.029	0.019
<i>Respuesta celular a estímulo</i>	0.041		0.0021	0.0023	0.0088	0.0089	
<i>Plegado de proteína</i>	0.023	0.024	0.0061				0.0083
<i>Transporte</i>	0.012			0.0079		0.038	
<i>Establecimiento de localización</i>	0.012			0.0079		0.038	
<i>Localización proteica en un organelo</i>	0.023			0.0012			
<i>Transporte transmembrana</i>				0.018	0.0013		
<i>Regulación positiva a estímulos</i>	0.029	0.034			0.05		
<i>Regulación biológica</i>	0.012	0.0079			0.041	0.0041	
<i>Transporte mediado por vesícula</i>	0.039						
<i>Localización</i>	0.023			0.0081		0.0053	
<i>Respuesta a lípidos</i>		0.049				0.026	
<i>Proceso de biosíntesis de lipoproteínas</i>		0.0004					

Figura 14. Análisis de enriquecimiento de GO en las fracciones aisladas por EZFL de microsomas provenientes de plantas de *M. crystallinum* crecidas en presencia de 200 mM de NaCl. Los cuadros muestran los términos GO para componente celular A) y para proceso biológico B), sobre-representados en cada fracción aislada (S80 a S85) y los GO sobre-representados de las proteínas compartidas entre todas las fracciones (S). Los número en cada recuadro representa el *valor-P* de significancia ($P > 0.005$) calculado por la prueba exacta de Fisher.

Con base a lo mencionado, se procedió a utilizar inmunodetecciones tipo Western Blot, con los siguientes anticuerpos: anti-AHA3, el cual detecta a la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática; el anti-RGP1, que detecta un polipéptido reversiblemente

glucosilado localizado en el Aparato de Golgi; anti- VHA-E, detecta la subunidad E de la H^+ -ATPasa del tonoplasto y el anti-CTR1, que detecta a la calreticulina ubicada en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. Las inmunodetecciones de todos estos anticuerpos se realizaron en todas las fracciones de vesícula de membrana que se analizaron en este estudio (Figura 15).

Las inmunodetecciones muestran que en las fracciones aisladas de microsomas de plantas crecidas tanto en ausencia (C), como en presencia de 200 mM de NaCl (S), las proteínas VHA-E, CTR1 y RGP1 se detectaron en todas sus fracciones analizadas, tanto control como tratadas con NaCl (Figura 15). AHA3 se detectó en las fracciones C82-C85 y S80-S85; y no se detectó en las fracciones C80 y C81 (Figura 15). En cuanto a la relación que existe entre el enriquecimiento de términos GO y la intensidad de las bandas inmunodetectadas, lo cual se verificó comparando el área de las bandas (*pixeles* x cm^3) entre las dos condiciones diferentes. Se encontró que, como se predijo en el análisis de enriquecimiento del término GO relacionado a la membrana plasmática que marco a las fracciones S81, S83 y S85, como aquellas enriquecidas en este componente celular; las inmunodetecciones realizadas sobre estas fracciones, también presentaron una mayor señal del marcador de membrana plasmática, AHA3, en las fracciones S81, S82 y S84 en comparación con la señal obtenida de las fracciones C, siendo más evidente para las fracciones S83 y S84 (4.6 y 10.8 unidades de incremento, respectivamente, Figura 15, AHA-3). Sin embargo el enriquecimiento del GO de membrana plasmática para la fracción S85, no se observó por medio del AHA3. Por otro lado el marcador de tonoplasto VHA-E, presentó cambios de intensidad importantes en las fracciones S83, S84 y S85, ya que en estas fracciones se incrementó la señal de este marcador en comparación con la intensidad de las fracciones C83, C84 y C85 (Figura 15). Lo cual coincide con el cambio de enriquecimiento del GO asociado al tonoplasto, en las fracciones C80, C81 y C82 que se encontraban enriquecidas en condiciones normales de crecimiento, pero en condiciones de salinidad, el enriquecimiento de este GO cambió en las fracciones S83 y S85 (Figura 14A). Otro marcador que se utilizó fue el CTR1, del aparato de Golgi y del retículo endoplasmático; y el marcador RGP1 del aparato de Golgi, los cuales se utilizaron para evaluar y verificar experimentalmente el enriquecimiento del termino GO de aparato de Golgi. Las señales de estos dos marcadores, como anteriormente se mencionó, se observaron en todas las fracciones control (C80 a C85) y en todas las fracciones proveniente de la condición de tratamiento con NaCl (S80 a S85). Lo cual coincide con el análisis de enriquecimiento realizado sobre las proteínas compartidas (Cc y Sc), el cual

sugiere que estas proteínas comparten el GO del aparato de Golgi, es decir, las proteínas que se comparten por todas las fracciones y en ambas condiciones, son proteínas que están enriquecidas con el GO de aparato de Golgi. Lo cual explica porque se observó la señal de los marcadores RGP1 y CTR1 en todas las fracciones C y S. Sin embargo, la señal de ambos marcadores fue diferente dependiendo el número de fracción y de la condición de crecimiento. Por ejemplo, se observó que la intensidad de la señal de CTR1 incrementa en las fracciones S80 a S85, si se compara con la señal obtenida de sus homólogas C80 a C85 (Figura 15, CTR1). Y la señal de marcador RGP1 en la fracción S83 incrementa 7.34 unidades respecto a la señal de este mismo en la fracción C83 (Figura 15, RGP1). En base a estos resultados podemos evidenciar que las fracciones 80 a 85 que provienen de la condición de tratamiento y de no tratamiento poseen componentes del aparato de Golgi, membrana plasmática y tonoplasto, sin embargo la abundancia de dichos cambia en respuesta a la salinidad.

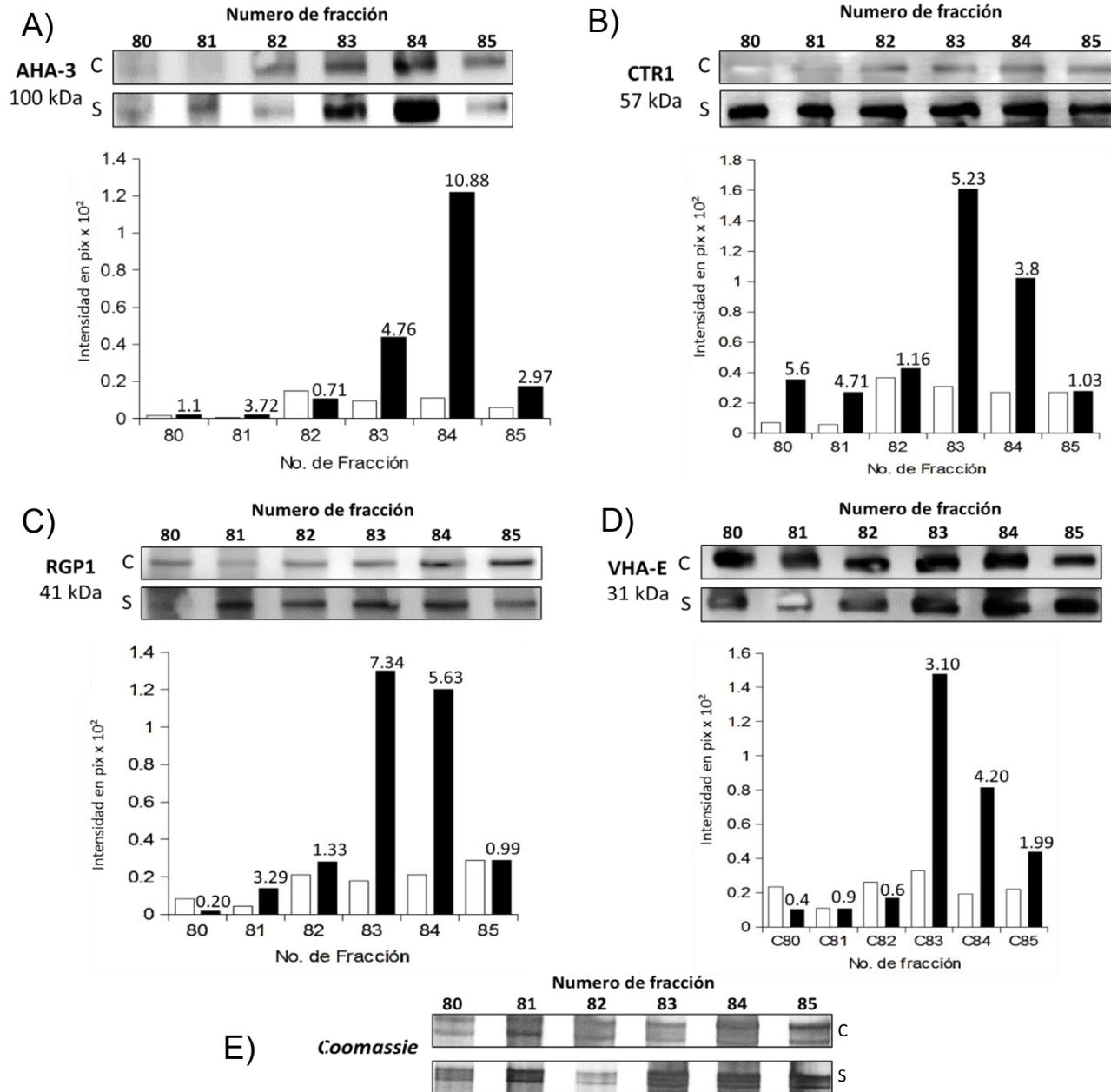


Figura 15. Inmunodetecciones para corroborar experimentalmente el enriquecimiento de GO para componente celular. Westerns blots realizados sobre las fracciones C80 a C85 y S80 a S85, con los siguientes anticuerpos: **A)** anti-marcador de membrana plasmática, *AHA-3*, **B)** anti-marcador del aparato de Golgi y RE, *CTR1*, **C)** anti-marcador del aparato de Golgi, *RGP1* **D)** anti-marcador del tonoplasto, *VHA-E*. Las gráficas debajo de cada blot muestran la intensidad en *píxeles* $\times 10^2$ de cada fracción C (barras blancas) y S (barras negras). Los números sobre las barras de las fracciones S, indican el incremento o la disminución de intensidad del anticuerpo, tomando en cuenta la intensidad de las fracciones C y el control de carga (**E**; datos no mostrados). Los pesos moleculares se muestran en kilodaltones (kDa). Los anticuerpos se utilizaron en una dilución 1:1000. Las fotos son representativas de tres repeticiones independientes.

7.8 Identificación de las proteínas que cambian de abundancia, en las fracciones aisladas por EZFL.

En esta investigación no sólo se pretendió identificar qué tipo o tipos de compartimentos subcelulares están presentes en las fracciones, 80 a 85, si no también se tiene el interés, de comprender el papel fisiológico que tienen las proteínas contenidas en las fracciones en la raíz de *M. crystallinum* cuando se encuentra en condiciones de salinidad. Por ello, se evaluó que proteínas cambian de abundancia en las fracciones S80 a S85, al compararlas con las fracciones provenientes de la condición de no tratamiento con sal, C80 a C85.

Para identificar a estas proteínas, se utilizó el programa Scaffold (versión 4.0 Proteome Software Inc., Portland, OR, EUA), el cual, a partir del conteo de péptidos únicos para cada una de las proteínas identificadas, calcula el índice de abundancia de las proteínas identificadas (PAI, por sus siglas en inglés, **P**rotein **A**bundance **I**ndex). Este índice, se define como el número de péptidos observados dividido entre el número de todos los posibles péptidos provenientes de una proteína (Rappsilber, *et al.*, 2002). En donde, todos los posibles péptidos provenientes de una proteína problema, se calcula in silico, ya que al conocer la secuencia de aminoácidos de la proteína, se puede predecir cuantos y cuales péptidos se formarían de esa secuencia al ser digerida al 100% por la enzima tripsina. A partir del PAI de una proteína, se puede calcular la abundancia absoluta de esa proteína, por medio de la modificación exponencial del valor PAI (emPAI, por sus siglas en inglés, **e**xponentially **m**odified **P**AI), que es igual a la $10^{\text{PAI}-1}$ de una proteína y es proporcional al contenido de esa proteína en una mezcla compleja de proteínas diferentes (Ishihama., *et al* 2005). Así, los valores emPAI obtenidos para cada una de las proteínas identificadas en el programa Scaffold (versión 4.0 Proteome Software Inc., Portland, OR, EUA), fueron utilizados para identificar a las proteínas que cambian de abundancia, ya que los valores emPAI tienen la característica de ser cuantitativos y representativos de la abundancia proteica.

Para poder identificar las proteínas que cambian de abundancia por medio del emPAI, se realizaron pruebas de T de Student, la cual permite identificar el cambio de abundancia proteica entre las dos condiciones (ausencia o presencia de NaCl). Esto se realiza por medio de la comparación estadística de las medias. Por ejemplo, la media 1 sería el valor emPAI de la proteína problema de la fracción C80, y la media 2 sería el valor emPAI de la misma proteína pero de la fracción S80. Esta comparación de medias se realiza a lo largo de todas las réplicas experimentales realizadas ($n=4$), con el fin de

determinar si existe suficiente evidencia para aceptar o rechazar que las medias 1 y 2 son iguales o diferentes. El significado biológico se determina por el valor-P que calcula la prueba T de Student, donde valores menores a 0.05 son significativos, es decir las medias 1 y 2 son efectivamente diferentes.

Utilizando el índice emPAI y la prueba T de Student, se identificaron las proteínas que cambian de abundancia en cada una de las fracciones evaluadas en este trabajo. La comparación de abundancia de medias se realizó entre las fracciones homólogas, es decir, C80 vs S80, C81 vs S81, C82 vs S82 y así sucesivamente. Una vez identificadas por emPAI y la prueba T de Student todas las proteínas que cambian de abundancia, se procedió a la identificación de la dirección del cambio de abundancia, es decir, si es que disminuyo o aumento la abundancia de las proteínas diferencialmente reguladas. Este cálculo se debe de realizar, debido a que la prueba T de Student sólo nos permite conocer si existe una diferencia significativa biológica en la abundancia de una proteína, pero no permite conocer el valor numérico de ese cambio. Para conocer la magnitud del cambio en abundancia, se utilizó con el programa Scaffold (versión 4.0 Proteome Software Inc., Portland, OR, EUA), el cálculo del grado de cambio, que toma de referencia la abundancia de proteína de una fracción sin sal, y compara este valor de referencia con la abundancia de la misma proteína en la misma fracción, pero sometida a tratamiento con sal. Al hacer esta comparación, por ejemplo, para la abundancia absoluta (calculado por emPAI) de la proteína problema en la fracción C80, el programa asigna un valor de grado de cambio igual a 1 que proviene de la referencia control de crecimiento. Ahora para asignar el grado de cambio de la proteína problema pero en la fracción S80, se compara la abundancia absoluta de esta proteína, respecto a la de la misma proteína pero de la fracción C80, si el programa arroja un valor de grado de cambio igual a 2, entonces la proteína problema de la fracción 80, en la condición de sal, aumenta una magnitud respecto a la encontrada en la condición sin sal. A partir del grado de cambio, se puede conocer entonces, que proteínas disminuyen o aumentan de abundancia en las fracciones cuando se someten a la condición de salinidad. Además se pueden identificar aquellas proteínas que aparecen o desaparecen en respuesta a la condición de salinidad, debido a que el programa asigna el valor de " ∞ " (infinito) a aquellas proteínas que aparecen, es decir, que en la condición control no se encontraban y el valor "0" (cero) para aquellas proteínas que desaparecen en la condición de sal y que si se encontraban en la condición sin sal.

A partir del emPAI, y del análisis por medio de la prueba T de Student y el cálculo del grado de cambio, se llegó a la identificación de 113 proteínas que cambian de

abundancia en las fracciones 80 a 85. Los resultados, se muestran en dos formatos diferentes: en tablas (Tablas 2 a 7) donde pueden observarse los valores de grado de cambio y de *valor-p* de cada una de las proteínas que cambia de abundancia para cada una de las de las fracciones analizadas; y además en el formato de gráficos tipo volcán, donde se pueden visualizar los cambio proteicos en cada una de las fracciones (Figura S1 a S6). En ambos casos se muestra un código de colores, en donde aquellas celdas (de Tabla) o puntos (de gráfico) de color azul (•), indican que la proteína incrementó su abundancia en la condición de tratamiento con sal, mientras que las celdas o puntos de color rojo (•), indican la disminución de la abundancia proteica, los morados (•) indican una proteína que aparece bajo la condición de salinidad y los verdes (•) que desaparecen bajo la condición de salinidad.

Tabla 4. Proteínas que cambian de abundancia en la fracción S80.

Nombre de la proteína	Abreviaturas	Valor-P	Grado de cambio
Sacarosa sintasa	SUS	0.0033	2.1
Proteína relacionada a Ras RABA1f	RABA1f	0.02	2.7
Acuaporina PIP2;5	PIP2;5	0.027	1.3
Complejo Adaptador de clatrina, isoforma μ 1	AP	0.031	2.3
Cadena pesada de Clatrina 1	CTL1	0.039	1.2
Histona H2A.6	H2A.6	0.039	3.4
Acuaporina PIP1;1	PIP1;1	0.043	1.2
Oxidasa de Mono cobre SKU5	SKU5	0.054	9.4
Serina hidroximetiltransferasa 2	SHMT	0.056	1.8
Proteína transportadoras de proteínas Sec61 α	Sec61	0.018	0.3
Enolasa 2	2-PG	0.035	INF

La tabla muestra el nombre de la proteína, su abreviatura, el valor-P y el grado de cambio. El color azul indica incremento de abundancia en la condición de salinidad, el color rojo disminución de abundancia y el color morado indican INF (infinito), es decir proteínas que aparecen como consecuencia del tratamiento de con NaCl.

Tabla 5. Proteínas que cambia de abundancia en la fracción S81.

Nombre de la proteína	Abreviaturas	Valor-P	Grado de cambio
2,3-bifosfoglicerato mutasa, independiente	BPG	0.0036	2.5
Acuaporina PIP2;5	PIP2;5	0.019	1.5
Histona H2A.6	H2A.6	0.02	2.3
Proteína ribosomal L8 60S	RLP8	0.033	1.8
Acarreador mitocondrial de 2-oxoglutarato/malato	SLC25A	0.044	1.2
Proteína de choque térmico 90-2	Hsp90-2	0.00093	0.8
Transaldolasa	TALDO	0.0069	0.5
Pirofosfatasa energizadora del tonoplasto	Ppasa	0.012	0.5
Proteína de choque térmico 90-4	Hsp90-4	0.016	0.7
ATPasa transportadora del calcio 2	ATPasa 2C2	0.025	0.4
Proteína transportadora Sec61 subunidad α	Sec61	0.025	0.3
Proteína de unión a nucleótidos de guanina β	ASC1	0.049	0.5
Piruvato cinasa, isozima citosólica	PK	0.049	0.6
Proteína de choque térmico 81-3	Hsp81-3	0.056	0.8

La tabla muestra el nombre de la proteína, su abreviatura, el valor-P y el grado de cambio. El color azul indica incremento de abundancia en la condición de salinidad y el color rojo disminución.

Tabla 6. Proteínas que cambia de abundancia en la fracción S82.

Nombre de la proteína	Abreviaturas	Valor-P	Grado de cambio
Aminopropil transferasa de Putrescina	PAPT	0.0055	3.4
Serina hidroximetiltransferasa 2	SHMT	0.009	2.6
Catalasa isozima 1	Catalasa	0.027	6.3
Sacarosa sintasa	SUS	0.031	1.4
Acuaporina PIP2;5	PIP2;5	0.033	1.9
Proteinasa de aspártica	KAP	0.033	1.5
Actina 1 isoforma X1	Actina	0.047	2.3
Cinasa Pto interactor 1	PtoK	0.0023	0.6
Proteína de choque térmico 90-4	Hsp90-4	0.0062	0.6
Proteína ribosomal S14-3 40S	RPS14	0.018	0.4
Factor de elongación 1-delta 1	EEF1D	0.024	0.3
Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	G3PDH	0.026	0.5
Proteína defectiva de pelos de la raíz 3	RDH3	0.027	0.6
Factor de inicio de la traducción 3 subunidad H	TIF3H	0.028	0.7
Metalopeptidasa M24 isoforma 1	M24	0.029	0.6
Proteína de choque térmico 81-3	Hsp81-3	0.035	0.7
Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1	PEPCK	0.044	0.5
D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa	D3	0.046	0.6
Malato deshidrogenasa mitocondrial	MDH	0.00017	0
Villina 2 isoforma 1	Villin 2	0.027	INF

La tabla muestra el nombre de la proteína, su abreviatura, el valor-P y el grado de cambio. El color azul indica incremento de abundancia en la condición de salinidad, el color rojo disminución de abundancia, el color morado indica INF (infinito), es decir proteínas que aparecen como consecuencia del tratamiento con NaCl y el color verde que desaparecen.

Tabla 7. Proteínas que cambian de abundancia en la fracción S83.

Nombre de la proteína	Abreviaturas	Valor-P	Grado de cambio
Oxidasa de Mono cobre SKU5	SKU	0.0021	4.4
Acuaporina PIP2;5	PIP2;5	0.0072	2.1
Serina hidroximetiltransferasa 2	SHMT	0.012	2.3
Malato deshidrogenasa mitocondrial	MDH	0.013	7.8
Precursor de Calnexina	Cix	0.016	1.7
Acuaporina PIP2;1	PIP2;1	0.02	2
Fosfatasa 2C 9	P2C9	0.02	2.4
Proteína ribosomal L37a 60S	RLP37a	0.021	2.1
Acuaporina PIP1;2 isoforma 1	PIP1;2	0.022	2
Reductasa de monodehidroascorbato	AFR	0.026	2.4
5-metiltetrahydropteriltriglutamato	MetE	0.027	1.6
Enolasa	2PG	0.035	1.8
Acuaporina PIP1;4	PIP1;4	0.038	2
2,3-bifosfoglicerato mutasa independiente	BGP	0.044	2.3
Proteína ribosomal L3	RLP3	0.047	1.3
Acuaporina PIP1;1	PIP1;1	0.05	1.6
NADH deshidrogenasa [ubiquinona] 1 α subunidad 9	NDUFA9	0.0013	0.4
NADH-ubiquinona oxidoreductasa cadena 1	ND1	0.0027	0.5
Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1	PEPCK	0.0032	0.4
Proteína resistente a drogas pleiotrópicas 1	PDR1	0.0037	0.3
Glutamato descarboxilasa 1	GAD	0.0049	0.1
Coatómero subunidad β -1	COP1B	0.0055	0.6
ATPasa 2 transportadora de calcio	ATPasa 2C2	0.0057	0.1
Dinamina-2B	D2B	0.0061	0.3
Alfa-tubulina 1	Tubu1	0.0084	0.7
Tubulina alfa-3	Tubu3a	0.0087	0.7
Factor de iniciación de la traducción 3 subunidad E	TIF3C1	0.016	0.6
Chaperorina TCP-1/cpn60	TCP-1	0.016	0.6
ATPasa, tipo AAA, CDC48 isoforma 1	CDC48	0.026	0.6
Coatómero subunidad γ -2	COPg2	0.029	0.6
Proteína del complejo T1 subunidad β isoforma X1	TCP1	0.031	0.5
Canal de aniones dependiente de voltaje 1	VDAC	0.032	0.7
Subunidad 6A regulatoria del proteosoma 26S	26S-6A	0.047	0.5
Importina subunidad α -1a	KAP1	0.048	0.5
Proteína de fusión sensible a N-etilmaleimida	SNARE	0.0025	0
Antiportador de Cationes/H ⁺ 18	CHX18	0.048	0
Catalasa isozima 1	Catalasa	0.003	INF
Transducina con dominio WD40	T/WD40	0.029	INF

La tabla muestra el nombre de la proteína, su abreviatura, el valor-P y el grado de cambio. El color azul indica incremento de abundancia en la condición de salinidad, el color rojo disminución de abundancia, el color morado indica INF (infinito), es decir proteínas que aparecen como consecuencia del tratamiento de con NaCl y el color verde que desaparecen.

Tabla 8. Proteínas que cambian de abundancia en la fracción S84

Nombre de la proteína	Abreviaturas	Valor-P	Grado de Cambio
Factor de iniciación de la traducción3 subunidad C	TIF3C1	0.0018	4.4
Serina hidroximetiltransferasa 2	SHMT	0.002	5.8
Histona H2A.6	H2A.6	0.0033	6.7
Proteína ribosomal L15 60S	RLP15	0.0037	5.2
Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa 1	G3PDH	0.0079	5.2
Tiorredoxina tipo H 1	Trx-H1	0.014	4.7
14-3-3	14-3-3	0.017	2.6
Factor de elongación	EF-2	0.021	2.1
Proteína ribosomal S5/ Factor de elongación G	RPS5	0.024	2.1
Histona H4	H4	0.025	1.6
RNA helicasa con caja DEAD/DEAH isoforma 1	DExH	0.028	4.9
ATP sintasa subunidad α , mitocondrial	F1F0- α	0.0028	0.4
ATP sintasa subunidad β , mitocondrial	F1F0- β 1	0.035	0.6
ATP sintasa subunidad β , mitocondrial	F1F0- β 2	0.041	0.5
Proteína ribosomal S27-1 40S	RPS27-1	0.028	0
Acilo- CoA sintetasa A	FAS	0.046	0

La tabla muestra el nombre de la proteína, su abreviatura, el valor-P y el grado de cambio. El color azul indica incremento de abundancia en la condición de salinidad, el color rojo disminución de abundancia, el color morado indica INF (infinito), es decir proteínas que aparecen como consecuencia del tratamiento de salinidad y el color verde que desaparecen.

Tabla 9. Proteínas que cambian de abundancia en la fracción S85

Nombre de la proteína	Abreviaturas	Valor-P	Grado de cambio
Delta(24)-esterol reductasa	D24SR	0.022	2.6
Proteína ribosomal L3	RPL3	0.008	0.6
Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa-1	PEPCK	0.0083	0.3
Metaloproteasa de Zn dependiente de ATP FTSH 10, mitocondrial	FTSH10	0.02	0.4
Transportador de fósforo	Pht	0.022	0.7
ATPasa transportadora de calcio 9	ATPasa C9	0.025	0.3
Proteína con dominio SH3 isoforma 3	SH3	0.025	0.4
Proteína resistente a drogas pleiotrópicas 12	PDR12	0.027	0.5
Receptor vacuolar de clasificación 13	VPS13	0.034	0.7
Anhidrasa carbónica gama 2	AC gama	0.041	0.5
Proteína ribosomal S27-1 40S	RSP27-1	0.0014	0
Antiportador Cation/H(+) 18	CHX18	0.0032	0
Oxidasa de Mono cobre SKU5	SKU5	0.002	INF
Malato deshidrogenasa Mitocondrial	MDH	0.0048	INF

72

La tabla muestra el nombre de la proteína, su abreviatura, el valor-P y el grado de cambio. El color azul indica incremento de abundancia en la condición de salinidad, el color rojo disminución de abundancia, el color morado indica INF (infinito), es decir proteínas que aparecen como consecuencia del tratamiento de salinidad y el color verde que desaparecen.

7.9 Validación *in vitro* de las proteínas que cambian de abundancia en las fracciones C83, S83 y C84, S84 aisladas por EZFL.

Con el fin de verificar el análisis *in silico* realizado para la identificación de las proteínas que cambian de abundancia por sal en las fracciones 80 a 85, se decidió hacer un examen *in vitro* de las fracciones, por medio de inmunodetecciones tipo Western Blot. Esta validación sólo se llevó a cabo sobre algunas de las proteínas que cambiaron de abundancia (debido a la disponibilidad del anticuerpo) y además, sólo se realizó en las fracciones 83,84 y 85; ya que fueron las fracciones que tuvieron el mayor número de proteínas que cambian de abundancia y de las cuales se disponía más material. Para la fracción 83 (Tabla 7), se realizó inmunodetección con anticuerpos en contra de las proteínas SHMT, ALDO, PIP1; 4, PIP1; 2, PIP2; 5 y PIP2; 1 (Tabla A1). Como se predijo con el análisis *in silico*, en la fracción S83, la proteína SHMT, aumenta su abundancia en respuesta a la condición de salinidad, ya que la abundancia de esta proteína aumento 1.84 veces en la fracción S83 respecto a la señal obtenida de la fracción C83 (Figura 16A, SHMT). Las acuaporinas, PIP1;4, PIP1;2, PIP2;1 y PIP2;5, las cuales en el análisis *in silico* aumentan su abundancia por salinidad en la fracción S83, también aumentaron cuando se inmunodetectaron con los respectivos anticuerpos policlonales. Al cuantificar la abundancia de estas proteínas de las fracciones C83 y S83, se detectó un aumento de 3.41 veces para la PIP1;4, 2.09 para la PIP2; 1, 5.44 para la PIP2; 5 y 3.88 para la PIP1; 2 en la fracción S83, respecto a la intensidad encontrada en la fracción C83 (Figura 16A, PIPs). Los Western Blots realizados sobre las fracciones C84 y S84 con anticuerpos en contra las proteínas, SHMT y 14-3-3, mostraron que en la fracción S84 estas dos proteínas responde positivamente al tratamiento con NaCl, ya que ambas aumentan su señal en 2.03 y 1.85 veces para la 14-3-3 y la SHMT, respectivamente (Figura 16B).

Otra forma que utilizamos para validar los resultados obtenidos del análisis *in silico* realizado sobre las diferentes fracciones, fue a través de la inmunodetección de la proteína aldolasa (ALDO) en las fracciones 83 y 84, la cual fue una proteína que no mostros cambios significativos de abundancia entre la condición C y S. Esta proteína en el análisis estadístico sobre la fracción 83 (C83 vs S83) obtuvo un *valor p* igual a 0.051 y un grado de cambio igual a 2; y en la fracción 84 (C84 vs S84) un *valor p* igual a 0.091 y un grado de cambio igual a 2.1. Por lo cual, la catalogamos como una proteína que no poseía el *valor P* necesario para poder ser considerada como una proteína responsiva a la condición de salinidad; es decir, aunque su grado de cambio era dos, el *valor P* indicaba que el cambio

no es biológicamente significativo. Por lo tanto, al realizar la inmunodetección con ensayos tipo Western Blot de la proteína ALDO sobre estas fracciones, no debe observarse cambios de intensidad entre las fracciones C83-C84 y S83-S84. Bajo esta premisa, se realizaron los Westerns Blots de la proteína ALDO en las fracciones 83 y 84, resultando en señales con valores de intensidad 0.93 veces en la fracción 83 (Figura 16A) y 0.82 veces en la fracción 84 (Figura 16B). Es decir señales, bastante cercanas a la unidad, lo cual indica que la abundancia de esta proteína no cambia de manera significativa entre la fracción C y la S, lo cual se corroboró en dos replicas experimentales.

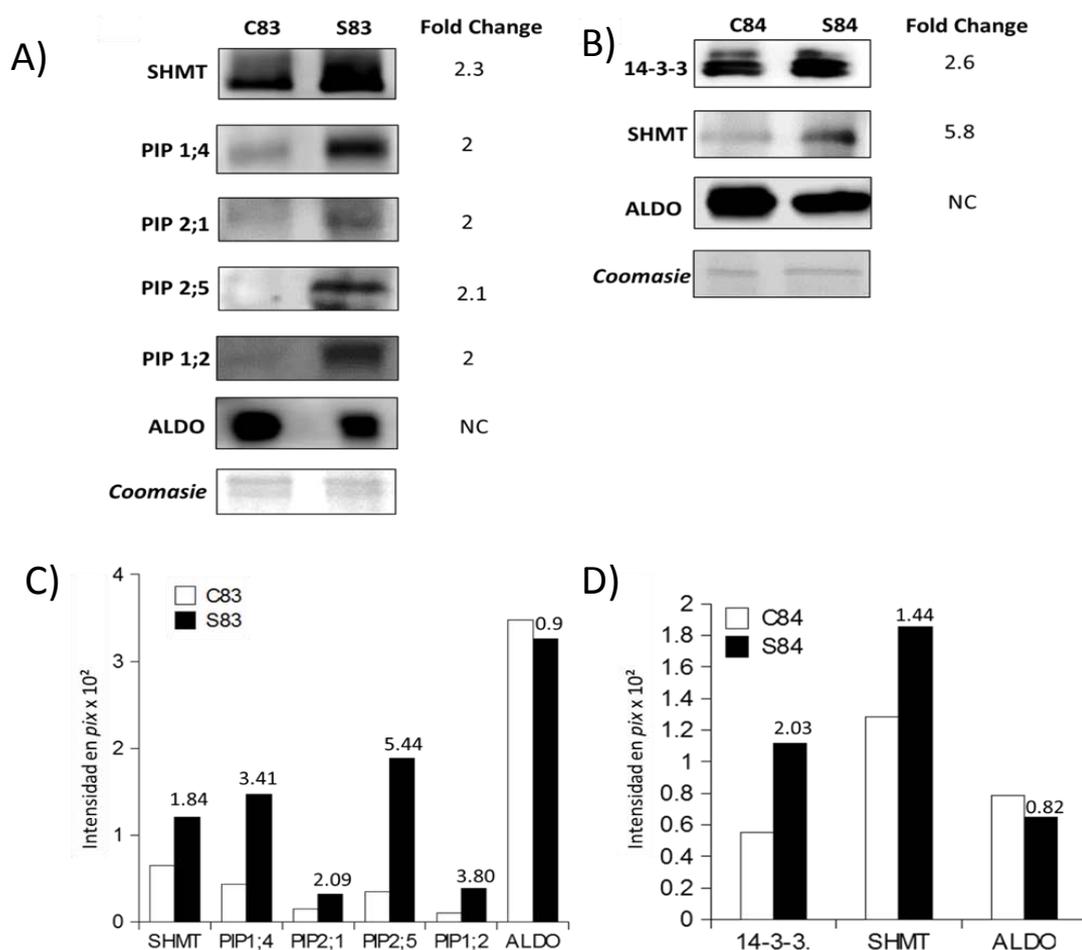


Figura 16. Validación in vitro de algunas proteínas que incrementan de abundancia por inmunodetecciones tipo Western Blot. Inmunodetecciones realizadas en las fracciones 83 (A) y 84 (B) en contra de proteínas que incrementan de abundancia por el tratamiento con NaCl en la raíz de *M. crystallinum*. A) Fracciones C83 y S83, B) Fracciones C84 y S84. Se señala el grado de cambio obtenido en el análisis estadístico. C) Gráficas de intensidad de las señales inmunodetectadas de las fracciones 83 y en las fracciones 84 D). Los valores arriba de cada barra señalan el cambio de intensidad entre las fracciones C (barras blancas) y las de sal (barras negras). La densitometría se realizó utilizando como referencia el control de carga (Coomassie). Los pesos moleculares de las proteínas inmunodetectadas son=, SHMT, 150 kDa, PIP1;4, 40 kDa; PIP1;2, 25 kDa; PIP2;1, 31 kDa; PIP2;5, 30kDa; ALDO, 38 kDa; y 14-3-3, 25 kDa. Cada Blot fue realizados con tres replicas técnicas. NC indica que no se encontró diferencia significativa de abundancia.

7.10 Análisis de enriquecimiento de GOs en las proteínas que cambian de abundancia.

Con la intención de identificar aquellas funciones y procesos biológicos, sobre representados en el set de proteínas reguladas por NaCl. Para ello, se tomó como grupo de interés a las 113 proteínas diferencialmente reguladas (Tablas 4 a 9 y Figuras S1 a S6) y como grupo de referencia se utilizaron las 402 proteínas identificadas y validadas inicialmente (Tabla 1). Este análisis arrojó que las proteínas responsivas a NaCl se encuentran enriquecidas en términos GO, relacionados a procesos de unión y transporte de calcio (*Unión a calmodulina y Transporte transmembrana de Calcio*), también se enriquecieron términos referentes al Componente Celular de *Proteínas Integrales e Intrínsecas de Membrana y Vesículas asociadas al Aparato de Golgi*; además se enriquecieron en funciones como *Actividad de Canal y Actividad de Canal con sustrato específico, Regulación del transporte de iones*, y por último el GO de *Respuesta Inmune*, el cual interesantemente se define como cualquier proceso celular que provoca una respuesta controlada en contra de una amenaza interna o externa (Tabla 6). En base a esto, se sugiere que las proteínas contenidas en estas fracciones de vesícula aisladas por EZFL, son proteínas que se encuentran en su mayoría asociadas al aparato de Golgi, que funcionan en el tráfico vesicular y que en condiciones de salinidad, inducen señalización y responden positivamente a esta condición, por medio del transporte controlado de iones y moléculas a través de la membrana.

Tabla 10. GO enriquecidos en las proteínas diferencialmente reguladas a consecuencia del tratamiento con NaCl.

Término GO	Tipo de GO	Valor-P
Unión a calmodulina	F	0.0018
Intrínseco de membrana	C	0.0013
Integral de membrana	C	0.0014
Actividad de canal con sustrato específico	F	0.02
Actividad pasiva de transportador transmembrana	F	0.02
Transporte transmembrana de calcio	P	0.033
Unión a piridoxal fosfato	F	0.033
Parte de Membrana	C	0.036
Regulación del transporte de iones	P	0.044
Vesículas asociadas al aparato de Golgi	C	0.048
Respuesta inmune	P	0.048

*Tabla que muestra los términos GO que resultan enriquecidos al comparar el total de GO identificados de las 402 proteínas identificadas (grupo de referencia) contra los GO de las 133 proteínas que cambian de abundancia (grupo de interés). El tipo de GO, se marca con una **F** (función molecular), **C** (componente celular) y **P** (proceso biológico).*

8. DISCUSIÓN

Las plantas responden activamente a condiciones de estrés, mediante la reprogramación de su metabolismo celular, con la finalidad de inducir tolerancia y poder continuar o finalizar su ciclo de vida. Es por esto, que al analizar las diferencias entre plantas en diferentes condiciones de crecimiento, se pueden encontrar cambios a nivel transcripcional, proteómico y metabólico, los cuales son la consecuencia directa de la tolerancia al estrés. (Hasegawa *et al.*, 2000; Tuteja, 2007; Mahajan & Tuteja, 2005; Kosová *et al.*, 2013).

En este trabajo nos concentramos en el estudio de las raíces de la halófito *M. crystallinum* crecidas en ausencia o presencia de 200 mM de NaCl; con el fin de detectar los cambios proteicos que ocurre durante el crecimiento de esta planta en condiciones salinas. El estudio, se realizó específicamente en fracciones de vesícula de membrana aisladas por medio del sistema de EZFL caracterizadas por poseer movilidad electroforética preferencial hacia el catódico (Figura 7). De esta manera se obtuvieron las

fracciones 80 a 85, las cuales nos interesaron no sólo por sus características de migración en el sistema de EZFL, sino también porque, por análisis previos, se conocía que en ellas había diferentes tipos AQP, las cuales son claves para la tolerancia a la salinidad en *M. crystallinum*. Para caracterizar estas fracciones, utilizamos una metodología proteómica, la cual permitió identificar a las proteínas contenidas en estas fracciones, además permitió determinar los cambios de abundancia que sufren las proteínas contenidas en estas fracciones cuando se aíslan de las raíces sometidas a condiciones de salinidad. Todo esto, con la finalidad de identificar de que compartimento subcelular provienen estas fracciones de vesículas y si participan en la respuesta de tolerancia a la salinidad en *M. crystallinum*.

El análisis a nivel proteico de estas fracciones, se hizo por medio de LC-MS/MS libre de marca, lo cual resultó en una vasta colección de información sobre las proteínas contenidas en las fracciones de interés, sus características funcionales y los cambios de abundancia que se inducen por la presencia de NaCl. Sin embargo, las aseveraciones derivadas de los datos obtenidos por medio de proteómica y de las diferentes metodologías bioinformáticas utilizadas, no estarían completas sin la interpretación de estos datos a nivel biológico. Es por ello, que a continuación se indaga sobre la función fisiológica de las proteínas identificadas y se discute su participación, en el contexto de su interacción al encontrarse en el ambiente intracelular, además de la regulación que pueden sufrir, por salinidad.

8.1 Las fracciones de vesícula de membrana contiene componentes que participan en el tránsito intracelular de proteínas.

Una característica que se identificó de las fracciones de vesícula de membrana analizadas por LC-MS/MS y por el análisis *in silico* en este estudio, es que contienen un alto número de proteínas reportadas como componentes del aparato de Golgi, o bien son proteínas asociadas al aparato de Golgi por medio de vesículas; dentro de las cuales, se encontraron diferentes proteínas responsivas al tratamiento con NaCl (Figuras 14 y S1 a S6). Esto nos indicó que estas proteínas del aparato de Golgi y de las vesículas asociadas a éste, eran importantes para la respuesta a la tolerancia a la salinidad en *M. crystallinum* (Tabla 10).

Los análisis *in silico* e *in vitro* obtenidos de las proteínas presentes en las fracciones C80 a C85 y S80 a S85 aisladas por medio de la EZFL, permiten observar que las fracciones tiene proteínas características del aparato de Golgi, como lo muestra el análisis

de enriquecimiento de términos GO (Figuras, 13 y 14) y las inmunodetecciones contra los marcadores CTR1 y RGP1 (Figura 15). Sin embargo, la presencia de estas proteínas varía a lo largo de las fracciones, es decir existe abundancia diferencial de estas proteínas en cada una de las fracciones (80 a 85). Esto se observa claramente en las diferencias de los patrones de intensidad obtenidos de cada una de las fracciones inmunodetectadas en contra de las proteínas marcadoras de ER/Golgi, CTR1 y RGP1 (Figura 15), y en el análisis de enriquecimiento de GO, donde se enriquecen el aparato de Golgi en las fracciones C80, C81, C82, C83, S80, S81, S82 y S84.

En las fracciones (S80 a S85) se encontraron proteínas, que son componentes celulares relacionados con la membrana plasmática y la vacuola, lo cual se demostró con los análisis de enriquecimiento y con las inmunodetecciones (usando los marcadores P-ATPasa y VHA-E, respectivamente). Este resultado es interesante, ya que el análisis de enriquecimiento de los términos GO relacionados a proceso biológico, se detectó que en las fracciones C y S, hay sobre-representación de procesos relacionados al tráfico vesicular, como por ejemplo; *transporte intracelular de proteínas, localización de proteínas en organelos, establecimiento de la localización de proteínas en organelos y transporte mediado por vesículas* (Figura 13).

Si añadimos a esta información el hecho de que en las fracciones se observan componentes del aparato de Golgi, podemos argumentar que en estas fracciones probablemente existe comunicación vía tráfico vesicular, entre ellas y con otros compartimentos subcelulares, razón por la cual se pueden encontrar diferentes tipos de GO enriquecidos de componente celular. Esto además, sería indicativo de la dinámica que sufren las proteínas de estas fracciones, al ser sometidas a un tratamiento con sal, como lo muestra las diferencias entre los GO enriquecidos de Componente Celular y Proceso Biológico entre las fracciones C80-85 y S80-85 (Figura 13 y 14). Si bien las fracciones C80-85 y S80-85 aún comparten términos GO (*respuesta al estímulo o falta de agua, estabilización proteica, respuesta celular al estímulo, plegado de proteína, transporte, establecimiento de localización, regulación biológica, transporte mediado por vesícula y localización*), en las fracciones de sal, aparecen términos GO enriquecidos y relacionados al componente celular, de la membrana plasmática, la vacuola, el simplasto y los plasmodesmos, que no se encontraban enriquecidos en las fracciones C80-C85. Lo cual hace referencia a la respuesta biológica que estas fracciones de vesícula de membrana, llevan a cabo al encontrarse en condiciones de salinidad. Esto se acentúa más al observar

los términos GO enriquecidos para proceso biológico en las fracciones S80-S85, de los cuales destacan la *transducción de señales*, la *modificación de proteínas por lípidos* (por Ejemplo, miristolación), *biosíntesis de lipoproteínas*, *regulación positiva a estímulos*, *transporte de cationes monovalentes* y *transporte transmembrana*, lo cual está altamente relacionado a la respuesta que induce la tolerancia a la salinidad. También cabe mencionar que los GO de proceso biológico y componente celular, que no se mantienen enriquecidos, en las fracciones S80-S85, y que si, se encontraban enriquecidos en las fracciones C80-C85, indican un posible cambio de función ante la condición de salinidad. Dentro de esto se encuentran GO relacionados a *respuesta a estímulos con monosacáridos*, *transporte intracelular de proteína*, *localización proteica*, *transporte de proteínas* y *establecimiento de la localización sub-celular*. Los GO relacionados a componente celular que no se mantienen enriquecidos en S80-S85 son, *vesícula asociada a Golgi*, *vesícula recubierta*, y *mitocondria*. Lo cual resulta interesante, ya que estos datos podrían demostrar, que en condiciones de ausencia de sal, las proteínas contenidas en estas fracciones, participan en el tráfico vesicular y se encargan de dirigir la localización de proteínas intracelularmente, y que además pueden responder a diversos estímulos. Es posible que en las raíces de *M. crystallinum* crecidas en presencia de 200 mM de NaCl (aquí representado por las fracciones S80-S85), en las fracciones se podrían desencadenar los mecanismos de traducción de señales que regulan positivamente la respuesta de las raíces a la salinidad, como lo muestra el enriquecimiento del GO regulación positiva a estímulos en la fracción S80 y S83 (Figura 14B).

Más evidencias de lo antes expuesto, se puede observar en las proteínas que cambian de abundancia (Figura 16 y Figuras S1 a S6), en donde se observó el incremento de la abundancia en diferentes proteínas importantes para la respuesta y tolerancia a la salinidad. Un ejemplo de esto son las AQP, que como se mencionó en la **Introducción**, son importantes para contender con los cambios en la disipación de agua y necesarios para mantener la *Lp_r*. En este estudio, se encontró por análisis estadísticos y por inmunodetecciones, el incremento de abundancia de cinco AQP en estas fracciones (PIP1;2, PIP2;1, PIP2;5, PIP1;1 y PIP1;4), como consecuencia de la salinidad. Otras proteínas responsivas al tratamiento con NaCl fueron la 14-3-3 y fosfatasa 2C, que también incrementaron su abundancia, signo de la señalización que se induce la salinidad, en estas fracciones y modulo que conllevaría a la regulación de otras proteínas. Sin embargo, para comprender de forma más clara las funciones y procesos que cambian en las fracciones 80 a 85 a consecuencia del tratamiento con NaCl, se decidió hacer un

análisis de enriquecimiento de GO sobre las proteínas que cambian de abundancia (Tabla 10), este análisis sugiere que las proteínas contenidas en estas fracciones de vesícula aisladas por EZFL, son proteínas que se encuentran en su mayoría asociadas al aparato de Golgi, que funcionan en el tráfico vesicular

Debido a que el aparato de Golgi participa en el clasificado de proteínas para destinarlas a los diferentes compartimentos subcelulares, existe la posibilidad que en nuestro modelo las vesículas asociadas a este organelo sean diferentes, debido a que se conoce que las vesículas asociadas al aparato de Golgi, difieren de origen y de destino subcelular, por lo tanto, también de función (Jürgens, 2004). Por esta razón que a continuación se describen las vesículas asociadas al aparato de Golgi y las vías de tráfico subcelular en las que participan estas vesículas en las células vegetales. Además enfatiza, la función de estas vesículas relacionadas al aparato de Golgi de las cuales, se pueden haber derivado las diferentes fracciones de vesícula de membrana analizadas en este estudio proteómico. Posteriormente, se describe un modelo funcional de lo que podría estar ocurriendo en la raíz de *M. crystallinum*, en respuesta a estrés salino.

8.2 El tránsito vesicular entre el sistema endomembranal y los diferentes compartimentos subcelulares, permite el intercambio de macromoléculas.

El tránsito vesicular en las células eucariontes, permite el intercambio de macromoléculas y proteínas entre los diferentes compartimentos subcelulares y el sistema endomembranal (Bonifacio & Glick, 2004). El tránsito de moléculas entre los distintos compartimentos subcelulares ocurre a través de vesículas, las cuales, son las encargadas de mediar el transporte, desde el organelo donador hacia el organelo o compartimento destino (Bonifacio & Glick 2004, Jürgens, 2004). En la literatura se han descrito diferentes tipos de vesículas y rutas subcelulares que pueden tomar estas vesículas.

En todas las células eucariontes existen dos principales vías para realizar el tráfico intracelular de proteínas. *i)* la vía secretoria inicia en el ER, donde las proteínas son empaquetadas en vesículas y dirigidas al aparato de Golgi, donde son clasificadas y llevadas en vesículas a la membrana plasmática o a su organelo destino. Y *ii)* la vía endocítica, la cual se encarga de ajustar la composición de la membrana plasmática y reciclar los componentes proteicos de ella, por medio de la recuperación de las proteínas hacia el interior de los diferentes compartimentos intracelulares o bien enviarlas hacia su degradación (Battery *et al.*, 1999). Dentro de ambas vías de tráfico intracelular, funcionan

tres diferentes tipos de vesículas recubiertas, las vesículas tipo COPI y COPII (por sus siglas en inglés **C**oat **P**rotein); y las vesículas CCV (por sus siglas en inglés **C**lathrin **C**oated **V**esicles) (Jürgens, 2004; Barlowe, 1997). Las COPII están implicadas en el transporte anterógrado, es decir, que fluye desde el ER hacia el aparato de Golgi. Por su parte, las COPI funcionan en el transporte retrógrado, el cual es importante para la recuperación de la membrana y de las proteínas residentes del ER, y el tráfico de componentes entre las diferentes cisternas del aparato de Golgi (Angers & Merz, 2011; Sanderfoot & Raikhel, 1999). En cambio, las CCV están involucradas directamente en el tráfico endocítico, junto con los complejos proteicos llamados retrómeros y los ESCRT (por sus siglas en inglés, **E**ndosomal **S**orting **R**equired for **T**ransport), los cuales forman las vesículas luminales internas del MVB (por sus siglas en inglés, **M**ultivesicular **B**ody); también conocido como LE (por sus siglas en inglés, **L**ate **E**ndosome) en células vegetales; y participan en el tráfico endosomal, hacia la vacuola (Barlowe, 1997; Reyes *et al.*, 2011, Henne *et al.*, 2011; Contento & Bassaham, 2012). También las CCV participan en el reciclado proteico de la membrana plasmática, a través del EE (por sus siglas en inglés, **E**arly **E**ndosome), también conocido como TGN (por sus siglas en inglés, **T**rans-**G**olgi-**N**etwork) en las células vegetales (Robinson *et al.*, 2008; Contento & Bassaham, 2012).

Sin embargo la vía endocítica y exocítica, no son las únicas dentro del tráfico vesicular en las células vegetales, de hecho se ha reportado el transporte vesicular de vesículas no recubiertas, desde el ER hacia el cloroplasto (Villarejo *et al.*, 2005), desde el ER hacia los peroxisomas (Hu *et al.*, 2012; Lam *et al.*, 2010) y desde la mitocondria hacia los peroxisomas (Andrade-Navarro *et al.*, 2009).

Cada una de estas rutas de transporte vesicular, involucra una serie de procesos moleculares específicos tales como: la formación de la vesícula, el reclutamiento de las proteínas que recubren a la vesícula, la selección del o los cargos, y la escisión de la vesícula. Posteriormente, se requiere de la fusión de componentes motores a la vesícula para que esta pueda moverse a través del citoesqueleto hacia su destino final y así fusionarse con la membrana del compartimento blanco (Hwang & Robinson, 2009). La Figura 17 esquematiza las diferentes rutas de tráfico intracelular de vesículas, hasta ahora reportadas para las células vegetales.

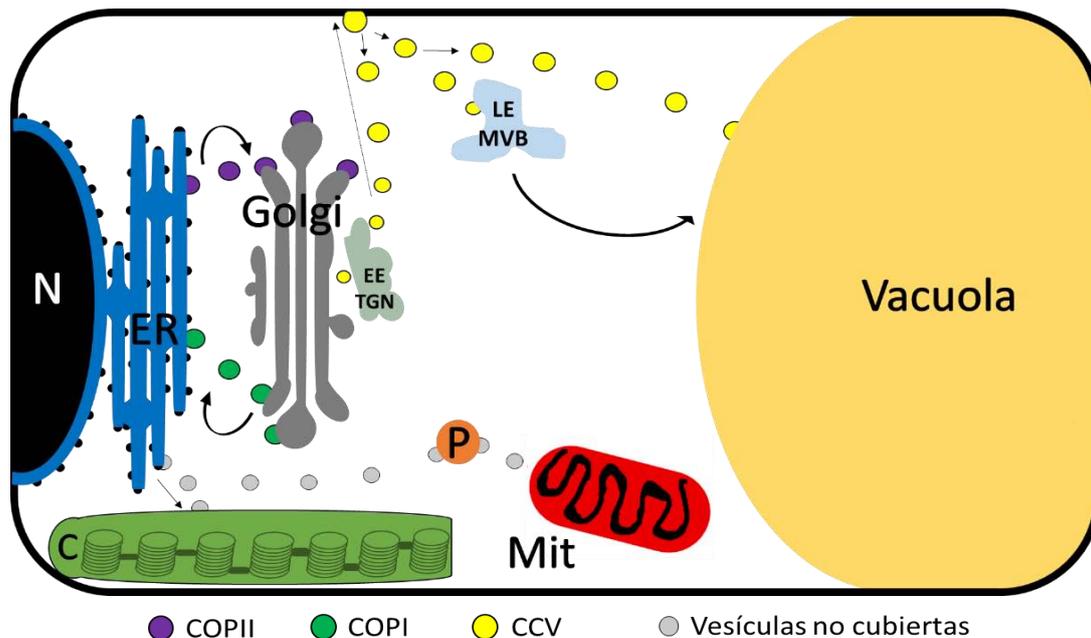


Figura 17. Rutas de transporte vesicular en plantas. Diagrama que muestra las principales rutas de transporte vesicular reportadas hasta ahora en las células vegetales. Las vesículas *COPII* median el transporte anterógrado de proteínas entre el *ER* y el *aparato de Golgi*. Las vesículas *COPI* participan en el transporte retrógrado de los cargos entre las cisternas del *aparato de Golgi* y hacia el *ER*. Las *CCV* funcionan en el vía endocítica, que conecta al *EE/TGN*, él *LE/MVB*, y a la vacuola. También existe movimiento de vesículas no recubiertas entre el *ER* hacia el Cloroplasto, del *ER* hacia el Peroxisoma y del Peroxisoma hacia la Mitocondria. La línea punteada indica el reciclamiento de los componentes proteicos internalizados por *CCV* desde el *EE/TGN* hacia la membrana plasmática (*PM*), (N) núcleo, (Mit) mitocondria, (ER) retículo Endoplásmico, (P) Peroxisoma, (C) Cloroplasto. *Para más detalles ver el texto.*

8.3 Las fracciones de vesículas de membrana analizadas por LC-MS/MS, contienen proteínas implicadas en la formación de vesículas tipo *CCV*, *COPI* y *COPII*.

En el análisis por espectrometría de masas tipo LC-MS/MS sobre las proteínas contenidas en las fracciones 80 a 85 de vesícula de membrana, permitieron identificar que en estas fracciones existen los componentes proteicos formadores de las vesículas tipo *COPI*, *COPII* y *CCV* (Tabla 1).

En todas las fracciones analizadas, se observó la presencia de las subunidades β y α formadoras de la membrana interna o coatómero interno de las vesículas tipo *COPI*, junto con las subunidades ζ y δ . Además, se encontraron también las subunidades β' y γ , que junto con la subunidad ε constituyen, el coatómero externo de estas mismas vesículas (Bonifacino & Lippincott- Schwartz, 2003). Aunado a esto, el análisis estadístico indicó que las subunidad β interna y β' externa de las vesículas *COPI*, disminuyeron su abundancia en la fracción S83 (0.6 de grado de cambio y *valor P*= 0.005 y 0.029 respectivamente), como consecuencia del tratamiento con NaCl (Tabla 7 y Figura S4)..

También se identificaron en todas las fracciones los heterodímeros SEC23/SEC24, componentes de la membrana interna de las vesículas tipo COPII (Stagg *et al.*, 2007). La presencia de los componentes estructurales de las COPI y COPII, sugiere que ambos procesos de tráfico vesicular se ubican en las fracciones de vesícula de membrana aisladas por EZFL. Lo cual indicaría que existe tránsito vesicular retrogrado por COPI y anterógrado por COPII entre estas fracciones, razón por la cual estas cinco fracciones (80 a 85) comparten un número razonable de proteínas, siendo de un 38% y de un 45% para las fracciones C y S, respectivamente (Figura 10). A su vez, en las células animales, se ha reportado la presencia de COP1 en membranas de endosomas, estos trabajos sugieren que las COPI participan en la formación y maduración del MVB, por medio de los ESCRTs (Whitney *et al.*, 1995; Aniento *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 1997; Gu & Gruenberg, 2000). Sin embargo, en nuestro trabajo no se detectaron a las proteínas marcadoras de los ESCRTs, por lo tanto se descarta que en nuestro modelo de estudio las COPI identificadas, sean las implicadas en la formación y maduración del MVB.

En las fracciones 80 a 85, se encontró la cadena pesada de clatrina o CHC (por sus siglas en inglés, **C**lathrin **H**eavy **C**hain), la cual incrementó su abundancia en la fracción S80 (1.2 de grado de cambio y *valor p* = 0.039). Además se identificaron a los complejos adaptadores de clatrina AP-1 y AP-2 (por sus siglas en inglés, **A**daptor **P**rotein) que interactúa con la clatrina y las proteínas de ensamblado de vesículas tipo CCV (Jürgens 2004). El complejo AP-1 localizado en el TGN (Levine 2002), se identificó en las fracciones 80, 83 y 85. Y el complejo AP-2, el cual participa en procesos de endocitosis desde la membrana plasmática (Bonifacino & Lippincott-Schwartz, 2003), se identificó en las fracciones 81, 80, 83 y 84. Específicamente se identificó a la subunidad μ de ambos complejos AP, esta subunidad, está encargada de reconocer la proteína cargo por medio de dominios de unión ricos en tirosina; además, se encontró que se regula positivamente en la fracción S80 (2.3 de grado de cambio y *valor p* = 0.031). Lo cual nos indica que en las raíces de *M. crystallinum* la formación de CCVs ocurre desde la membrana plasmática y el TGN, y que la abundancia de estas proteínas implicadas en la formación de CCVs se incrementa a causa de la salinidad. Lo cual sugiere que bajo estas condiciones la formación de CCVs se favorece en presencia de 200 mM de NaCl.

Otra proteína interesante que fue identificada en este análisis proteómico y que corrobora la importancia de la formación de CCV en respuesta a estrés salino, es la dinamina 2B (por sus siglas en inglés, **D**ynamin **R**elated **P**rotein 2B), la cual es una

GTPasa de la familia de las dinaminas, que anteriormente ha sido involucrada en el proceso de escisión de vesículas de CCV y en la dinámica de endomembranas (Hong *et al.*, 2003). A esta proteína la encontramos en todas las fracciones, y sólo disminuye su abundancia en la fracción S83 por salinidad, (0.3 de grado de cambio y *valor P*= 0.006).

8.4 El tráfico de proteínas por medio de vesículas CCV está regulado positivamente por el tratamiento con NaCl y permite la transducción de señales.

La presencia y el incremento en la abundancia de las proteínas CHC, y la subunidad μ de AP-1 y AP-2, en las fracciones aisladas de las raíces tratadas con NaCl, sugiere que uno de los mecanismos que las raíces de *M. crystallinum* utiliza para tolerar altas concentraciones de NaCl es la formación activa de CCVs. Esto resulta interesante ya que como se mencionó anteriormente, la principal función biológica de las CCV s es dentro de la vía endocítica, movilizand o proteínas de la PM o desde el TGN hacia los diferentes compartimentos intracelulares, lo cual lleva al recambio y reciclamiento proteico de ambos componente celulares (Levine, 2002). Lo que implica que en las raíces de *M. crystallinum* este mecanismo celular, se utiliza para realizar el ajuste de la composición proteica y lipídica de la PM y/o del TGN bajo condiciones de estrés salino.

Otra proteína que apoya la presencia y regulación de CCVs en la raíz de *M. crystallinum* bajo condiciones de salinidad, es la dinamina, DRP2B, que fue identificada en todas las fracciones analizadas por MS/MS. Esta proteína ha sido analizada por proteómica y por análisis de microscopía tipo VIAFM (por sus siglas en inglés, **V**ariable **I**ncidence **A**ngle **F**luorescent **M**icroscopy) y se ha demostrado que está asociada a la membrana plasmática, específicamente en los sitios de formación de vesículas CCV, que permite la escisión y maduración de estas (Fujimoto *et al.*, 2010). La proteína DRP2B contiene dos dominios característicos; el dominio PRD (por sus siglas en inglés, **P**roline **r**ich-**d**omain), rico en prolina y el dominio PH (por sus siglas en inglés, **P**leckstrin **H**omology) (Shepetner *et al.*, 1996; Vallis *et al.*, 1999). El dominio PRD, interacciona con los dominios tipo SH3 (por sus siglas en inglés, **S**rc-**H**omology), contenidos en las proteínas con dominios SH3 o SH3Ps. Esta interacción es la responsable del reclutamiento de la DRP al sitio de formación de las vesículas tipo CCV (Vallis *et al.*, 1999; Lam *et al.*, 2001). En nuestro análisis se encontraron dos proteínas SH3Ps en las fracciones C81, C83, C85 y S85. Una disminución de la cantidad de esta proteína se detectó en la fracción S85 a consecuencia del tratamiento con NaCl (0.4 de grado de cambio y *valor P*= 0.0025).

Las proteínas tipo SH3Ps no sólo interactúan con los dominios tipo PRD de las DRP, sino también con los filamentos de actina, en sitios de unión diferentes a los dominios SH3 (Lam *et al.*, 2001). Esto nos indica que las SH3Ps pueden interactuar con las proteínas encargadas de la maduración y en la escisión de las CCVs (por ejemplo, DRP), pero también con los componentes del citoesqueleto encargados del transporte intracelular de las vesículas. Evidencia de que esto ocurre en nuestro modelo de estudio es la presencia en todas las fracciones de la Actina-1, y particularmente la isoforma X1 de actina en las fracciones S80-S85. X1, aumentó su abundancia en la fracción S82 (2.6 de grado de cambio y valor $P= 0.047$). Existen reportes que muestran que la pérdida de los dominios SH3 induce sensibilidad a NaCl (Colwill *et al.*, 1999). Un ejemplo de esto es la pérdida del dominio RVS167p, el cual es un homólogo al dominio SH3 en levadura, y que al igual que este, está asociado a la regulación del citoesqueleto de actina y al tráfico vesicular. La pérdida de este dominio en levadura resultó en sensibilidad a NaCl y problemas de endocitosis, los cuales fueron revertidos al complementar la cepa deficiente en el dominio RVS167p, con el dominio SH3 de *Arabidopsis thaliana* (Colwill *et al.*, 1999; Lam *et al.*, 2001). Sin embargo también se ha demostrado que la proteína SH3P1 de *A. thaliana*, une específicamente al ácido fosfático (PA por sus siglas en inglés, **P**hosphatidic **A**cid), al fosfatidil-inositol-4 fosfato [PI4P] y al fosfatidil-inositol-4,5 bifosfato [PI(4,5)P2] (Moreau *et al.*, 1998; Lam *et al.*, 2001). Lo cual conlleva a implicaciones funcionales, ya que estos fosfoinosítidos, son reguladores claves para mediar y reclutar a las proteínas formadoras de vesículas (Levine, 2002). Por ejemplo el [PI(4,5)P2], es el componente que recluta activamente a la PM al complejo AP-2, para iniciar la formación de la vesícula CCV (Holstein 2002). Los fosfoinosítidos además han sido ampliamente relacionados a la respuesta a estrés salino y osmótico, específicamente incrementando la biosíntesis de fosfoinosítidos, lo cual conlleva a inducir la respuesta al estrés y la regulación del tráfico vesicular en *A. thaliana* (Lam *et al.*, 2001; Levine 2002; Dove *et al.*, 1997; Pical *et al.*, 1999). También se ha demostrado que [PI(4,5)P2] se asocia a vesículas CCV en respuesta a estrés salino en esta misma especie (Munnik & Vermeer 2010). Estos reportes y los resultados que nosotros observamos en las fracciones de la raíz de *M. crystallinum* aisladas por EZFL, son bastante contrastantes. Ya que en respuesta a salinidad las fracciones C80 a C85, sufren un cambio en la composición y abundancia proteica (S80 a S85), que se refleja en el cambio de enriquecimiento de GO, de una condición a otra (Figuras 13 y 14) y en el enriquecimiento de GO de las proteínas que cambian de abundancia (Tabla 10), en donde observamos que en condiciones de no tratamiento con

sal las proteínas contenidas en las fracciones 80 a 85 son proteínas componentes o residentes del aparato de Golgi y microtúbulos, en donde funcionan en transporte de moléculas y proteínas, además responden a estímulos externos. Sin embargo en condiciones de salinidad, las proteínas contenidas en las fracciones S80 a S85 se confinan también a proteínas de la PM, del tonoplasto y en la vacuola; y funcionalmente, transducen señales celulares, responden positivamente a estímulos externos y sufren modificaciones por lípidos. En base a estos resultados y los reportes previos para las vesículas de CCV y sus moléculas reguladoras (por ejemplo, dinamina, SH3P, actina y fosfoinosítidos), proponemos que en nuestro modelo de estudio, la internalización de proteínas desde la membrana plasmática hacia el tonoplasto o al interior de la vacuola, es un proceso clave, para permitir la remodelación de la membrana plasmática y del tonoplasto, y así poder contender con la salinidad; incluso se podría plantear la hipótesis que a través de vesículas tipo CCV es que se lleva a cabo el proceso de remoción y reciclado de proteínas de la membrana plasmática quizá hacia la vacuola y/o aparato de Golgi, vesículas que además permiten la señalización del estrés al interior de la célula, por medio de proteínas como las 14-4-4 y fosfoinosítidos. Más evidencia de este modelo, y específicamente en la producción de moléculas señalizadoras a partir de fosfoinosítidos en las fracciones bajo estudio, es la presencia de la Fosfolipasa C, que hidroliza [PI(4,5)P₂] para formar Inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG), en las fracciones C85 y S80, S82 y S83. El DGA originado en esta reacción es fosforilado por la cinasa de diacilglicerol (DGK) produciendo PA (Munnik & Vermeer, 2010). La DGK fue también identificada en las fracciones C81, C82, C85 y en todas las fracciones S, (S80 a S85). Además, se observó la presencia de la Fosfolipasa D δ en las fracciones C83, C85 y S80 a S84, la cual también produce PA, pero a partir de fosfolípidos estructurales y ha sido ampliamente relacionada al crecimiento de la raíz en condiciones de salinidad (Bargmann *et al.*, 2009; Munnik *et al.*, 2010). Esto resulta interesante debido a que el PA es el segundo mensajero lipídico más importante reportado hasta ahora en plantas (Testerink & Munnik 2005). Aunado a que la presencia de estas proteínas (Fosfolipasa C, D y DGK), es en un mayor número de fracciones aisladas de la condición de salinidad (S), en comparación a su presencia en fracciones aisladas de la condición sin sal (C), lo cual se relaciona con una mayor producción de PA en las fracciones S, lo cual ha sido observado en respuesta a condiciones de salinidad en otra especies vegetales (Testerink & Munnik 2005). El incremento del PA para producir eventos de señalización en plantas, es una respuesta fisiológica muy temprana, que ocurre típicamente en los primeros 5 a 15 minutos después del estímulo, como el estrés osmótico

causado por condiciones de salinidad (Pical *et al.*, 1999; Testerink & Munnik 2005; Bargmann *et al.*, 2009). Se ha reportado también, que el incremento transitorio de PA, permite controlar la señalización y evitar hipersensibilidad al estrés, cosa que no ocurre en variedades o cultivares sensibles a estrés por NaCl (Racagni *et al.*, 2003). Es posible que en nuestro modelo de estudio, ocurra lo mismo, es decir que exista un incremento de PA rápido y transitorio; razón la cual no se encontraron cambios de abundancia en las fracciones homólogas, por ejemplo cuando se comparan las fracciones C80 y S80, sobre las enzimas Fosfolipasa C, Fosfolipasa D y DAGK, productoras del PA señalizador. Sin embargo, todas las enzimas productoras de PA, se identificaron en un mayor número de fracciones S, en comparación con su presencia en las fracciones C.

La actividad de la Fosfolipasa C, crea DAG e IP3. El IP3 es otra molécula importante para la señalización intracelular, ya que la liberación de este compuesto en el citosol ocasiona la liberación de Ca^{2+} en el citoplasma (Schumaker & Sze, 1987). La señalización por Ca^{2+} a través de la actividad de la Fosfolipasa C, es primordial. Un ejemplo de ello fue reportado por Parre *et al.*, 2007, quienes documentaron que en condiciones hiperosmóticas causadas por estrés iónico, es necesaria la actividad de la Fosfolipasa C y la liberación posterior del Ca^{2+} intracelular a causa del producto IP3, para que ocurra la acumulación de prolina en el citoplasma de *A. thaliana*, el cual funciona osmoprotector (Parre *et al.*, 2007). Se ha reportado además que el incremento en la concentración de Ca^{2+} , no sólo conlleva a mecanismos de señalización, si no también induce la despolimerización de los filamentos de actina (F-actina) (Munnik & Testerink, 2009), lo cual resulta inconveniente para el modelo propuesto, en donde los filamentos de F-actina, son primordiales para la movilización de vesículas CCV. Sin embargo, dentro de las proteínas de unión a actina o ABPs (por sus siglas en inglés, **A**ctin **B**inding **P**roteins), existe un grupo de proteínas denominadas Villinas, las cuales modulan y regulan la ruptura de F-actina por medio su dominio sensible a Ca^{2+} y que altas concentraciones de Ca^{2+} promueven la nucleación de G-actina, para formar F-actina (Yakota, 2005). En nuestra lista de proteínas identificadas encontramos a la Villina 2 isoforma 1, la cual aparece en la fracción S82 a causa del tratamiento con NaCl (INF y *valor P*= 0.027). Análogamente la fracción S82 es justamente la fracción en donde se incrementa la abundancia de actina, a causa del tratamiento con NaCl (Figura S3), además es una de las fracciones en donde se identifica a la Fosfolipasa C, por lo cual se puede postular que la presencia y la actividad de la Fosfolipasa C induce la liberación de Ca^{2+} intracelular, que desestabiliza a los filamentos

de actina. Para estabilizarlos, la función de la Villina es necesaria, ya que promueve la nucleación de G-actina a F-actina, para así mantener la integridad de los microfilamentos, sobre los cuales se mueven las vesículas CCV. Sin embargo, habría de probar que efectivamente la Villina 2 y la actina de *M. crystallinum* interactúan, y que en presencia de NaCl, la villina ayuda a mantener el arreglo de los microfilamentos.

8.5 La salinidad provoca una dinámica de acuaporinas McPIP1 y McPIP2 en la raíz de *M. crystallinum*.

El ajuste de la composición proteica de las diferentes membranas celulares por medio del transporte de proteínas a través de vesículas intracelulares, es un proceso indispensable para percibir y responder favorablemente a condiciones de estrés (Levine, 2002; Holstein, 2002). Anteriormente se ha demostrado que la regulación diferencial de las AQP por medio de tráfico vesicular en *M. crystallinum* es un proceso fundamental para responder a estrés salino y osmótico. En nuestro análisis se identificaron en prácticamente todas las fracciones a las AQP, PIP1;1, PIP1;5, PIP2;1, PIP2;5, PIP1;2 y PIP1;4; las cuales además sufrieron cambio de abundancia en las fracciones S80 a S83. De hecho, la AQP que cambio en todas estas fracciones S, es la AQP PIP2;5, en la cual el aumento de abundancia proteica incrementa a medida que se avanza en el número de fracción; su cambio en la fracción S80 y S83 es de 1.3 y de 2.1, respectivamente (Tabla 11). La fracción S83 fue además, la fracción en donde se ubicaron el resto de las AQP que cambian de abundancia por NaCl. En esta fracción (S83) se incrementó la abundancia de las AQP PIP1;1, PIP1;2, PIP1;4 y PIP2;1 (Tabla 12). Lo cual no sólo se observó por el análisis estadístico *in silico*, sino también por inmunodetecciones tipo Western Blot (Figura 16A; Tabla 8). Lo cual nos confirma que efectivamente, el incremento de abundancia de estas AQP es un efecto de las condiciones a las que se sometieron las raíces de *M. crystallinum*.

Tabla 11. La acuaporina McPIP 2;5 incrementa su abundancia conforme se avanza de la fracción S80 a S83, aisladas por EZFL.

PIP2;5	S80	S81	S82	S83
Valor-P	0.027	0.019	0.033	0.0072
Grado de cambio	1.3	1.5	1.9	2.1

La tabla muestra el Valor-P y el grado de cambio de McPIP2;5 en las fracciones S80, S81, S82 y S83. Nótese que al avanzar ascendentemente sobre las fracciones, el Valor-P cada vez es más significativo y su grado de cambio es mayor.

Tabla 12. La fracción S83 es la fracción que contiene el mayor número de AQP, diferencialmente reguladas.

AQP (S83)	Grado de cambio “<i>In silico</i>”	Grado de cambio “<i>Western Blot</i>”
PIP1;1 (0.05)	1.6	NA
PIP1;2 (0.022)	2	3.88
PIP1;4 (0.038)	2	3.41
PIP2;1 (0.02)	2	2.09
PIP2;5 (0.0072)	2.1	5.44

La tabla muestra las AQPs tipo PIP que incrementaron su abundancia en la fracción S83. Entre paréntesis se muestra el Valor-P con el cual fueron identificadas como proteínas significativas biológicamente. Además se muestra el grado de cambio que se obtuvo para estas AQPs en la validación experimental. NA indica que no se corroboró por Western Blot el cambio de abundancia proteico.

Diversos estudios se han enfocado en comprender la participación de las AQP en la tolerancia a la salinidad. Dentro de estos estudios se ha utilizado plantas glicófitas y halófitas como organismos modelos. En ambos casos, se ha demostrado que el tráfico vesicular de las AQP es una forma de regular su función, por ejemplo la AQP *McTIP1;2* bajo condiciones de estrés osmótico, se relocaliza del tonoplasto a cuerpos multivesiculares (MVB), lo cual puede contribuir con la homeostasis osmótica en *M. crystallinum* (Vera-Estrella *et al.*, 2004). Para miembros de la familia PIP de AQP, también se ha demostrado que el tráfico intracelular en vesículas tipo CCV, COPII y en asociación a balsas lipídicas es una respuesta al estrés salino (Li *et al.*, 2012; Dhonukshe *et al.*, 2007; Chaumont & Tyerman, 2014).

La evidencia que se disponen hasta ahora sobre la AQP PIP2;1 de la glicófitas *A. thaliana* (*AtPIP2;1*), es que esta proteína sufre de endocitosis mediada por CCV (Chaumont & Tyerman, 2014). En donde la fosforilación sobre el residuo de serina 283 en la región carboxi-terminal de la *AtPIP2;1*, es importante para que esta llegue a la PM, sin embargo, la forma no fosforilada de este residuo provoca que la AQP se internalice en respuesta a salinidad (Prak *et al.*, 2008). Esta proteína también experimenta reciclamiento activo en respuesta a condiciones de salinidad, mientras que en condiciones control de crecimiento no es tan activo (Martiniere *et al.*, 2012). Además, la mutación del residuo diacídico DVE por AVA de *AtPIP2;1* provoca su retención en el RE, y la expresión de esta versión mutada de *AtPIP2;1* induce una disminución en la conductividad hidráulica de la raíz (L_p) en las plantas transgénicas al compararlas con las silvestres, lo cual es un reflejo de su actividad inherente para la absorción de agua en la raíz de *A. thaliana* (Sorieul *et al.*,

2011). En la halófito *M. crystallinum* también se dispone de información acerca de la AQP *McPIP2;1*, esta incrementa su abundancia como consecuencia de estrés iónico y osmótico. También se conoce que esta proteína permite el aumento de la permeabilidad al agua en los protoplastos cercanos a la punta de la raíz bajo estas mismas condiciones de estrés abiótico (Amezcu-Romero, 2012). Esta proteína además, cuando se encuentra en la membrana plasmática se fosforila en residuos de serina, y los niveles de fosforilación incrementan en esta proteína a causa de estrés iónico. Aunado a esto, como anteriormente se mencionó, la *McPIP2;1* también se ubica sub-celularmente en el tonoplasto, RE y aparato de Golgi. Bajo condiciones de salinidad la abundancia de esta proteína en estos compartimentos también incrementa pero su ubicación no cambia, de hecho no se ha reportado la internalización de esta proteína a causa de estrés salino (Vera-Estrella *et al.*, 2004, Amezcu-Romero, 2012). A partir de estos datos, se puede observar claramente diferencia en los procesos de regulación sobre la AQP *PIP2;1* entre la glicófita *A. thaliana* y la halófito *M. crystallinum*. Lo más contrastante es que en la glicófita la *PIP2;1* se internaliza y desfosforila a causa de estrés salino, fenómeno que no ocurre en la halófito donde incluso incrementa su abundancia y su estado de fosforilación, lo cual está ampliamente relacionado al aumento en la permeabilidad al agua en la raíz (dado por la L_p). Mantener la L_p es una forma de evadir la deshidratación, la cual es un efecto directo del estrés salino y por lo tanto una forma de tolerancia a la salinidad característica de la halófito *M. crystallinum*.

Diversos datos experimentales han revelado que las AQP no sólo forman homotetrámeros (Fontiadis *et al.*, 2001), si no también heterotetrámeros (Harvengt *et al.*, 2000). En maíz, la localización de *ZmPIP1* es afectada del RE a la membrana plasmática, cuando se co-expresan en protoplastos de mesófilo junto con la *ZmPIP2*, la cual es residente de la membrana plasmática (Zelazny *et al.*, 2007), además la co-inyección de *ZmPIP1* y *ZmPIP2* en ovocitos de *X. leavis*, produce un efecto sinérgico en la permeabilidad al agua (Fetter *et al.*, 2004). Fenómeno que también se ha observado para la co-inyección *McPIP1;4* y *McPIP2;1* (Hernández, 2007). Aunado a que recientemente se ha demostrado que las AQP *McPIP2;1* y *McPIP1;4* forman heterooligómeros (Rosas & Vera-Estrella, 2015 datos sin publicar). Por lo cual podría postularse que la razón por la cual en la fracción 83 se observan a todas las *PIP1* identificadas y que aumentan (Tabla 12), es que las AQPs *McPIP2;1*, y *McPIP2;5* forman heterooligómeros que inducen la relocalización de las *PIP1*, *McPIP1;1*, *McPIP1;2*, *McPIP1;4* de vesículas relacionadas al aparato de Golgi

hacia el tonoplasto y la membrana plasmática (Figuras 15, 16 y Tabla 12). Lo cual es posible ya que esta fracción contiene toda la maquinaria necesaria para la formación de vesículas CCV y COPII, las cuales son las dos vías que pueden dirigir el tráfico de AQP hacia estos compartimentos. De hecho se ha reportado que los motivos diacídicos contenidos en las PIP son importantes para la interacción y asociación de estas AQP, con la proteína SEC24 formadora de las vesículas COPII y encargadas del movimiento anterógrado de proteínas (Miller *et al.*, 2003), esta sugerencia requiere futuros experimentos para ser comprobada. De hecho anteriormente no se habían identificado a la McPIP1;2 como responsiva al tratamiento con NaCl, lo cual fue investigado en el contenido de proteína total (Amezcu-Romero, datos sin publicar).

8.6 Modelo de la regulación de acuaporinas por medio de la endocitosis dependiente de clatrina.

Debido a que se identificaron proteínas necesarias para la formación de CCV (CHC, AP1, AP2, DRP, y SH3P), la presencia de proteínas productoras de fosfoinosítidos, por la identificación de receptores implicados en la endocitosis dependiente de clatrina, como SERK3 (por su nombre en inglés, **S**omatic **E**mryogenesis **R**eceptor **K**inase 3; Heese *et al.*, 2007) y por la dinámica de AQP tipo PIP1 y PIP2 (Tabla 7 y 8). Se planteó que la endocitosis de AQPs de la raíz de *M. crystallinum* requiere de la formación de CCV en la membrana plasmática, por medio del complejo AP2 y los receptores SERK3 (Figura 18). Este mecanismo a su vez es necesario para el reciclamiento activo de las AQPs entre la membrana plasmática y el TGN durante eventos de salinidad (Marnitere *et al.*, 2012). Una vez en el TGN, las AQPs regresan a la membrana plasmática a través de CCVs formadas por medio del complejo AP1, lo cual permite mantener la abundancia de AQPs en la membrana plasmática a través del reciclaje activo entre la membrana plasmática y el TGN. Este modelo se apoya por la identificación de proteínas marcadoras de la membrana plasmática (AHA3) y el TGN (VHA-A) y proteínas GTPasa de la familia Rab, las cuales son las proteínas reguladoras del movimiento vesicular entre el TGN y la membrana plasmática (Tabla 1; Feraru *et al.*, 2012). Además esta vía podría estar implicada en la llegada de los heteroligómeros de AQPs PIP1 y PIP2 a la membrana plasmática (Tabla 12). Demostrar este modelo del reciclaje activo de las AQP durante condiciones de salinidad, significaría un adelanto en la en el estudio de las AQP y sus formas de regulación en plantas halófitas.

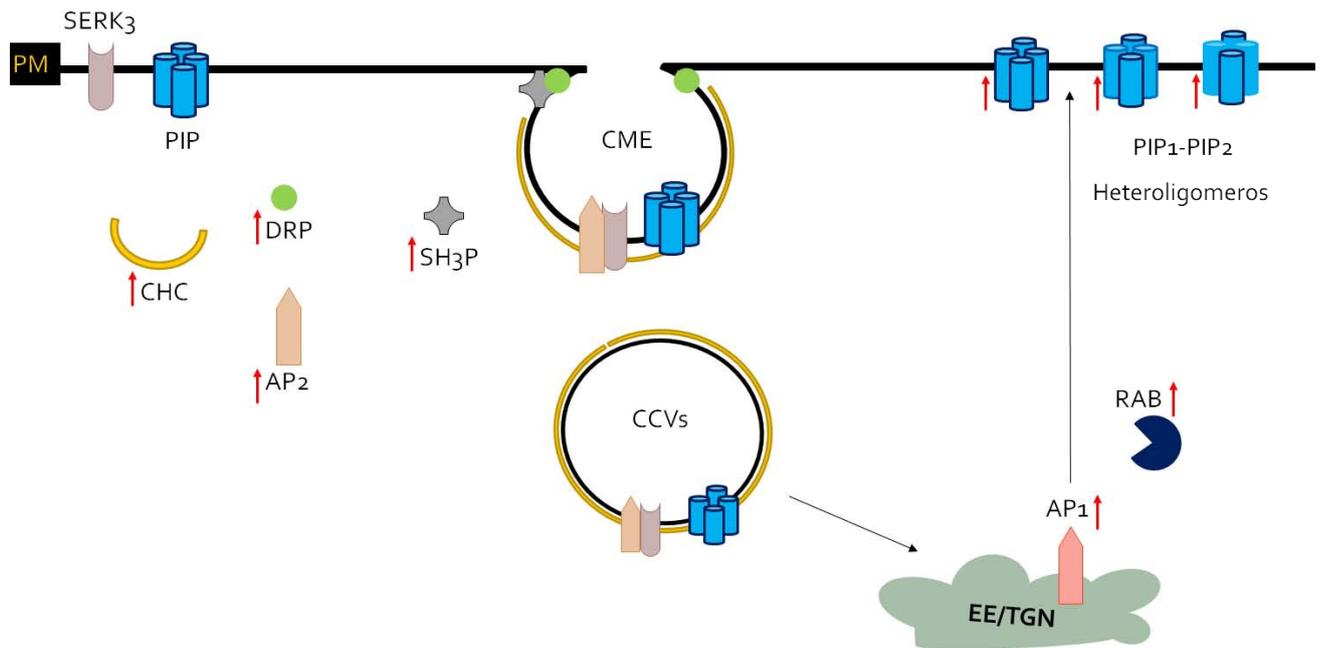


Figura 18. Modelo del reciclaje activo entre la membrana plasmática y el TGN de AQPs. La Figura muestra los componentes identificados por LC-MS/MS (CHC, AP2, SH3P, DRP, SERK3) implicados en la endocitosis dependiente de CCVs. En base a los resultados obtenidos se sugiere que las AQPs se reciclan entre la membrana plasmática (PM) y el TGN, gracias a su endocitosis dependiente de CCVs, y su reciclamiento en el TGN por medio del complejo AP1 y las GTPasas tipo RAB. Las flechas rojas indican proteínas que incrementan de abundancia en las fracciones S80 a S85. Las flechas negras indican el sentido del movimiento de las CCVs que transportan a las AQPs entre la PM y el TGN. Para más detalles del modelo ver el texto.

8.7 Las fracciones de vesículas de membrana 80 a 85, contiene vesículas en diferentes estados de maduración o en etapa de tránsito intracelular.

A continuación se describen los componentes motores implicados en la escisión y fusión de vesículas COPI, COPII y CCVs que se identificaron en este estudio proteómico (Tabla 13).

En todas las fracciones se detectaron, tanto las proteínas tipo GTPasa (por sus siglas en inglés, **G**uanosine **T**riphosphatases), que hidrolizan GTP, para formar GDP; como a sus activadores GEF (por sus siglas en inglés, **G**uanine nucleótido **E**xchange **F**actor), que intercambia el GDP formado por la GTPasa a GTP y permiten la continuidad de la actividad (Jürgens 2004). La importancia de haber identificado este tipo de proteínas, se debe a que son indispensables para el reclutamiento de las proteínas formadoras de vesículas recubiertas. Por ejemplo, el reclutamiento de las proteínas SEC23/SEC24 y SEC31/SEC13 para formar las vesículas tipo COPII requiere la función de la GTPasa tipo SAR1 (por sus siglas en inglés **S**ecretion-**a**ssociated and **R**as-related) y su GEF, SEC12. En este estudio se encontró en todas las fracciones analizadas, a la proteína RABA1f, la

cual es el sinónimo en plantas de la proteína SAR1 (d'Enfert C *et al.*, 1992; Bar-Peled & Raikhel, 1997). Además, esta proteína incremento su abundancia (1.3 de grado de cambio y *valor-P*= 0.027) en la fracción S80. Por otro lado, la familia de GTPasa tipo RABA1, ha sido involucrada en el transporte de vesículas CCV entre el TGN y la PM. Una mutación doble dominante de RABA1b mostró un fenotipo de hipersensibilidad a estrés salino en plantas de *A. thaliana* (Asaoka *et al.*, 2013). Lo que apoya la importancia de haber identificado a miembros de esta familia de GTPasas (RABA1) en la raíz de *M. crystallinum* en presencia de NaCl. Otro tipo de GTPasa implicadas en la gemación (budding) de vesículas, son las GTPasa tipo ARF (por sus siglas en inglés, **A**DP **R**ibosylation **F**actors), las cuales son proteínas que permiten la biogénesis de vesículas COPI, salientes del aparato de Golgi; y de CCVs encargadas del tráfico post-aparato de Golgi (Zhu *et al.*, 1998; Jürgens 2004). Sus activadores ARF-GEF, son intercambiadores de nucleótidos de guanina sensibles a la droga Brefeldina A (BFA) (Jackson & Casanova 2000). En este trabajo se identificaron a los factores de ribosilación ARF1 en todas las fracciones y a un intercambiador de nucleótidos sensible a BFA. Además, para dirigir el destino de una proteína a través de las vesículas COPI, COPII y CCV, es necesaria la participación de señales o receptores encargados de ordenar a las vesículas, un ejemplo de ellos son los VSR (por sus siglas en inglés, **V**acuolar **S**orting **R**eceptor), los cuales interaccionan con las proteínas solubles, para que estas pueden ser incluidas a las vesículas en formación y así poder ser enviadas a sus organelos destino, además de que los residuos de tirosina que reconoce la subunidad μ de los complejos AP, están contenidos en estas proteínas tipo VSR (Jorre-Dupas *et al.*, 2004; Hyangju & Inhwan, 2014). Nosotros identificamos dos tipos de VSRs en todas las fracciones analizadas, el VSR3 y el VSR13, el cual además disminuyo su abundancia en la fracción S85 (0.7 de grado de cambio y *valor p*=0.034). Finalmente para que la vesícula recubierta pueda fusionarse con su membrana destino, se ha documentado la existencia de las proteínas tipo SNARE (por sus siglas en inglés, **S**oluble**N**SF **A**ttachment Protein **R**eceptor). Las cuales permiten la fusión de la vesícula con su membrana destino, por medio de la interacción de dos o tres Q-SNARE o SNARE blanco y un R-SNARE o SNARE de vesícula (Jürgens, 2004; Jahn *et al.*, 2003). El SNARE identificado en este estudio como único para las fracción C83, indica que es una proteína que desaparece como consecuencia del tratamiento con NaCl en la fracción S83 (0 y *valor P*= 00.25).

La importancia de la presencia, ausencia o cambio de abundancia de las proteínas anteriormente introducidas, se debe a que al seguir su dinámica a lo largo de las fracciones 80 a 85, junto con la dinámica de los componentes de las vesículas tipo COPI, COPII y CCVs (Tabla 11). Es posible notar que existe un comportamiento diferencial de todas estas proteínas en las diferentes fracciones, es decir, cada fracción contiene los componentes estructurales y motores de las vesículas COPI, COPII y CCVs, pero cada fracción responde diferencialmente al tratamiento con NaCl. Por ejemplo, el aumento de abundancia de la cadena pesada de clatrina, CHC ocurre solamente en la fracción S80, la disminución de los componentes formadores de las vesículas COPI, ocurre solamente en la fracción S83, fracción en la cual también disminuye la abundancia de la dinamina DRP2B, implicada en la escisión de vesículas CCV y desaparece el único SNARE identificado a causa del tratamiento con NaCl. Por otro lado, los componentes de las vesículas COPII que se ubican en todas las fracciones, no cambia su abundancia a lo largo de las cinco fracciones analizadas. Fenómeno que no aplica para la GTPasa motora RABA1f de las vesículas COPII, la cual fue identificada en todas las fracciones, pero en la fracción S80 se incrementa a causa de la salinidad. Estas observaciones se hacen más evidentes al ver la dinámica de la isoforma de actina identificada (Actina X1) y de la proteína villina, que son importantes para la movilización de vesículas a lo largo del citoesqueleto. Mientras que la actina se ubica en todas las fracciones, es justamente la fracción S82 donde se incrementa su abundancia y dónde aparece la villina de manera conjunta. Toda esta información nos indica que cada fracción posee características propias, y responde de manera diferente ante condiciones de salinidad. Por esta razón, nos permitimos proponer que cada fracción representa un estado de maduración vesicular o en diferentes etapas de tránsito intracelular. Esto también se observa en el incremento de abundancia progresivo de la AQP PIP2;5 a medida que se avanza en el número de fracción (Tabla 11) y en el cambio de enriquecimiento de los GO relacionados a componente celular entre las fracciones que provienen de la condición control y aquellas que provienen de la condición de tratamiento con NaCl (Figura 13 y 14). Es más creemos que la mayor actividad relacionada al tráfico vesicular se ubica entre las fracciones 80 a 83, ya que son las que poseen enriquecimiento de aparato de Golgi en ambas condiciones de crecimiento, pero además son las fracciones S, que también se enriquecen en tonoplasto, membrana plasmática y vacuola (Figura 14). Además, dado a que la fracción 83 es donde se observan el mayor número de proteínas que cambian de abundancia y donde disminuye la abundancia de las subunidades de COPI, la dinamina y desaparece el SNARE y donde

se incrementa de forma mayoritaria las AQP, creemos que es esta fracción es la que contiene las vesículas tipo COPI, COPII y CCVs más maduras o que llevan el cargo dentro de su ruta de tráfico intracelular. Sin embargo, más estudios deberán de realizarse para corroborar esta hipótesis. Y ser corroborado de manera *in vitro* e *in vivo*, el fraccionamiento de microsomas por EZFL representaría una metodología novedosa para la obtención y el estudio de las vesículas de membrana implicadas en el tráfico intracelular.

Tabla 13. Las fracciones 80 a 85 poseen vesículas de membrana con componentes implicados en tráfico vesicular y en diferente estado de maduración o de tránsito intracelular.

Enriquecimiento GO de fracciones control (C80-85)	Golgi TP	Golgi TP	Golgi y vesícula asociada TP	Golgi	Mitocondria	Microtúbulo
<i>No. de Fracción</i>	80	81	82	83	84	85
Tipos de vesículas identificadas	CCV ↑ COPII COPI	CCV COPII COPI	CCV COPII COPI	CCV COPII COPI ↓	CCV COPII COPI	CCV COPII COPI
GTPasa de CCV	Dinamina	Dinamina	Dinamina	Dinamina ↓	Dinamina	Dinamina
GTPasa de COPI y CCV	ARF1	ARF1	ARF1	ARF1	ARF1	ARF1
GTPasa de COPII	RABA1f ↑	RABA1f	RABA1f	RABA1f	RABA1f	RABA1f
Factor de fusión vesicular				SNARE ◀		
Microfilamentos y ABP	Actina	Actina	Actina ↑ Villina ▶	Actina	Actina	Actina
Reclutamiento de GTPasa de CCV y filamentos de actina		SH3P		SH3P		SH3P ↓
Receptores de cargos vacuolares	VSR	VSR	VSR	VSR	VSR	VSR ↓
AQPs	PIP2;5 ↑	PIP2;5 ↑↑	PIP2;5 ↑↑↑	PIP2;5↑↑↑↑ PIP2;1 ↑ PIP1 ↑	PIP2 y PIP1	PIP2 y PIP1
Enriquecimiento GO fracciones sal (S80-85)	Golgi TP	Golgi TP PM Simplasto	Vacuola	Golgi TP PM Vacuola	Intrínseco de membrana	TP PM Vacuola

La fila superior de la tabla muestra enriquecimiento de GO de componente celular de las fracciones C80 a C85, y la inferior S80 a S85. El símbolo de flechas hacia arriba (↑) y hacia abajo (↓) indican aumento y disminución de abundancia, respectivamente. La flecha hacia la izquierda (◀) indica que la proteína desaparece, y la flecha hacia la derecha (▶) que aparece a causa del tratamiento con NaCl de la raíz de *M. crystallinum*. TP (tonoplasto).

8.8 Proteínas identificadas en las fracciones 80 a 85 que cambian su abundancia; y reportadas como proteínas importantes para la tolerancia a la salinidad.

Además de la identificación de proteínas importantes para la tolerancia a la salinidad como las AQP en las fracciones 80 a 85, también se identificaron proteínas diferencialmente reguladas e implicadas en funciones relacionadas al transporte de moléculas e iones, procesos de señalización, metabolismo de azúcares, chaperonas, proteasas, histonas, proteínas ribosomales, entre otras. A continuación sólo se discutirá la funcionalidad de algunas de estas proteínas, en el contexto de la tolerancia a la salinidad en *M. crystallinum*.

Las proteínas 14-3-3, fueron un tipo de proteínas identificadas y que incrementan de abundancia en las fracciones. Estas proteínas han sido reportadas como proteínas reguladoras de eventos de señalización y activadoras de proteínas efectoras, por medio de interacciones proteína-proteína. Se ha examinado además, que estas proteínas ayudan a la formación de complejos proteicos, debido a su capacidad de actuar como adaptadores moleculares (Roberts *et al.*, 1992; 2002). En nuestro análisis encontramos 4 isoformas de proteínas 14-3-3, las cuales se encontraron en todas las fracciones, siendo en la fracción 84, donde se incrementó la abundancia de la isoforma *SGF14h* (2.6 de grado de cambio y *valor-P*= 0.026), lo cual también fue validado por "Western blot" (Figura 16). Las 14-3-3, se han reportado también, como proteínas que sufren de redistribución subcelular al exponerse a estrés osmótico (Chelysheva *et al.*, 1999). De hecho en la literatura existen reportes que han demostrado que en fracciones enriquecidas en membrana plasmática, la proteína 14-3-3 se asocia con la H⁺-ATPasa por medio de su región carboxilo terminal e induce y promueve el incremento de la actividad de esta bomba, lo cual lleva a la hiperpolarización de la membrana, a la toma de iones K⁺ por medio de canales certificantes y al incremento en la absorción de agua; lo que induce el ajuste del potencial de membrana en respuesta a condiciones ambientales estresantes (Kinoshita & Shimazaki 1990; Booij *et al.*, 1999; Chelysheva *et al.*, 1999). Sin embargo, en nuestro modelo la proteína 14-3-3 responsiva al tratamiento con NaCl, y por ende a condiciones de estrés osmótico, se identificó en la fracción 84, la cual se caracterizó por ser la fracción con un mayor número de componentes proteicos relacionados a la mitocondria (Figura 13). Hasta ahora se han identificado diferentes clases de proteínas de respuesta a estrés abiótico que interactúan con las proteínas 14-3-3; dentro de estas proteínas, se encuentra la ATP sintasa F₁F₀ de la mitocondria y del cloroplasto (Bunney *et al.*, 2001). En donde la unión de la 14-3-3 con la

subunidad β del dominio F_1 , provoca la formación de un complejo que inhibe la función de la ATP sintasa (Bunney et al., 2001). Ambas proteínas (14-3-3 y ATP sintasa), fueron identificadas en la fracción 84, lo cual resulta interesante ya que esta fracción está enriquecida con el GO de componente celular de mitocondria. Aunado a que la abundancia de la 14-3-3 aumenta en esta fracción, pero disminuye la abundancia de las subunidades α , β_1 y β_2 de la ATP sintasa identificadas en esta fracción (Figura S4), es posible que al igual que los reportes anteriores indican; en *M. crystallinum*, también ocurre una regulación de la ATP sintasa por medio de las proteínas 14-3-3. Sin embargo habría de verificarse *in vivo*, que efectivamente la 14-3-3 en respuesta a estrés salino, interactúa con la ATP sintasa de las mitocondrias de la raíz de *M. crystallinum*, lo cual provoca una disminución de su actividad, en respuesta a estrés salino. Por otro lado habría de profundizar sobre las consecuencias fisiológicas de la interacción de estas dos proteínas y sus repercusiones durante eventos de estrés osmótico.

Otra proteína regulada por la actividad de la 14-3-3, es la Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PD, por sus siglas en inglés **G**lyceraldehyde-**3**-**p**hosphate **d**eshydrogenase). La interacción entre la G3PD y la 14-3-3, es una forma de mantener a la G3PD en estado activo, cuando existen condiciones de estrés por falta de nutrientes (Moorhead et al., 1999). Lo cual resulta interesante, ya que la G3PD fue identificada en todas las fracciones, pero su abundancia disminuyó en la fracción 82 (0.5 de grado de cambio y valor-P= 0.026) a causa de la salinidad, sin embargo en la fracción 84 donde la abundancia y por lo tanto la actividad de la 14-3-3 incrementa, la G3PD anteriormente disminuida en la fracción 82 (Figura S3) en la fracción 84 incrementa su abundancia en respuesta a sal (5.2 de grado de cambio y valor-P =0.0079) (Figura S5). Estos resultados son bastante interesantes ya que posiblemente existe regulación diferencial de la G3PD por medio de las proteínas 14-3-3 dependiendo a que sitio subcelular donde estén confinadas ambas proteínas. Sin embargo, la presencia de ambas proteínas y los cambios de abundancia de la G3PD también podrían ser ajenos a la presencia de la 14-3-3 en la fracción S84. Son necesarios estudios experimentales para descartar cualquiera de las dos posibilidades.

La G3DP, no fue la única enzima glucolítica encontrada en nuestro análisis, la enzima enolasa también se identificó en todas las fracciones secuenciadas por LC-MS/MS; además se observó el aumento de abundancia proteica de esta enzima, en las fracciones 80, 83 y 84 (1.8; 2.3; 5.8 de grado de cambio y Valor-P= 0.056; 0.012 y 0.002,

respectivamente). Anteriormente se ha implicado a esta enzima en la tolerancia a la salinidad en *M. crystallinum* (Barkla *et al.*, 2009). En este reporte se demostró que la enolasa se asocia a la subunidad B de la V-ATPasa regulando su actividad, y conjuntamente con la aldolasa, incrementan su afinidad por el ATP. Además, ambas proteínas incrementan su abundancia proteica en respuesta a estrés iónico (Barkla *et al.*, 2009). El rol fisiológico de la asociación de la enolasa y la aldolasa con la V-ATPasa durante el estrés iónico; se abordó desde una vista de eficiencia energética, ya que la V-ATPasa se encuentra sujeta a mayor demanda de ATP para poder generar la suficiente fuerza protón motriz a través del TP y realizar el transporte activo secundario de iones y moléculas hacia el interior de la vacuola, lo cual es un aspecto primordial para secuestrar el exceso de Na⁺ (Barkla *et al.*, 2009). La aldolasa también fue identificada como una proteína contenida en todas las fracciones que estudiamos, pero no se encontraron cambios significativos entre la condición de ausencia y de tratamiento con NaCl, de hecho, el análisis *in silico*, mostró que existía un grado de cambio de 2 en la fracción S83 en comparación con la C83 en la aldolasa, pero su *valor-P* no era significativo. Para validar este resultado se hizo una detección tipo "Western blot", la cual confirmó que efectivamente esta proteína no aumenta su abundancia en las fracciones S83 y S84 (Figura 16). Este resultado es interesante ya que el aumento proteico y la actividad regulatoria positiva sobre la enolasa y la aldolasa en la V-ATPasa esta reportada para fracciones de vesícula aisladas por EZFL correspondientes al tonoplasto de células de la parte aérea de *M. crystallinum*. Lo cual indica que la actividad e interacción de estas enzimas glicolíticas con la V-ATPasa es diferente entre los tejidos de la raíz y los de la parte aérea de esta halófito. Para confirmarlo será necesario probarlo en las fracciones de EZFL correspondientes a vesículas de membrana de TP, pero a partir de microsomas de raíz, y no sobre fracciones enriquecidas en aparato de Golgi y componentes implicados en tráfico vesicular, razón por la cual también podrían ser diferentes los resultados aquí obtenidos y los reportes previos.

Otra enzima metabólica encontrada y responsiva a salinidad contenida en las fracciones, es la **Serina Hidroximetil transferasa** (SHMT), esta proteína fue identificada en las fracciones C80, C83 y en todas las fracciones S. La abundancia de SHMT incrementó en las fracciones S80, S82, S83 y S84 (1.8, 2.6, 2.3 y 5.8 de grado de cambio y *valor-P*= 0.056, 0.009, 0.0012 y 0.002, respectivamente), en comparación a su abundancia en las mismas fracciones control. Se validó por inmunodetecciones tipo "Western blot" el cambio

de abundancia de esta enzima en las fracciones 83 y 84 resultados que reforzaron que efectivamente las fracciones S83 y S84, poseen mayor abundancia de esta proteína, que las fracciones C83 y C84 (Figura 16). SHMT es una enzima dependiente de piridoxal 5-fosfato, que cataliza la interconversión de serina y tetrahidrofolato (THF) a glicina y N⁵-N¹⁰ metil-THF (Schirch *et al.*, 1985). En plantas, SHMT es una enzima que participa en la fotorespiración junto con el complejo de descarboxilación de glicina para interconvertir glicina y serina en la mitocondria de las hojas (Bauwe *et al.*, 2010). A pesar de que en tejidos no-fotosintéticos, como las raíces, no ocurre la fotorespiración, la SHMT ha sido reportada como una proteína presente en este tipo de tejidos vegetales, e incluso a los mismo niveles de abundancia que en la parte aérea (Walton & Woolhouse, 1986). Dado a que no ocurre fotorespiración en las raíces, se piensa que la serina sintetizada por medio de la fotorespiración en la parte aérea de la planta es transportada por el floema para suministrar a la raíz con este compuesto, en donde la interconversión de serina a glicina ocurre gracias a la actividad de la SHMT (Ros *et al.*, 2012). Debido a esto, es posible que podemos observar su presencia en las fracciones de vesícula aisladas de la raíz de *M. crystallinum*, sin embargo, unir el incremento de su abundancia y su actividad enzimática en estas fracciones de vesícula de raíz es más complejo; y esto se debe a que la SHMT también se ha reportado como una enzima inducida a nivel proteico por estrés abiótico y biótico, (Moreno *et al.*, 2005; Rungarron *et al.*, 2012) pero todas estas observaciones se han hecho utilizando las hojas de la planta, es decir, en células que llevan a cabo la fotorespiración. De estos estudios, se ha llegado a la conclusión de que la actividad de la SHMT en condiciones de estrés por NaCl en células de las hojas, es importante para evitar la muerte celular por daño oxidativo ocasionado por la acumulación de ROS (por sus siglas en inglés, **R**eactive **O**xigen **S**pecies) (Moreno *et al.*, 2005). Zhou y colaboradores (2012) demostraron que la actividad de SHMT en hojas de *A. thaliana* bajo condiciones de salinidad, está regulada por una proteasa de ubiquitina (UBP16), la cual desubiquitina a la SHMT para evitar su degradación por el proteosoma 26S, y regula su estabilidad y actividad. En plantas mutantes en *shm1* de *A. thaliana* el estrés salino induce la acumulación excesiva de ROS, y la mutante de *ubp16* acumula altas concentraciones de Na⁺ y poco K⁺ intracelular, en comparación con las plantas silvestres, a partir de estos datos los autores concluyen que bajo condiciones de salinidad la actividad de la proteasa de ubiquitina UBP16 es indispensable para evitar la degradación de la SHMT por el proteosoma 26S, la cual evita el daño oxidativo por ROS, desempeñando su función en la fotorespiración y en el ciclo de un carbono (Moreno *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2012).

Interesantemente en nuestro estudio sobre las fracciones de vesícula de raíz de *M. crystallinum*, también se identificó a una proteasa específica de ubiquitina, específicamente a la UBP 19C. Su presencia fue solamente en fracciones S81, S83, S84 y S85. También se identificaron varias subunidades del Proteosoma 26S (ver Tabla 1), las cuales estuvieron presentes tanto en fracciones obtenidas de raíces mantenidas en condiciones de ausencia, como en raíces sometidas a tratamiento con NaCl. A partir de estos datos, y los reportes antes expuestos, es posible suponer que el cambio de abundancia de la SHMT en las fracciones S, de la raíz *M. crystallinum*, es causada por un mecanismo parecido a la reportado para las células de las hojas de la glicófita *A. thaliana*. Hacer más implicaciones en cuanto a la función de la SHMT y su aumento en la raíz es difícil, debido a la falta de estudios sobre la función de esta proteína en las raíces de plantas y sus implicaciones biológicas en la tolerancia a la salinidad. Sin embargo, lo que si queda claro es que en las raíces de *M. crystallinum*, esta proteína es responsiva a condiciones de salinidad. Más esfuerzos deberán hacerse para elucidar la participación de la enzima SHMT en el metabolismo de tejidos no-fotosintético y su papel en la tolerancia a la salinidad en plantas halófitas.

M. crystallinum es una planta con metabolismo C3, el cual cambia a metabolismo CAM (por sus siglas en inglés, **C**rassulacean **A**cid **M**etabolism) en la etapa adulta del ciclo de vida o por condiciones de estrés salino, sequía, bajas temperaturas y exceso de irradiación solar (Adams *et al.*, 1998). El metabolismo CAM es una forma de adaptación bioquímica para evitar la pérdida de agua por evapotranspiración en condiciones ambientales áridas, lo cual ocurre a través del cierre de estomas durante el día. En la noche las plantas tipo CAM, los estomas se abren para permitir la fijación de CO₂ atmosférico. El CO₂ es almacenado en la vacuola en forma de ácido málico, el cual es utilizado durante el día para la formación de esqueletos carbonados por medio del ciclo de Calvin (Lüttge 2000). En el metabolismo CAM las enzimas PEPC (por su nombre en inglés, **P**hospho**e**nol**p**yruvate **C**arboxylase) y PEPCK (por su nombre en inglés, **P**hospho**e**nol**p**yruvate **C**arboxy**k**inase) son fundamentales. La PEPC cataliza la conversión del fosfoenolpiruvato y CO₂ a oxalacetato en el citosol. Y la enzima PEPCK, cataliza la descarboxilación del malato, dando como resultado piruvato y CO₂ (Nimmo, 2000). El oxalacetado formado por acción de la enzima PEPC, es rápidamente reducido en malato por la actividad enzimática de NAD⁺- Malato Deshidrogenasa (MDH) mitocondrial o citoplasmática, este malato entonces se acumula en las vacuolas en forma de ácido málico

(Nimmo 2000). Las enzimas PEPC, PEPCK-1 y MDH mitocondrial fueron identificadas en todas las fracciones de vesícula de membrana C y S estudiadas por LC-MS/MS. La PEPCK y MDH, presentaron cambios significativos de abundancia en las fracciones S82, S83 y S85. Mientras que la PECK disminuye su abundancia en todas estas fracciones; la MDH desaparece en la fracción S82, en la S83 incrementa su abundancia y en la fracción S85 aparece por el tratamiento con NaCl. Estos resultados indican que existe una regulación diferencial de la enzima MDH en la raíz de *M. crystallinum*, no sólo en respuesta al tratamiento con NaCl, sino también dependiendo en que fracción se encuentran esta enzima. Esto podría ser un reflejo de la regulación metabólica a través de la compartimentalización celular, lo cual se ha descrito como fundamental en el metabolismo tipo CAM y específicamente en el metabolismo en el que participa la mitocondria; la cual representa una reserva de metabolitos diferenciales entre la membrana interna y la externa (Bowsher & Tobin, 2001). Lo antes expuesto, se puede observar en nuestros resultados del enriquecimiento de GO de componente celular en la fracción C84, los cuales indicaron que está enriquecida particularmente en componentes mitocondriales, específicamente la membrana interna de la mitocondria y la envoltura mitocondrial (Figura 13). Pero, resulta interesante que en la fracción S84 no cambian la abundancia de la proteína MDH mitocondrial, pero si en las fracciones anteriores S82, S83 y en la subsecuente S85, lo cual podría estar relacionado a la regulación biológica de la MDH por medio de tráfico vesicular u otras vías celulares. Por otro lado, la función biológica de los cambios de abundancia de las enzimas MDH y PEPCK puede ser el resultado de la regulación del metabolismo CAM. Sin embargo hacer más aseveraciones al respecto resulta difícil dado a la falta de estudios a nivel de la raíz, sobre estas proteínas; más esfuerzos deberán hacerse para entender el rol fisiológico de ambas proteínas al nivel de la raíz sobre todo durante eventos de estrés abiótico.

9. CONCLUSIONES

La purificación de fracciones de membrana, provenientes de microsomas aislados de la raíz de la halófito *M. crystallinum*, por medio de la EZFL, permitió la caracterización de estas fracciones tanto en condiciones de ausencia y presencia de 200 mM de NaCl. A partir de estos datos, se logró identificar que:

1. Las fracciones están constituidas por más de un tipo de endomembrana, es decir, no constituyen un sólo compartimento subcelular, sino es un compartimento

formado por proteínas características de diferentes tipos de membranas subcelulares.

2. Las proteínas contenidas en estas fracciones funcionan en el tráfico vesicular por medio de vesículas tipo CCV, COPI y COPII.
3. La identificación de las proteínas que cambian de abundancia en estas fracciones, corroboró que estas responden a condiciones de salinidad y constituyen elementos importantes para la remodelación de la membrana plasmática y del tonoplasto por medio de CCVs, COPI y COPII.
4. El análisis *in vitro* a través de "Western blots", permitió corroborar el cambio de abundancia las proteínas SHMT, 14-3-3, aldolasa, *McPIP1;2*, *McPIP2;1*, *McPIP1;4* y *McPIP2;5* identificadas por los análisis *in silico*.
5. Las fracciones investigadas, también contienen proteínas implicadas en la tolerancia a la salinidad, las cuales son distribuidas, recicladas o relocalizadas por medio de los diferentes componente implicados en tráfico intracelular de macromoléculas (COPI, COPII y CCVs), también identificados en estas fracciones de membrana.

En base a lo antes expuesto, se concluye que, el análisis por proteómica comparativa, hecho en las fracciones de vesícula de raíz caracterizadas por poseer carga negativa de *M. crystallinum* en condiciones de ausencia o presencia de 200 mM de NaCl, permitió la identificación de su naturaleza o composición y además, del entendimiento de su dinámica cuando hay condiciones de salinidad, esto en base a la hipótesis plateada previamente.

10. PERSPECTIVAS

1. Identificar la localización de estas fracciones *in vivo*, en el aparato de Golgi, o en los diferentes componentes implicados en tráfico vesicular.
2. Corroborar que la salinidad induce el cambio de función de estas fracciones *in vivo*, por medio del uso de mutantes afectadas en alguna de las proteínas responsivas a NaCl identificadas en este análisis proteómico.
3. Analizar por complementación de la fluorescencia, que los componentes relacionados al tráfico vesicular de la raíz de *M. crystallinum* (por ejemplo, CCV, COPI y COPII) interactúan con proteínas claves para la tolerancia a la salinidad de esta halófito como las AQP, y modula directamente su localización en los diferentes compartimentos subcelulares.

4. Demostrar que la Villina 2 y la actina de *M. crystallinum* interactúan, y que en presencia de NaCl, la villina ayuda a mantener el arreglo de microfilamentos.
5. Comprobar que el tráfico intracelular en vesículas tipo CCV, COPII y su asociación a balsas lipídicas, es una respuesta a la salinidad en *M. crystallinum* y si este fenómeno se detecta en otras halófitas y glicófitas.
6. Demostrar por ensayos de interacción proteínas-proteínas que las acuaporinas de la raíz de *M. crystallinum* son endocitadas por medio de vesículas de CCVs, y que el reciclamiento de AQP por esta vía dependiente de clatrina es más activa si se somete a la raíz de esta planta a eventos de salinidad.
7. Identificar si el complejo adaptador AP1 está involucrado en el reciclamiento de AQP de regreso a la membrana plasmática.
8. Verificarse *in vivo* que efectivamente la 14-3-3 en respuesta a estrés salino, interactúa con la ATP sintasa de las mitocondrias de la raíz de *M. crystallinum*.
9. Elucidar la participación específica de la enzima SHMT en el metabolismo de tejidos no-fotosintético y su papel en la tolerancia a la salinidad en plantas halófitas
10. Demostrar que la fracción 83 contiene las vesículas tipo COPI, COPII y CCVs maduras encargadas de llevar los cargos a su destino final.

11. LITERATURA CITADA

- ❖ Adams P, Nelson DE, Yamada S, Chamra W, Jensen RG, Bohnert HJ & Grifficths H (1993). Growth and development of *Mesembryanthemum crystallinum* (Arizoaceae). *New phytologist* 138:171-190.
- ❖ Adams P, Thomas JC, Vernon DM, Bohnert HJ & Jensen RG (1992). Distinct cellular and organismic responses to salt stress. *Plant Cell Physiology* 33:1215-1223.
- ❖ Alexandersson E, Fraysse L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U & Kjellbom P (2005). Whole gene family expression and drought stress regulation of Aquaporins. *Plant Molecular Biology* 59:469-484.
- ❖ Altschul SF, Gish W, Miller EW & Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 5:403-410
- ❖ Amezcua Romero JC (2012). Estudio de la función, distribución y regulación de la acuaporina McPIP2;1 de *Mesembryanthemum crystallinum* en respuesta a salinidad y estrés osmótico. Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias Bioquímicas. UNAM.
- ❖ Andrade-Navarro MA, Sánchez-Pulido L & McBride HM (2009). Mitochondrial vesicle: an ancient process providing new links to peroxisomes. *Current Opinion in Cell Biology* 21:560-567
- ❖ Angers CG & Merz AJ (2011). New links between vesicle coats and Rab-mediated vesicle targeting. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22:18-26.

- ❖ Aniento F, Gu F, Parton RG & Gruenberg J (1996). An endosomal beta COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes. *J Cell Biol* 133:29-41.
- ❖ Aroca R, Porcel R & Ruiz LM (2012). Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *Journal Experimental Botany* 63:43-57.
- ❖ Aroca R, Tognoni F, Irigoyen JJ, Sanchez D. M & Pardossi A (2001). Different root low temperature response of two maize genotypes differing in chilling sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry* 39:1067-1073.
- ❖ Asaoka A, Uemura T, 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 *The Plant Journal* 73:240-249.
- ❖ Bantscheff M & Shirle M (2007). Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389:1017-1031.
- ❖ Bargmann BO, Laxalt AM, ter Riet V, van Schooten B, Merquiol E, Testerink C, Haring MA, Bartels D & Munnik T (2009). Multiple PDLs required for high salinity and water deficit tolerance in plants. *Plant Cell Physiology* 50:78-89.
- ❖ Barkla BJ, Vera-Estrella R, Hernandez-Coronado M. & Pantoja O (2009). Quantitative Proteomics of the Tonoplast Reveals a Role for Glycolytic Enzymes in Salt Tolerance. *Plant Cell* 21:4044-4058.
- ❖ Barkla BJ, Vera-Estrella R & Pantoja O (2007). Enhanced Separation of Membranes during Free Flow Zonal Electrophoresis in Plants. *Analytical Chemistry* 5181-5187.
- ❖ Barkla BJ, Vera-Estrella R, Maldonado G. M & Pantoja O (1999a). Abscisic Acid Induction of Vacuolar H⁺-ATPase Activity in *Mesembryanthemum crystallinum* is Developmentally Regulated. *Plant Physiology* 120:811-819.
- ❖ Barkla BJ, Vera-Estrella R, Pantoja O, Kirch HH & Bohnert HJ (1999b). Aquaporins localization: How valid are TIP and PIP labels? *TRENDS in Plant Science* 4:86-88.
- ❖ Barlowe C (1997). Coupled ER to Golgi transport reconstituted with purified cytosolic proteins. *The Journal of Cell Biology* 139:1907-1108.
- ❖ Bar-Peled M & Raikhel NV (1997). Characterization of AtSEC12 and AtSar1. Proteins likely involved in endoplasmic reticulum and Golgi transport. *Plant Physiol* 114:315-324.
- ❖ Battery NJ, James NC, Greenland AJ & Brownlee C (1999). Exocytosis and endocytosis. *The Plant Cell* 11: 643-659.
- ❖ Bauwe H, Hagemann M & Fernie AR (2010). Photorespiration: players, partners and origin. *TRENDS Plant Science* 15:330-336.
- ❖ Besserer A, Burnotte E, Bienert GP, Chevalier AS, Errachid A, Grefen Ch, Blatt MR & Chaumont F (2012). Selective regulation of Maize Plasma Membrane Aquaporins Trafficking and Activity by SNARE SYP₁₂₁. *The Plant Cell* 24:3463-3481.
- ❖ Biela A, Grote K, Otto B, Hoth S, Hedrich R & Kaldenhoff R (1999). The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *The Plant Journal* 18:565–570.
- ❖ Binns D, Dimmer E, Huntley R & Barrell, D (2009). QuickGO: a web-based tool for gene ontology searching. *Bioinformatics* 25:3045–3046.
- ❖ Blaha G, Stezl U, Spahn CTM, Agrawal RK, Frank J & Nierhaus KH (2000). Preparation of functional ribosomal complexes and effects of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. *Methods in Enzymology* 317:292-309.
- ❖ Blumwald E, Aharon GS & Apse MP (1999). Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465:140-151.
- ❖ Bonifacio JS & Glick BS (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusión. *Cell* 116:153-166.

- ❖ Bonifacio JS & Lippincott-Shawartz J (2003). Coat proteins: Shaping membrane transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 409-4014.
- ❖ Booij PP, Roberts MR, Vogelzang SA, Kraayenhof R & de Boer AH (1999). 14-3-3 proteins double the number of outward-rectifying K⁺ channels available for activation in tomato cells. *The Plant Journal* 20:673-683.
- ❖ Bowsher CG & Tobin AK (2001). Compartmentation of metabolism within mitochondria and plastids. *Journal of Experimental Botany* 52:513-527
- ❖ Brandford M (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- ❖ Breckels LM, Gatto L, Chistoforou A, Groen AJ, Lilley KS & Trotter MW (2013). The effect of organelle discovery upon-sub-cellular protein localisation. *Journal of Proteomics* 88:129-140.
- ❖ Bunney TD, van Walraven HS & de Boer AH (2001). 14-3-3 proteins is a regulator of the mitochondrial and chloplast ATP syntase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:4249-4252.
- ❖ Carrillo P, Grazia M, Pontecorvo G, Fuggi A & Woodrow P (2011). Salinity Stress and Salt Tolerance. *In Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations* 2:21-38.
- ❖ Chaumont F & Tyerman S (2014). Aquaporins: Highly Regulated Channels Controlling Plant Water Relations. *Plant Physiology* 164:1600-1618.
- ❖ Chelysheva VV, Smolenskaya GS, Trofinova MC, Babakov AV & Muromtsev GS (1999). Role of the 14-3-3 proteins in the regulation of H⁺-ATPase activity in the plasma membrane of suspension-cultured sugar beet cells under cold stress. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 456:22-26.
- ❖ Chen T, Cai X, Wu X, Karahara I, Schreiber L & Ling J (2011). Casparian strip development and its potential function in salt tolerance. *Plant Signaling & Behaviour* 6:1499-1502.
- ❖ Ciavatta VT, Morillon R, Pullman GS, Chrispeels MJ & Cairney J (2001). An aquaglyceroporin is abundantly expressed early in the development of the suspensor and the embryo proper of loblolly pine. *Plant Physiology* 127:1556-1567.
- ❖ Colwill K, Field D, Moore L, Friensen J & Andrews B (1999). In vivo analysis of the domains of yeast Rvs167p suggests RVS167p function is mediated through multiple protein interactions. *Genetics* 152:881-893.
- ❖ Conesa A & Götz S (2008). Blast2GO: A Comprehensive Suite for Functional Analysis in Plant Genomics. *International Journal of Plant Genomics* 2008:1-13.
- ❖ Conesa A, Götz S, Garcia-Gomez J. M, Terol J, Talon M & Robles M (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21:3674-3676.
- ❖ d'Enfert C, Gensse M & Gaillardin C (1992). Fission yeast and plant have functional homologues of Sar1 and Sec12 proteins involved in ER to Golgi traffic in budding yeast. *The EMBO Journal* 11:4205-4011.
- ❖ Danielson JHA & Johanson U (2008). Unexpected complexity of the Aquaporins gene family in the moss *Phycomistrella patens*. *BMC Plant Biology* 8:1-16
- ❖ de Oliveira BA, Mendes-Alencar NL & Gomes-Filho E (2013). Comparison between the water and salt stress effects on plant growth and development. *Response of Organism to Water Stress* 1:67-93.
- ❖ Dean RM, Rivers RL, Zeidel ML & Roberts DM (1999). Purification and functional reconstitution of soybean nodulin 26. An Aquaporin with water and glycerol transport properties. *Biochemistry* 38:347-353.
- ❖ Devenport R, James R, Zakrisson-Plogander A, Tester M & Munns R (2005). Control of Sodium Transport in Durum Wheat. *Plant Physiology* 137:807-818.

- ❖ Dhonukshe P, Aniento F, Hwang I, Robinson DG, Mravec J, Stierhof YD & Friml J (2007). Clathrin mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in Arabidopsis. *Current Opinion in Biology* 17:520-527.
- ❖ Dove SK, Cooke FT, Douglas MR, Sayers LG, Parker PJ & Mitchell RH (1997). Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis. *Nature* 390:187-192.
- ❖ Fetter K, Van Wilder V, Moshelion M & Chaumont F (2004). Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *The Plant Cell* 16:215–228.
- ❖ Fisher RA (1922). On the interpretation of X^2 from contingency tables, and the calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society* 85:87-94.
- ❖ Flowers TJ & Colmer TD (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New phytologist* 179: 945-959.
- ❖ Fontiadis D, Jenö P, Mini T, Wirtz S, Müller SA, Fraysse L, Ljellbom P & Engel A (2001). Structural characterization of two aquaporins isolated from native spinach leaf plasma membranes. *Chemistry & Biology-Journal* 276:1707-1714.
- ❖ Frigerio L, Hinz G & Robinson D (2008). Multiple vacuoles in plant cells: rule or exception? *Traffic* 9:1564-1570.
- ❖ Fujimoto M, Arimura S, Ueda T, Takanashi H, Hayashi Y, Nakano A & Tsutsumi N (2010). Arabidopsis dynamin-related protein DR2B and DR1A participate together in clathrin-coated vesicle formation during endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:6094-6099.
- ❖ Gerbeau P, Guclu J, Ripoche P & Maurel C (1999). Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant J.* 18:577-587.
- ❖ Grattana SR & Grieveb CM (1999). Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Horticulturae* 78:127-157.
- ❖ Greenway H & Munns R (1980). Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Reviews in Plant Physiology* 31:149-90.
- ❖ Greenway H & Osmond CB (1972). Salt Responses of Enzyme from Species differing in Salt Tolerance. *Plant Physiology* 49:256-259.
- ❖ Gupta AB & Sankaramakrishnan R (2009). Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective. *BMC Plant Biol* 9:134.
- ❖ Gu F & Gruenberg J (2000). ARF1 regulates pH-dependent COP functions in the early endocytic pathway. *Chemistry & Biology-Journal* 275:8154-8160.
- ❖ Gu F, Aniento F, Parton RG & Gruenberg J (1997). Functional dissection of COP-I subunits in the biogenesis of multivesicular endosomes. *The Journal of Cell Biology* 139:1183-1195.
- ❖ Guenther JF & Roberts DM (2000). Water-selective and multifunctional aquaporins from *Lotus japonicus* nodules. *Planta* 210:741–748.
- ❖ Hachez C, Zelazny E & Chaumont F (2006). Modulating the expression of aquaporins genes in plants: a key to understand their physiological functions?. *Biochemistry Biophysica Acta* 1758:1142-1156.
- ❖ Hanba YT, Shibasaki M, Hayashi Y, Hayakawa T, Kasamo K, Terashima I & Katsuhara M (2004). Overexpression of the barley aquaporin *HvPIP2;1* increases internal CO₂ conductance and CO₂ assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant Cell Physiology* 45:521-529.
- ❖ Harvengt P, Vlerick A, Fuck B, Wttiez R, Ruyschaert JM & Homble F (2000). Lentil seed aquaporins form a hetero-oligomer which is phosphorylated by a Mg²⁺-dependent and Ca²⁺-regulated kinase. *Biochemistry Journal* 352:183-190.
- ❖ Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK & Bohner HJ (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Reviews in Plant Physiology & Plant Molecular Biology* 51: 463-499.

- ❖ Henne WM, Bunchkovich NJ & Emr SD (2011). The ESCRT pathway. *Developmental Cell* 21:77-91.
- ❖ Hernández Domínguez E (2007). Tesis de Maestría. Programa de Ciencias Bioquímicas.
- ❖ Hertel A & Steudle E (1997). The function of water channels in Chara internodes provides evidence for composite membrane transport and for a slippage of small organic solutes across water channels. *Planta* 202:324-335.
- ❖ Heymann JB & Engel A (1999). Aquaporins: phylogeny, structure and physiology of water channels. *News in Physiological Sciences* 14:187-194.
- ❖ Higinbotham N (1973). Electropotentials of Plant Cells. *Annuals Reviews in Plant Physiology*. 24:25-26
- ❖ Hoagland D.R. & Arnon DI (1938). The water culture method for growing plants without soil. *Californian Experimental Station Circular* 347:1-39.
- ❖ Holm LM, Jahn TPMoller AL, Schjoerring JK, ferri D, Klaerke DA & Zeuthen T (2005). NH₃ and NH₄⁺ permeability in aquaporins-expressing Xenopus oocytes. *Pflügers Arch.* 450: 415-438.
- ❖ Holstein Susanne EH (2002). Clathrin and Plant Endocytosis. *Traffic* 3: 614-620.
- ❖ Hong Z, Bednarek SY, Blumwald E, Hwang I & Jürgens G (2003). A unified nomenclature for *Arabidopsis* dynamin-related large GTPases based on homology and possible functions. *Plant Molecular Biology* 53:261-265.
- ❖ Horie T, Karahara I & Katsuhara M (2012). Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central focus in rice plants. *Rice* 5:11.
- ❖ Hove MR & Bhave M (2011). Plant Aquaporins with non-aqua functions: deciphering the signature sequences. *Plant Molecular Biology* 75: 413-430.
- ❖ Hu J, Baker A, Bartel B, Linka N, Mullen TR, Reumann S & Zolman B (2012). Plant Peroxisomes: Biogenesis and Function. *The Plant Cell Journal* 24:2279-2303.
- ❖ Hwang I & Robinson GD (2009). Transport vesicle formation in plant cells. *Current Opinion Plant Biology* 12:660-669.
- ❖ Hyangju K & Inhwan H (2014). Vacuolar Sorting Receptor-Mediated Trafficking of Soluble Vacuolar Proteins in Plant Cells. *Plants* 3:392-408.
- ❖ Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J & Mann M (2005). Exponentially Modified Proteins Abundance Index (emPAI) for Estimation of Absolute Protein Amount in Proteomics by the Number of Sequenced Peptides per Protein. *Molecular & Cellular Proteomics* 4:1265-1272.
- ❖ Jackson CL & Casanova JE (2000). Turning on ARF: the SEC7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *TRENDS in Cell Biology* 10:60-67.
- ❖ Jahn GY, Lang T & Südhof TC (2003). Membrane fusion. *Cell* 112:519-533.
- ❖ Jahn TP, Moller AL, Zeuthen T, Holm LM, Klaerke DA, Mohsin B, Kuhlbrandt W & Schjoerring JK (2004). Aquaporins homologues in plants and mammals transport ammonia. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 574:31-26.
- ❖ Javot H, Lauvergeat V, Santoni V, Martin-Laurent F, Güçlü J, Vinh J, Heyes J, Franck KI, Schäffner AR & Bouchez D (2003). Role of a single Aquaporins isoform in root water uptake. *The Plant Cell* 15:509-522.
- ❖ Johanson U, Karlsson M, Gustavsson S, Sjoval S, Fraysee L, Weig AR & Kjellbom P (2001). The complete set of genes encoding Major Intrinsic Proteins In *Arabidopsis* provides a framework for new nomenclature for Major Intrinsic Proteins in plants. *Plant Physiology* 126: 1358-1369.
- ❖ Jorre-Dupas, Gomord V & Paris N (2004). Protein localization in the plant Golgi apparatus and the trans-Golgi network. *Cell and Molecular Life Sciences* 61:159-171.

- ❖ Jouyban Z (2012). The Effects of Salt Stress on Plant Growth. *Technical Journal of Engineering Applied Sciences* 2:7-10.
- ❖ Jürgens G (2004). Membrane Trafficking in Plants. *Annual Review in Cell and Developmental Biology* 20:481-504.
- ❖ Kaldenhoff R, Bertl A, Otto B, Moshelio M & Uehlein N (2007). Characterization of Plant Aquaporins. *Methods in Enzymology* 428:505-526.
- ❖ Katsuhara M & Hanba YT (2008). Barley plasma membrane intrinsic proteins (PIP Aquaporins) as water and CO₂ transporters. *Pflugers Arch* 456:687-691.
- ❖ Kestler HA, Müller A, Kraus JM, Buchholz M, Gress MT, Liu H, Zeeberg RB & Weinstein NJ (2007). VennMaster's: Area-proportional Euler diagrams for functional GO analysis of microarrays. *BMC Bioinformatics* 9:67.
- ❖ Kinoshita T & Shimazaki K (1999). Blue light activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *The EMBO Journal* 18:5548-5558.
- ❖ Kirch HH, Vera-Estrella R, Golldack D, Quigley F, Michalowski CB, Barkla BJ & Bohnert HJ (2000). Expression of water channel proteins in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiology* 123:111-124.
- ❖ Klebl F, Wolf M & Sauer N (2003). A defect in the yeast plasma membrane urea transporter Dur3p is complemented by CpNIP1, a Nod26-like protein from zucchini (*Curcubita pepo* L.) and by *Arabidopsis thaliana* delta-TIP and gamma-TIP. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 547:69-74.
- ❖ Kosov K, Prsil IT & Vtmvs P (2013). Protein Contribution to Plant Salinity Response and Tolerance Acquisition. *International Journal of Medical Sciences* 14:6757-6789.
- ❖ Koyro H-W (2006). Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L). *Environmental and Experimental Botany* 56:136-146.
- ❖ Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- ❖ Lam B, Sage T, Bianchi F & Blunwald E (2001). Role of SH3 Domain-Containing Proteins in Clathrin-Mediated Vesicle Trafficking in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 13:2499-2512.
- ❖ Lam SK, Yoda N & Schekman R (2010). A vesicle carrier that mediates peroxisome protein traffic from the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:2153-21528.
- ❖ Läuchli A & Grattan SR (2007). Plant growth and development under salinity stress. In *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops Springer*: 1-32.
- ❖ Levine A (2002). Regulation of stress responses by intracellular vesicle trafficking? *Plant Physiology Biochemistry* 40:531-535.
- ❖ Li G, Santoni V & Maurel C (2013) Plant Aquaporins: Roles in plant physiology. *Biochimica et Biophysica Acta* 1840: 1574-1582.
- ❖ Li G, Peng Y-H, Yu X, Zhang M-H, Cai W-M, Sun W-N & Su W-A (2008). Transport functions and expression analysis of vacuolar membrane Aquaporins in response to various stresses in rice. *Journal of Plant Physiology* 165:1879-1888.
- ❖ Li S, Ehrhardt WD & Rhee YS (2007). Systematic Analysis of Arabidopsis Organelles and a Protein Localization Database for Facilitating Fluorescent Tagging of Full-Length Arabidopsis Proteins. *Bioinformatics* 141:527-539.
- ❖ Li X, Wang X, Yang Y, Lin R, He Q, Fang X, Luu DT, Maurel C & Li J (2012). Single-molecule analysis of PIP2;1 dynamics and partitioning reveals multiple modes of Arabidopsis plasma membrane aquaporins regulation. *The Plant Cell* 23:3780-3797.

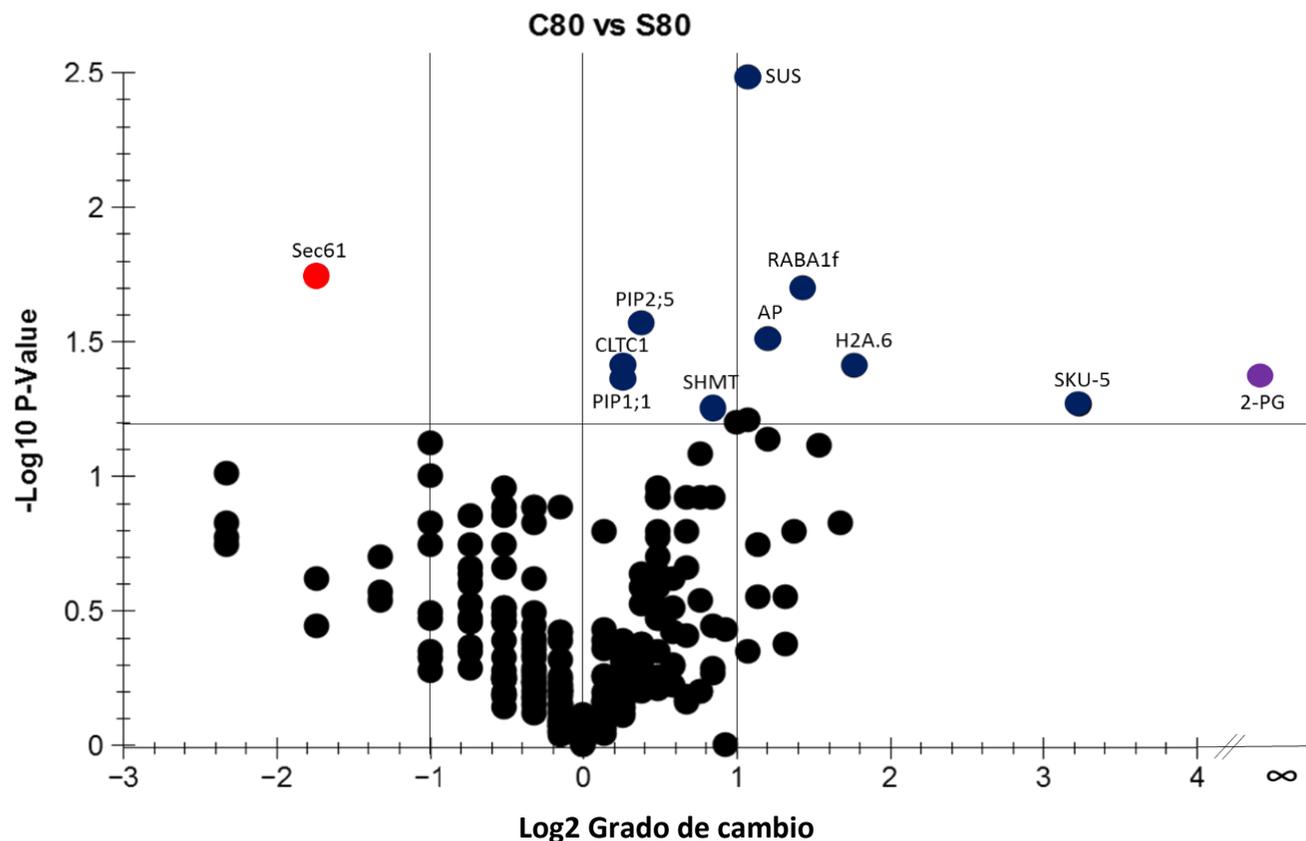
- ❖ Lobet G, Couvreur V, Meunier F, Javaux M & Draye X (2014). Plant Water Uptake in Drying Soils. *Plant Physiology*. 164: 1619-1627.
- ❖ Lüttge U (2000). The role of crassulacean acid metabolism (CAM) in the adaptation of plants to salinity. *New phytologist* 125:59-71.
- ❖ Luu DT & Maurel C (2013). Aquaporin Trafficking in Plant Cells: An emerging Membrane-Protein Model. *Traffic* 14:629-635.
- ❖ Ma N, Xue J, Li Y, Liu X, Dai F, Jia W, Luo Y & Gao J (2008). *Rh*-PIP2;1, a rose Aquaporin, is involved in ethylene-regulated petal expansion. *Plant Physiology* 148:894-907.
- ❖ Ma S (2006). An analysis of the Arabidopsis Aquaporin TIP1;1 and analysis of stress response signaling in Arabidopsis. Ph.D Thesis, University of Illinois, p 158
- ❖ Mahajan S & Tuteja N (2005). Cold, Salinity and Drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444:139-158.
- ❖ Marnitiere A, Li X, Runions J, Lin J, Maurel C & Luu DT (2012). Salt stress triggers enhanced cycling of Arabidopsis root plasma-membrane aquaporins. *Plant Signaling and Behaviour* 7:529-532.
- ❖ Maurel C, Verdoucq L, Luu DT & Santoni V (2008). Plant Aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annual Reviews of Plant Biology* 59, 595–624.
- ❖ Miller EA, Beilharz TH, Malkus PN, Lee MC, Hamamoto S, Orci L & Schekman R (2003). Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell* 114:497-509.
- ❖ Moorhead G, Douglas P, Cotelle V, Harthill J, Morrice N, Meek S, Deiting U, Stitt M, Scarabel M, Aitken A & MacKintosh C (1999). Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *The Plant Journal* 18:1-12.
- ❖ Moreno JI, Martín R & Castresana C (2005). *Arabidopsis* SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress. *The Plant Journal* 41:451-463.
- ❖ Moreu BJ, Bessoule JJ, Mongrand S, Testet E, Vincent P & Cassagne C (1998) Lipid trafficking in plant cells. *Progress in Lipid Research* 37:371-391.
- ❖ Munnik T & Vermeer J (2010). Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signaling in plants. *Plant Cell and Environment* 33:655-669.
- ❖ Munnik T & Testerink C (2009). Plant phospholipid signaling: “in a nutshell”. *Journal of Lipid Research* 50:260-265.
- ❖ Munns R & Tester M (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 58:651-681.
- ❖ Munns R (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25:239-250.
- ❖ Munns R & Termaat A (1986). Whole-Plant Responses to Salinity. *Functional Plant Biology* 13:143-160.
- ❖ Muries B, Faize M, Carvajal M & Martinez BM (2011). Identification and differential induction of the expression of Aquaporins by salinity in broccoli plants. *Molecular Biosystems* 7: 1322-1335.
- ❖ Neilson KA, Ali NA, Muralidharan S, Mirzaei M, Mariani M, Assadourian G, Lee A, van Sluyter S & Haynes P (2011). Less label, more free: Approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics* 11:535-553.
- ❖ Nimmo HG (2000). The regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants. *TRENDS Plant Science* 5:75-80.
- ❖ Osterbaan RJ (1995). Land drainage and soil salinity: Some Mexican experiences. *ILRI Annual Report* 44-52.

- ❖ Pantoja O, Barkla BJ & Vera-Estrella R (2000). Ion channels and ion co-transporters in the tonoplast. In Vacuolar Compartments. Eds: Robinson DG & Rogers JC. Sheffield Academic Press England. *Annual Reviews of Plant Biology* 5:199-220.
- ❖ Parre E, Ali M, Leprince AS, Thierry L, Lefebvre D, Bordenave M, Richard L, Mazars C, Abdely C & Sauré A (2007). Calcium Signaling via Phospholipase C is Essential for Proline Accumulation upon Ionic But Not Nonionic Hyperosmotic Stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 144: 503-512.
- ❖ Pical C, Westergren T, Dove SK, Larsson C & Somarin M (1999). Salinity and hyperosmotic stresses induce rapid increases in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, diacylglycerol pyrophosphate and phosphatidylcholine in *Arabidopsis thaliana* cells. *The Journal of Biological Chemistry* 274:38232-38240.
- ❖ Prak S, Hem S, Boudet J, Viennois G, Sommerer N, Rossignol M, Maurel C & Santoni V (2008). Multiple phosphorylations in the C-terminal tail of plant plasma membrane Aquaporins: role in subcellular trafficking of AtPIP2;1 in response to salt stress. *Molecular and Cell Proteomics* 7:1019-1030.
- ❖ Racagni G, Pedranzani H, Alemano S, Taleisnik E, Abdala G & Machado-Domenech E (2003). Effect of short-term salinity on lipid metabolism and ion accumulation in tomato roots. *Biologia Plantarum* 47:372-377.
- ❖ Rajendran K, Tester M & Roy SJ (2009). Quantifying the tree main components of salinity tolerance in cereals. *Plant, Cell & Environment* 32: 237-249.
- ❖ Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI & Mann M (2002). Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome* 12: 1231-1245.
- ❖ Rengasamy PI (2006). World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany* 57:1017-1023.
- ❖ Reyes FC, Chung T, Holding D, Jung R, Vierstra R & Otegui MS (2011). Delivery of Prolamins to the Protein Store Vacuole in Maize Aleurone Cells. *The Plant Cell* 23:769-784
- ❖ Roberts MR & Harmon AC (1992). Fusicoccin, 14-3-3 proteins, and defense responses in tomato plants. *Plant Physiology* 119:1243-1250.
- ❖ Robinson GD, Jiang L & Schumacher K (2008). The Endosomal System of Plants: Charting New and Familiar Territories. *Plant Physiology* 147:1482-1492.
- ❖ Ros R, Cascales-Miñana, Segura AD-A, Toujani W, Tornero-Flores M, Rosa-Tellez S & Muñoz-Bertomeu J (2012). Serine biosynthesis by photorespiratory and non-photorespiratory pathways: an interesting interplay with unknown regulatory networks. *Plant Biology* 15: 707- 712.
- ❖ Rungarron WS, Daungjai S, Tanaka Y & Takabe T (2012). Overexpression of serine hydroxymethyltransferase from halotolerant cyanobacterium in *Escherichia coli* results in increased accumulation of choline precursors and enhanced salinity tolerance. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 333: 46-53.
- ❖ Sakurai J, Ishikawa F, Yamaguchi T, Uemura M & Maeshima M (2005). Identification of 33 rice Aquaporins genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell and Physiology* 46: 1568-1577.
- ❖ Salisbury BF & Roos WC (1992). *Plant Physiology California, Ed. Wadsworth Inc.*
- ❖ Sanderfoot AA & Raikhel NV (1999). The specificity of Vesicle Trafficking: Coat Proteins and SNAREs. *The Plant Cell* 11: 629-641.
- ❖ Schirch V, Hopkins S, Villar E & Angelaccio S (1985). Serine hydroxymethyltransferase from *Escherichia coli*: purification and properties. *Journal of Bacteriology* 163:1-7.
- ❖ Schumaker KS & Sze H (1987). Inositol 1,4,5-triphosphate releases Ca²⁺ from vacuolar membrane vesicles of oat roots. *The Journal of Biological Chemistry* 262:3944-3946.

- ❖ Schutz K & Tyerman SD (1997). Water channels in *Chara coralina*. *Journal of Experimental Botany* 48:1511-1518
- ❖ Serrano R, Culianz-Macia F & Moreno V (1999). Genetic engineering of salt and drought tolerance with yeast regulatory genes. *Scientia Horticulturae* 78:261-269.
- ❖ Shabala S (2013). Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Annals of Botany* 1-13.
- ❖ Shepetner HS, Herskovits JS & Valle RB (1996). A binding site for SH3 domains targets dynamin to coated pits. *The Journal of Biological Chemistry* 271:13-16.
- ❖ Shomer I, Jones GP & Paleg LG (1991). In vitro thermal and salt stability of pyruvate kinase are increased by proline analogues and trigonelline. *Australian Journal of Plant Physiology* 18: 279-286.
- ❖ Sorieul N (2011). Mechanisms and effects of retention of over-expressed aquaporin AtPIP2; 5 in the endoplasmic reticulum. *Traffic* 12:473-482.
- ❖ Stagg SM, LaPointe P & Balch WE (2007). Structural design of cage and coat scaffolds that direct membrane traffic. *Current Opinion in Structural Biology* 17:221-228.
- ❖ Steudle E (2000). Water uptake by roots: effects of water deficit. *Journal of Experimental Botany* 350: 1532-1542.
- ❖ Steudle E & Peterson CA (1998). How does water get through roots? *Journal of Experimental Botany* 49: 775-788
- ❖ Sutka M, Li G, Boursiac Y, Doumas P & Maurel C (2011). Natural variation of root hydraulics in *Arabidopsis* growth in normal and salt-stressed conditions. *Plant Physiology* 155: 1264-1276.
- ❖ Terashima I & Ono K (2002). Effects of HgCl₂ on CO₂ dependence of leaf photosynthesis: evidence-indicating involvement of Aquaporins in CO₂ diffusion across the plasma membrane. *Plant Cell Physiology*. 43:70-78.
- ❖ Testerink C & Munnik T (2005). Phosphatidic acid: a multifunctional stress-signaling lipid in plants. *TRENDS in Plant Science* 10: 368-375.
- ❖ Tuteja N (2007). Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants. *Methods in Enzymology* 428:419-438.
- ❖ Uehlein N, Lovisolo C, Siefritz F & Kaldenhoff R (2003). The tobacco Aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature* 16:734-738.
- ❖ Vallis Y, Wigge P, Marks B, Evans PR & McMahon HT (1999) Importance of the pleckstrin homology domain of dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Current Biology* 9:257-260.
- ❖ Vera-Estrella R, Barkla BJ, Amezcua RJ & Pantoja O (2012). Day/Night Regulation of Aquaporins During the CAM Cycle in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant, Cell and Environment*. 35: 485-501.
- ❖ Vera-Estrella R, Barkla JB, Hans J. Bohnert & Pantoja O (2004). Novel regulation of Aquaporins during Osmotic Stress. *Plant Physiology* 4: 2318-2329.
- ❖ Vera-Estrella R, Barkla B.J, Gallardo AC, Bohnert JH & Pantoja O (2000). Aquaporin Regulation Under Salt and Osmotic Stress in the Halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. In *Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport*. Ed Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. pp. 339-346.
- ❖ Villarejo A, Burén S, Larsoon S, Déjardin A, Monné M, Rudhe C, Karlsoon J, Jansson S, Lerouge P, Rolland N, von Heijne G, Grebe M, Bako L & Samuelsson G (2005). Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast. *Nature Cell Biology* 7:1224-1231.
- ❖ Wallace IS & Roberts DM (2006). The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. *Biochemistry Biophysica Acta* 1758:1165-1175.

- ❖ Wallace IS & Roberts DM (2005). Distinct transport selectivity of two structural sub-classes of the nodulin-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporin channels. *Biochemistry* 44:16826-16834.
- ❖ Waltoon NJ & Woolhouse HW (1986). Enzymes of serine and glycine metabolism in leaves and non-photosynthetic tissues of *Pisum sativum* L. *Planta*. 167:119-128.
- ❖ Wang M, You J, Bemis KG, Tegeler TJ & Brown PG (2008) .Label-free mass spectrometry-based protein quantification technologies in proteomic analysis. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 5: 329-339.
- ❖ Witney JA, Gomez M, Sheff D, Kreis TE & Mellman I (1995). Cytoplasmic, coat proteins involved in endosome function. *Cell* 83:703-713.
- ❖ Xu Chunhui Xu, Wang Me, Zhou Li, Quan T & Xia G (2013). Heterolous Expression of the Wheat Aquaporin Gene *TaTIP2;2* Compromises the Abiotic Stress Tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 8 (11).
- ❖ Yakota E, Tominaga M, Tsuji Y, Staiger Ch, Oiwa K & Shimmen T (2005). Plant Villin, Lily P-135-ABP, Possesses G-Actin Binding Activity and Accelerates the Polumerization and Depolymerization of Actin in a Ca²⁺ sensitive Manner. *Plant Cell Physiology* 46: 1690-1703
- ❖ Yamaji N, Mitatni N & Ma JF (2008). A transporter regulating silicon distribution in rice shoots. *The Plant Cell* 20:1381-1389.
- ❖ Yates JA, Gilchrist A, Howell K & Bergeron JM (2005). Proteomics of Organelles and Large Cellular Structures. *Molecular Cell Biology* 6:702-714.
- ❖ Zelazny E, Borst JW, Muylaert M, Batoko H, Hemminga MA & Chaumont F (2007). FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:12359–12364.
- ❖ Zhao CX, Shoa HB & Chu LY (2008) Aquaporin structure-function relationships: Water flow through plant living cells. *Colloids and Surfaces Biointerfaces* 62: 163- 172.
- ❖ Zhou H, Zhoa J, Yang Y, Chen C, Liu Y, Jin C, Chen L, Li X, Deng XW, Schumaker KS & Guo Y (2012). UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE16 Modulates Salt Tolerance in Arabidopsis By Regulating Na⁺/H⁺ Antiport Activity and Serine Hydroxymethyltranferase Stability. *The Plant Cell* 24: 5106-5122.
- ❖ Zhu JK, Hasegawa MP, Bressan AR & Bohnert HJ (1997). Molecular Aspect of Osmotic Stress in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16:253-277.
- ❖ Zhu Y, Traub LM & Kornfeld S (1998). ADP-Ribosylation factor 1 transiently activates high-affinity adaptor protein complex AP-1 binding sited on Golgi membranes. *Molecular Biology of the Cell* 9:1323-1337.

12. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA



114

Figura S1. Proteínas que cambian de abundancia en la fracción 80 aisladas por EZFL. Gráfico tipo volcán, mostrando las proteínas diferencialmente reguladas en la fracción 80, al comparar las fracciones C80 vs S80. El gráfico muestra la relación entre el grado de cambio (\log_2 del grado de cambio; eje x), y el *valor-P* ($-\log_{10}$ del valor *P*, eje y). La línea horizontal muestra el límite de significancia, donde los puntos por arriba de la línea tienen *valores P* < 0.05 y por debajo *valores P* > 0.05 . El grado del cambio de abundancia se puede observar a partir del corte del grado de cambio en +1 y -1 ($\text{Log}_2=1$). Los círculos azules indican incremento de abundancia, los de color rojo disminución de abundancia y los morados muestran las proteínas que aparecen (INF) en la condición de salinidad. La etiqueta a lado de cada punto, indican la abreviatura del nombre de la proteína (Ver índice de abreviaturas Tabla 2). $n=4$

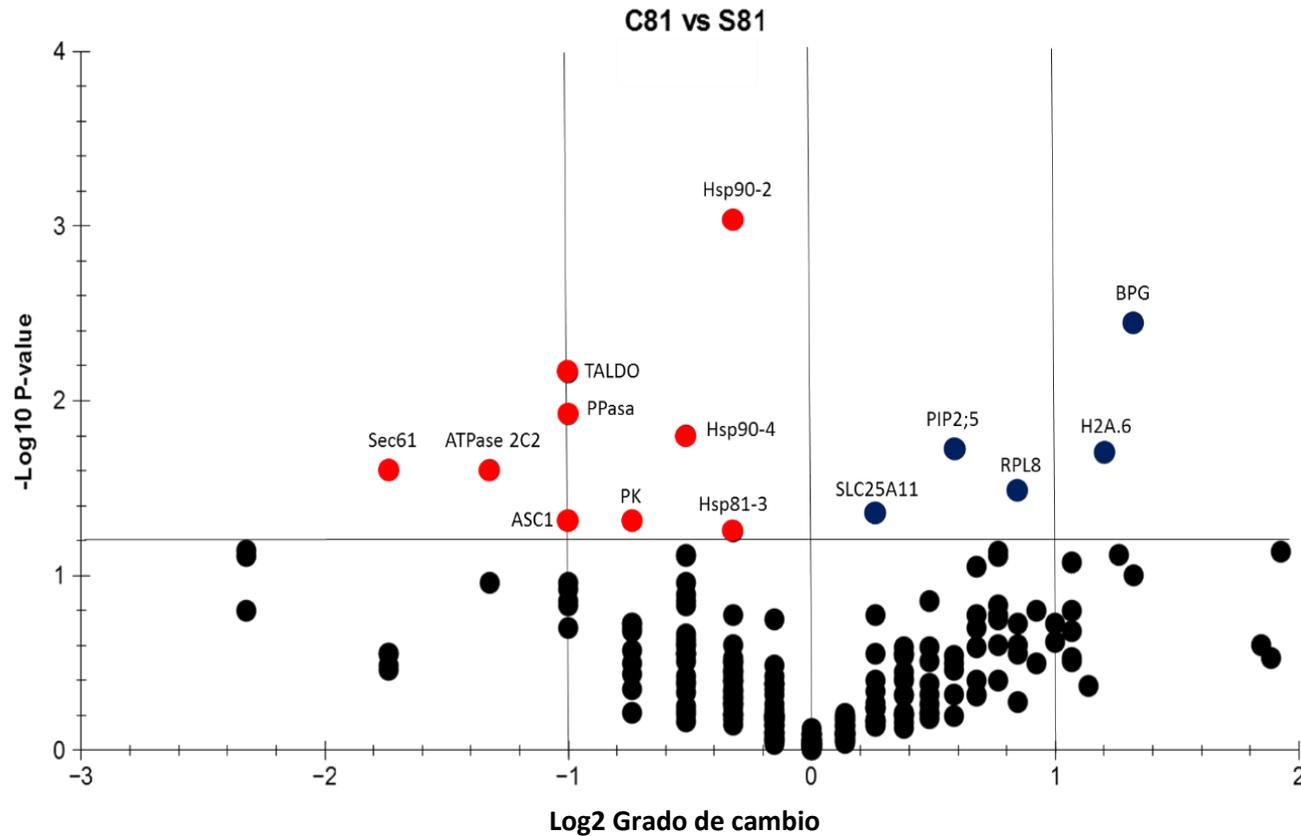


Figura S2. *Proteínas que cambian de abundancia en la fracción 81 aisladas por EZFL.* Gráfico tipo volcán, mostrando las proteínas diferencialmente reguladas en la fracción 81, al comparar las fracciones C81 vs S81. El gráfico muestra la relación entre el grado de cambio (\log_2 del grado de cambio; eje x), y el *valor-P* ($-\log_{10}$ del valor *P*, eje y). La línea horizontal muestra el límite de significancia, donde los puntos por arriba de la línea tienen *valores* $P = < 0.05$ y por debajo *valores* $P = > 0.05$. El grado del cambio de abundancia se puede observar a partir del corte del grado de cambio en +1 y -1 ($\text{Log}_2=1$). Los círculos azules indican incremento de abundancia, los de color rojo disminución de abundancia. La etiqueta a lado de cada punto, indican la abreviatura del nombre de la proteína (Ver índice de abreviaturas Tabla 2). $n=4$

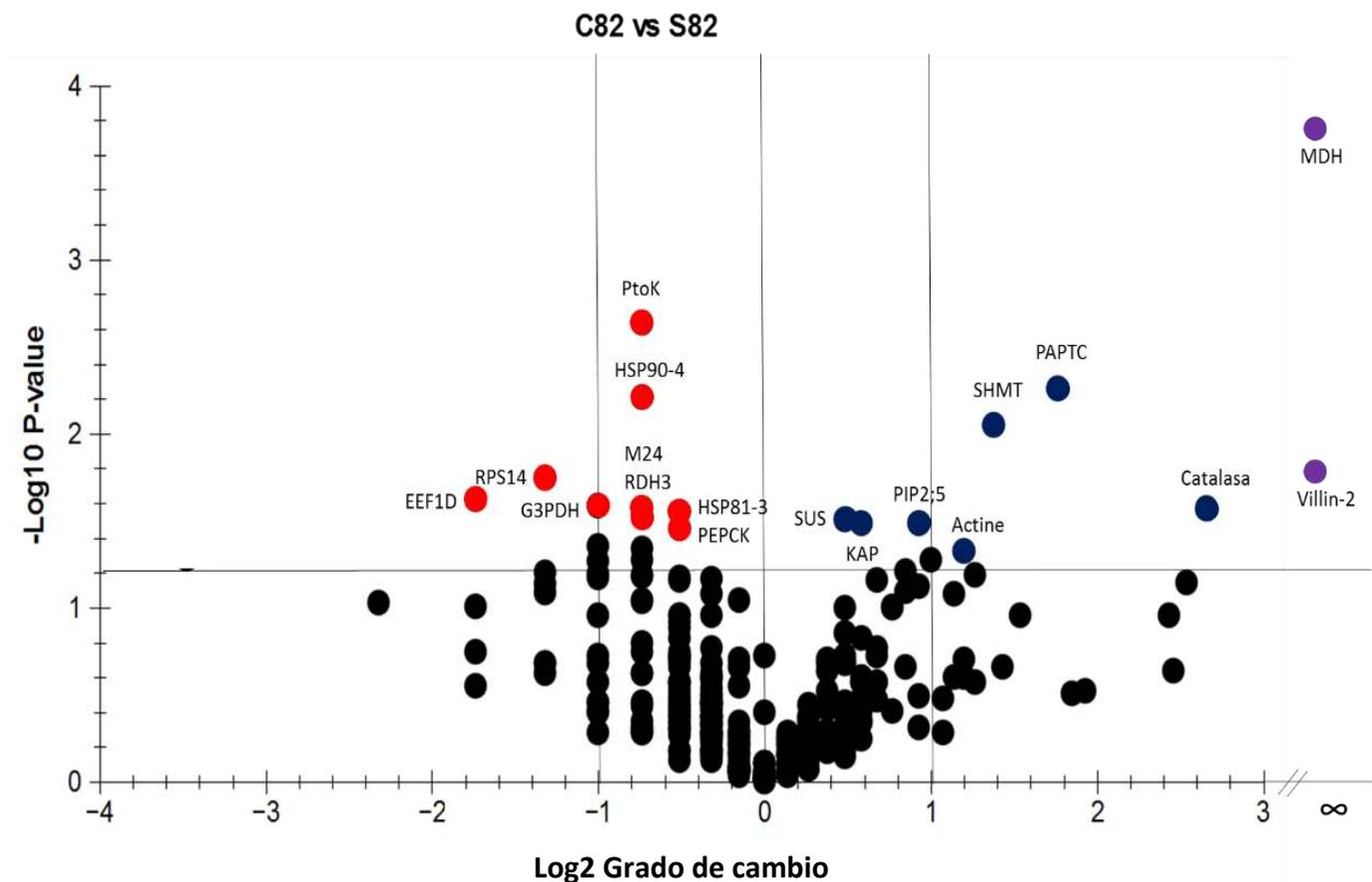
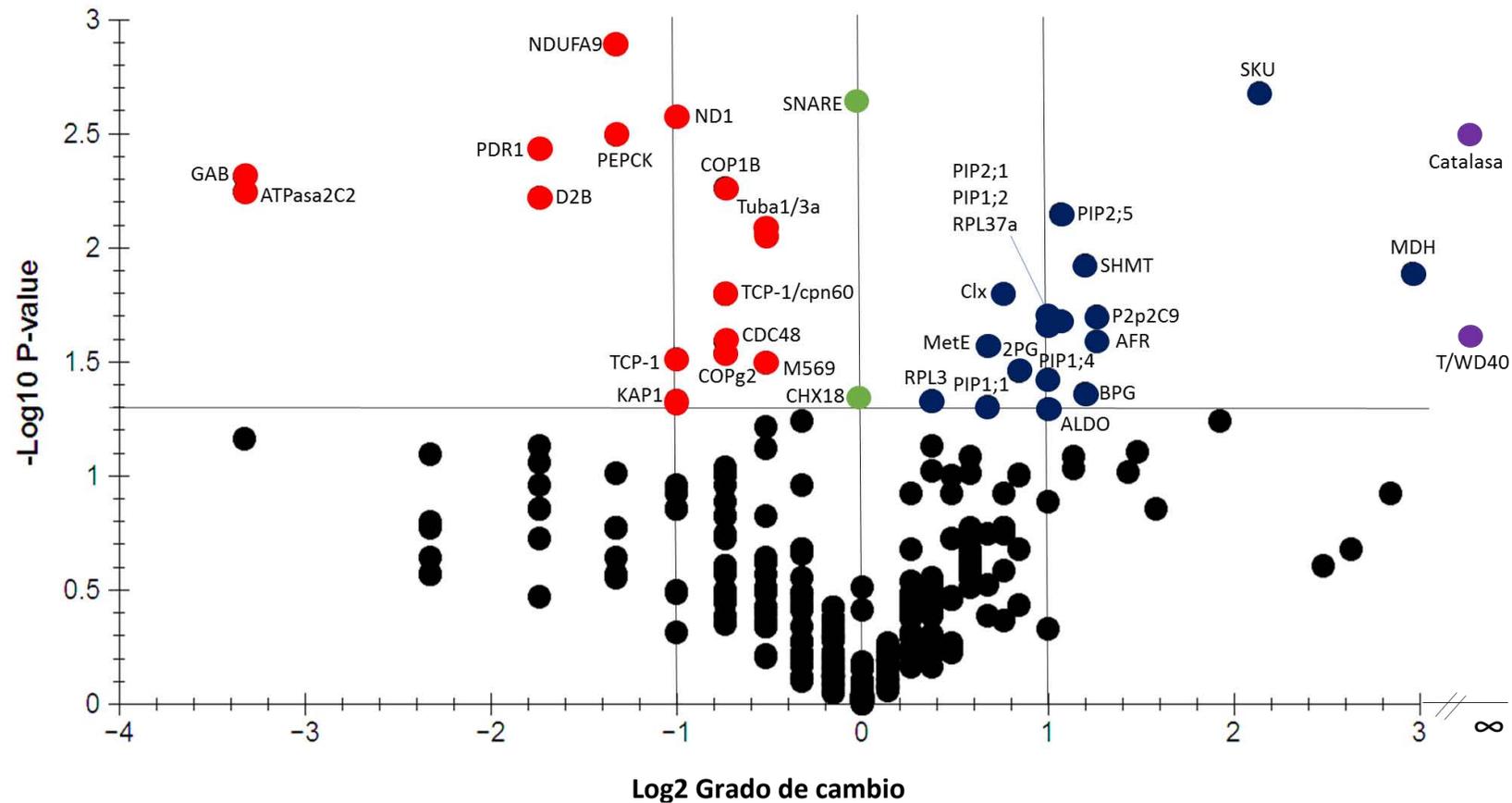


Figura S3. Proteínas que cambian de abundancia en la fracción 82 aisladas por EZFL. Gráfico tipo volcán, mostrando las proteínas diferencialmente reguladas en la fracción 82, al comparar las fracciones C82 vs S82. El gráfico muestra la relación entre el grado de cambio (\log_2 del grado de cambio; eje x), y el *valor-p* ($-\log_{10}$ del valor *p*, eje y). La línea horizontal muestra el límite de significancia, donde los puntos por arriba de la línea tienen *valores* $p = < 0.05$ y por debajo *valores* $p = > 0.05$. El grado del cambio de abundancia se puede observar a partir del corte en +1 y -1 ($\text{Log}_2=1$). Los círculos azules indican incremento de abundancia, los de color rojo disminución de abundancia y el morado, la proteína que aparece en la condición de salinidad. La etiqueta a lado de cada punto, indican la abreviatura del nombre de la proteína (Ver índice de abreviaturas). $n=4$

C83 vs S83



117

Figura S4. Proteínas que cambian de abundancia en la fracción 83 aisladas por EZFL. Gráfico tipo volcán, mostrando las proteínas diferencialmente reguladas en la fracción 83, al comparar las fracciones C83 vs S83. El gráfico muestra la relación entre el grado de cambio (\log_2 del grado de cambio; eje x), y el *valor-P* ($-\log_{10}$ del *valor P*, eje y). La línea horizontal muestra el límite de significancia, donde los puntos por arriba de la línea tienen *valores* $p = < 0.05$ y por debajo *valores* $p = > 0.05$. El grado del cambio de abundancia se puede observar a partir del corte del grado de cambio en +1 y -1 ($\text{Log}_2=1$). Los círculos azules indican incremento de abundancia, los de color rojo disminución de abundancia, el morado, proteínas que aparece en la condición de salinidad y verde aquellas que desaparecen. La etiqueta a lado de cada punto, indican la abreviatura del nombre de la proteína (Ver índice de abreviaturas). $n=4$

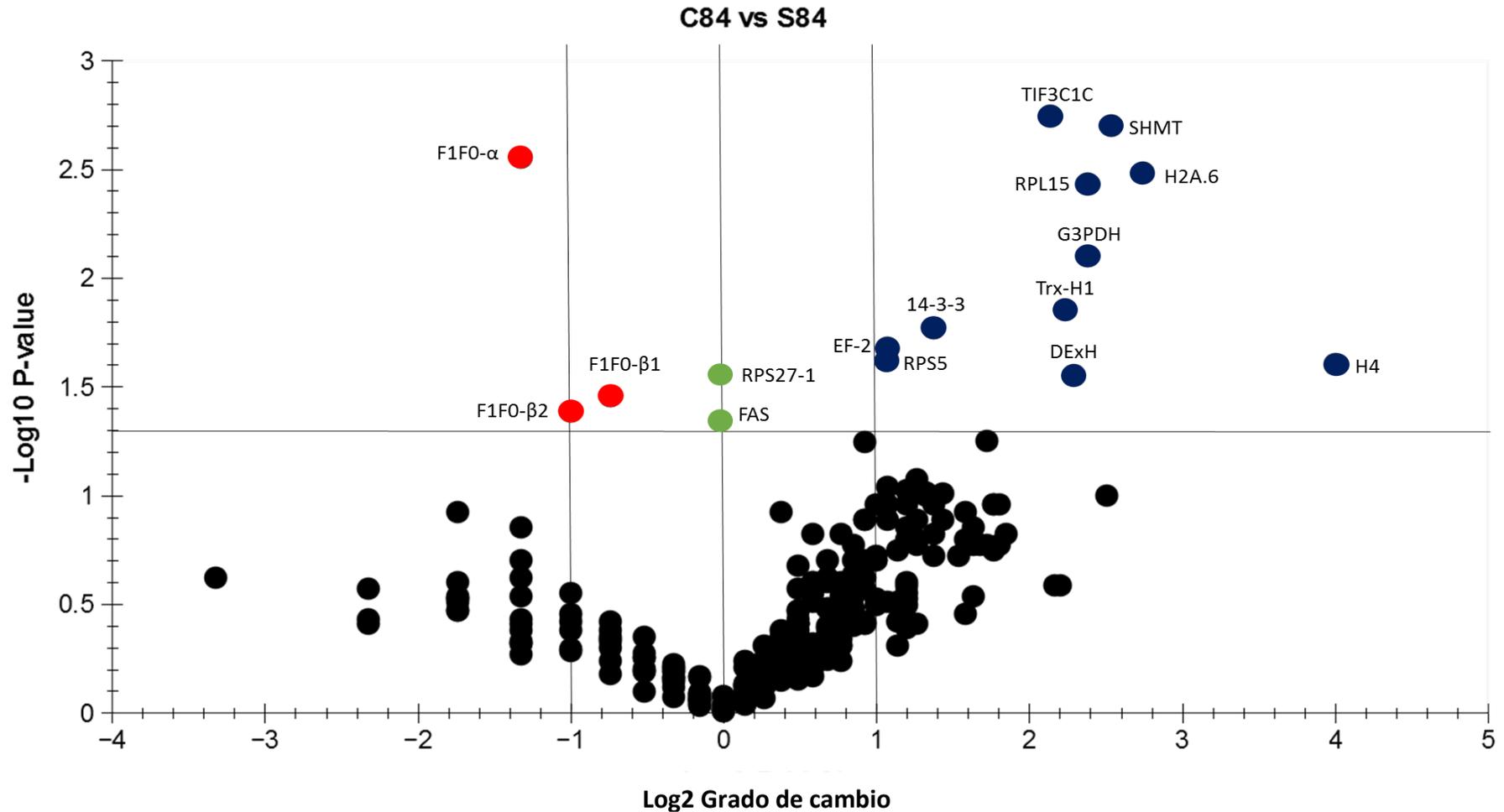


Figura S5. Proteínas que cambian su abundancia por salinidad en la fracción 84 aisladas por EZFL. Gráfico tipo volcán, mostrando las proteínas reguladas en la fracción 84, al comparar las fracciones C84 vs S84. El gráfico muestra la relación entre el grado de cambio en abundancia (\log_2 del grado de cambio; eje x), y el *valor-P* ($-\log_{10}$ del valor *P*, eje y). La línea horizontal muestra el límite de significancia, donde los puntos por arriba de la línea tienen *valores P* < 0.05 y por debajo *valores P* > 0.05 . El grado del cambio de abundancia se puede observar a partir del corte del grado de cambio en +1 y -1 ($\text{Log}_2=1$). Los círculos azules indican incremento de abundancia, los de color rojo disminución de abundancia, y el verde aquellas proteínas que desaparecen en la condición de salinidad. La etiqueta a lado de cada punto, indican la abreviatura del nombre de la proteína (Ver índice de abreviaturas). $n=4$

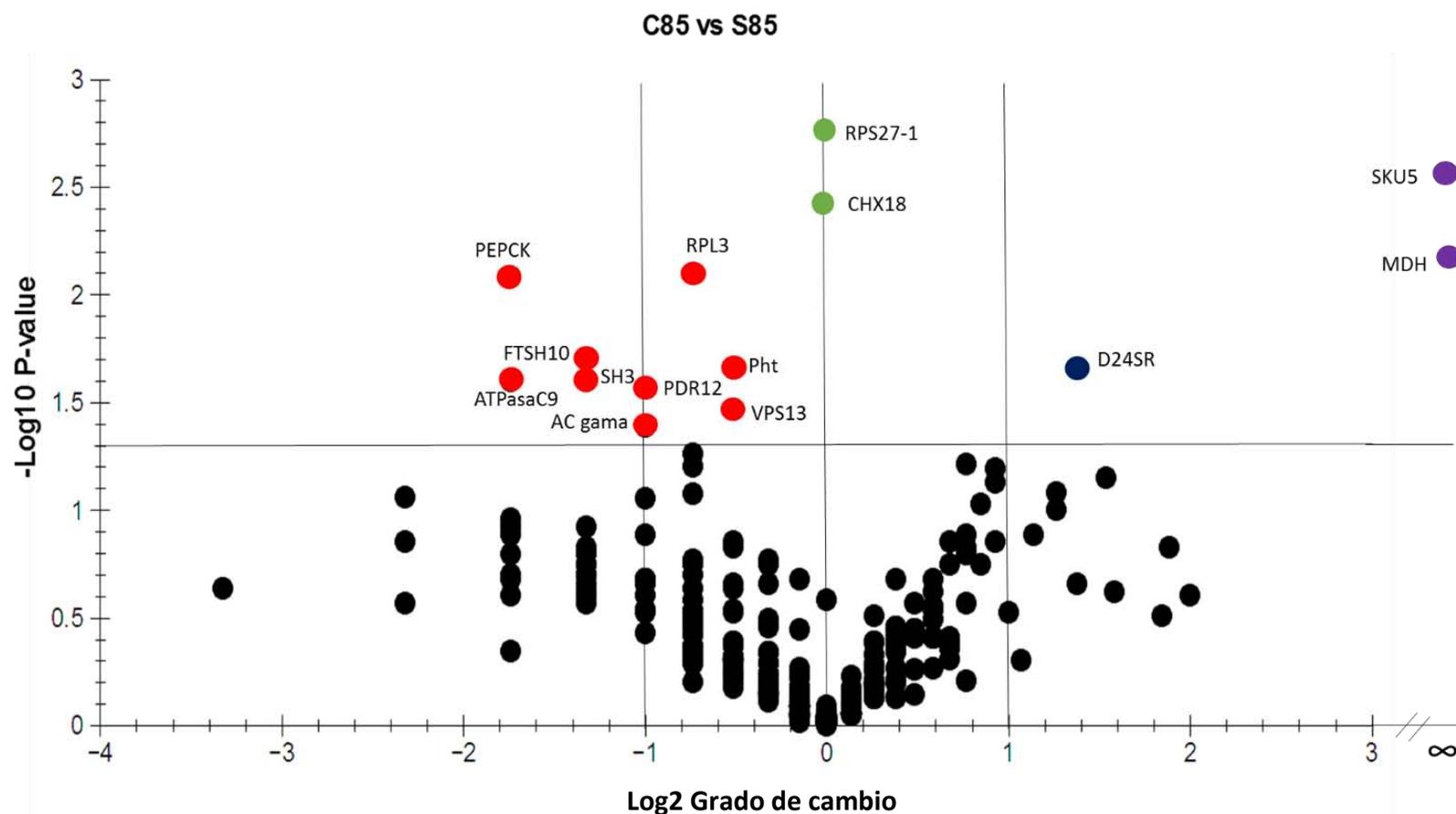


Figura S6. Proteínas que cambian su abundancia por salinidad en la fracción 85 aisladas por EZFL. Gráfico tipo volcán, mostrando las proteínas reguladas en la fracción 85, al comparar las fracciones C85 con S85. El gráfico muestra la relación entre el cambio de abundancia (\log_2 del grado de cambio; eje x), y el *valor-P* ($-\log_{10}$ del valor *P*, eje y). La línea horizontal muestra el límite de significancia, donde los puntos por arriba de la línea tienen *valores P* < 0.05 y por debajo *valores P* > 0.05 . El grado del cambio de abundancia se puede observar a partir del corte del grado de cambio en +1 y -1 ($\log_2=1$). Los círculos azules indican incremento de abundancia, los de color rojo disminución de abundancia, y el verde aquellas Proteínas que desaparecen en la condición de salinidad. La etiqueta a lado de cada punto, indican la abreviatura del nombre de la proteína (Ver índice de abreviaturas).

13. ANEXO

Tabla A1. Anticuerpos primarios utilizados

<i>Anticuerpo 1ro</i>	<i>Descripción</i>	<i>Tipo de antígeno</i>	<i>PM (kDa)</i>	<i>Indicativo de</i>
Anti-AHA3 (1:1000)	H ⁺ -ATPasa de la Membrana Plasmática	Policlonal	100	Marcador de Membrana Plasmática, complejo enzimático encargado de crear un gradiente de protones a través de la membrana plasmática.
Anti-VHA-E (1:1000)	Sub-unidad E de la H ⁺ -ATPasa del Tonoplasto	Monoclonal	31	Marcador de Tonoplasto, complejo enzimático encargado de crear un gradiente de protones a través del tonoplasto.
Anti-CTR1 (1:1000)	Careticulina	Policlonal	57	Marcador de Retículo Endoplasmático y Aparato de Golgi y proteína unidora de Ca ²⁺ .
Anti-SHMT (1:1000)	Serina- hidroximetiltransferasa	Monoclonal	150	Enzima que participa en el metabolismo de un carbono, haciendo la conversión reversible de L- serina a glicina y tetrahidrofolato a 5, 10 metiltetrahidrofolato.
Anti-PIP1;4 (1:1000)	Acuaporina PIP1;4	Policlonal	40	Proteína integral de membrana (M embrane, I ntegral P rotein), del tipo Intrínsecas a la membrana plasmática (PIP, P rotein I ntrínsec to P lasma Membrane), subgrupo 1;4.
Anti-PIP1;2 (1:1000)	Acuaporina PIP1;2	Policlonal	25	Proteína integral de membrana (M embrane, I ntegral P rotein), del tipo Intrínsecas a la membrana plasmática (PIP, P rotein I ntrínsec to P lasma Membrane), subgrupo 1;2.
Anti-PIP2;5 (1:1000)	Acuaporina PIP2;5	Policlonal	31	Proteína integral de membrana (M embrane, I ntegral P rotein), del tipo Intrínsecas a la membrana plasmática (PIP, P rotein I ntrínsec to P lasma Membrane), subgrupo 2;5.
Anti-PIP2;1 (1:1000)	Acuaporina PIP2;1	Policlonal	30	Proteína integral de membrana (M embrane, I ntegral P rotein), del tipo Intrínsecas a la membrana plasmática (PIP, P rotein I ntrínsec to P lasma Membrane), subgrupo 2;1.
Anti-ALDO (1:1000)	Fructosa bifosfatasa (Aldolasa)	Monoclonal	38	Enzima que participa en la glucólisis.
Anti-14-3-3 (1:1000)	Proteína señalizadora 14-3-3	Monoclonal	25	Proteínas con la capacidad de unir fosfatasa, cinasas y receptores transmembrana.

Tabla que muestra todos los anticuerpos primarios que fueron utilizados y conjugados al anticuerpo secundario de anti-IgG HRP de conejo en una dilución a 1:5000.