

**Análisis funcional de *Snakin-1* en plantas transgénicas de *Solanum tuberosum***

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias*

**Vanesa Nahirñak**

Lic. en Genética-Universidad Nacional de Misiones-2008

Lugar de trabajo: Instituto de Biotecnología, INTA-Castelar



**FAUBA**

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano  
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



## COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

**Cecilia Vazquez Rovere**

Lic. en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)  
Doctora de la Universidad de Buenos Aires

Consejero de Estudios

**Fernando Carrari**

Ing. Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)  
Doctora de la Universidad de Buenos Aires

## JURADO DE TESIS

Director de tesis

**Cecilia Vazquez Rovere**

Lic. en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)  
Doctora de la Universidad de Buenos Aires

JURADO

**Claudia Casalongué**

Licenciado en Ciencias Biológicas (UNMDP)  
Doctora en Ciencias Biológicas (UNMDP)

JURADO

**Santiago Mora García**

Licenciado en Ciencias Biológicas (UBA)  
Doctor en Ciencias Químicas (UBA)

JURADO

**Ricardo Wolosiuk**

Bioquímico (UBA)  
Doctor en Ciencias Químicas (UBA)

Fecha de defensa de la tesis: 09 de ABRIL de 2015

## Agradecimientos

A la Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano, Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (EPG-FAUBA).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICET).

Al Director del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias del INTA Castelar, Dr. Juan Carlos Salerno y a la Directora del Instituto de Biotecnología Dra. Elisa Carrillo.

A Ceci y al grupo papa.

A TODOS los integrantes del Instituto de Biotecnología del INTA de Castelar.

A mi familia.

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

Publicaciones derivadas de la tesis:

**Nahirñak V**, Almasia N I, Hopp E H y Vazquez Rovere C. Snakin/GASA proteins: Involvement in hormone crosstalk and redox homeostasis. *Plant Signaling & Behavior* 7:8, 1-5. 2012.

**Nahirñak V**, Almasia N I, Fernandez P V, Hopp E H, Estevez J M, Carrari F y Vazquez Rovere C. Potato snakin-1 gene silencing affects cell division, primary metabolism and cell wall composition. *Plant Physiology*. 158 (2012) 252-263.

## ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos .....	iii
ÍNDICE GENERAL.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ABREVIATURAS.....	xv
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
Capítulo 1: Introducción general.....	1
1.1 Introducción .....	2
1.1.1 Snakin-1 y su función en defensa.....	2
1.1.2. Familia de proteínas Snakin/GASA .....	7
1.1.2.1 Los genes Snakin/GASA y su relación con las hormonas.....	8
1.1.2.2 Patrones de expresión temporales y espaciales de los genes Snakin/GASA....	10
1.1.2.3 Localización subcelular de las proteínas Snakin/GASA .....	12
1.1.2.4 Participación de los genes Snakin/GASA en el desarrollo de la planta y tolerancia a estreses .....	16
1.1.2.5 Las proteínas Snakin/GASA y el balance redox.....	17
1.1.3. Modelo de trabajo: <i>Solanum tuberosum</i> .....	18
1.2 Objetivos .....	21
1.2.1 Objetivo General .....	21
1.2.2 Objetivos particulares .....	21
1.3 Hipótesis.....	22
1.4 Estructura de la Tesis .....	23
Capítulo 2: Estudio de la función <i>in vivo</i> del gen <i>Snakin-1</i> .....	24
2.1 Introducción .....	25
2.1.2 Ácido ascórbico .....	26

2.1.3 Homeostasis redox y desarrollo .....	29
2.1.4 Balance hormonal y desarrollo.....	31
2.2 Materiales y Métodos.....	33
2.2.1 Material vegetal.....	33
2.2.2 Caracterización molecular de las plantas .....	33
2.2.2.1 Extracción de ADN de hojas de papa .....	33
2.2.2.2 PCR a tiempo final.....	34
2.2.2.3 <i>Southern blot</i> .....	34
2.2.2.4 Extracción de ARN.....	35
2.2.2.5 <i>Northern blot</i> .....	36
2.2.3 Caracterización fenotípica de las plantas .....	37
2.2.3.1 Evaluación de parámetros de crecimiento y desarrollo .....	37
2.2.3.2 Ensayos de tuberización en placas.....	37
2.2.3.3 Medición de fotosíntesis, conductancia y transpiración .....	37
2.2.3.4 Medición del área foliar y celular .....	38
2.2.3.5 Análisis histológicos.....	38
2.2.4 Identificación de vías metabólicas y procesos fisiológicos afectados en las líneas transgénicas .....	39
2.2.4.1 Análisis de perfiles metabólicos y composición de la pared celular .....	39
2.2.4.1.1 Extracción, derivatización y análisis de metabolitos solubles mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas .....	39
2.2.4.1.2 Determinación de azúcares solubles.....	40
2.2.4.1.3 Determinación de ácido ascórbico total y ácido dehidroascórbico.....	40
2.2.4.1.4 Análisis de la composición de la pared celular.....	41
2.2.4.2 Estudio de la participación de <i>SNI</i> en la homeostasis redox y en el balance hormonal .....	42
2.2.4.2.1 Tinciones histoquímicas para la determinación de especies reactivas de oxígeno.....	42
2.2.4.2.2 Cuantificación de los niveles de la enzima Ascorbato Peroxidasa.....	43
2.2.4.2.3 Cuantificación relativa de la expresión de genes involucrados en la síntesis y reciclaje de ácido ascórbico .....	44

2.2.4.2.4 Tratamiento con ácido giberélico .....	46
2.2.4.2.5 Cuantificación relativa de la expresión de genes relacionados al metabolismo y señalización hormonales .....	46
2.2.4.2.6 Determinación de hormonas vegetales en muestras de tallos y hojas de las líneas transgénicas .....	47
2.2.4.3 Análisis de los perfiles transcripcionales en plantas transgénicas que sobreexpresan o silencian <i>SNI</i> .....	48
2.3 Resultados .....	50
2.3.1 Evaluación del número de copias y de los niveles de expresión de <i>SNI</i> en las líneas transgénicas .....	50
2.3.2 Análisis fenotípico de las líneas transgénicas de <i>SNI</i> .....	51
2.3.2.1 Tuberización .....	53
2.3.2.2 Floración .....	54
2.3.2.3 Medición de fotosíntesis, conductancia y transpiración .....	56
2.3.2.4 Área foliar y celular .....	57
2.3.3 Identificación de vías metabólicas y procesos fisiológicos afectados en las líneas transgénicas .....	60
2.3.3.1 Análisis de perfiles metabólicos y composición de la pared celular de hojas de líneas transgénicas con niveles alterados de <i>SNI</i> .....	60
2.3.3.1.1 Metabolitos solubles .....	60
2.3.3.1.2 Medición de los niveles de ácido ascórbico mediante HPLC.....	65
2.3.3.1.3 Análisis de la pared celular mediante FT-IR .....	66
2.3.3.2 Estudio de la participación de <i>SNI</i> en la homeostasis redox y en el balance hormonal .....	69
2.3.3.2.1 Determinación de especies reactivas de oxígeno.....	69
2.3.3.2.2 Cuantificación de los niveles de la enzima Ascorbato Peroxidasa.....	70
2.3.3.2.3 Cuantificación relativa de la expresión de genes involucrados en la síntesis de ácido ascórbico .....	71
2.3.3.2.4 Relación entre <i>SNI</i> y el metabolismo de hormonas en líneas de papa que sobreexpresan o silencian este gen .....	75
2.3.3.3 Análisis de los perfiles transcripcionales en las líneas transgénicas que sobreexpresan o silencian <i>SNI</i> .....	82

2.3.3.3.1 Niveles de expresión de genes relacionados a la síntesis de Brasinoesteroides .....	85
2.4 Discusión.....	90
2.4.1 <i>SN1</i> está involucrado en el crecimiento y desarrollo de la planta .....	90
2.4.2 <i>SN1</i> afecta la división celular .....	92
2.4.3 <i>SN1</i> afecta el metabolismo primario y la composición de la pared celular de las hojas.....	95
2.4.4 <i>SN1</i> participa en la homeostasis redox .....	102
2.4.5 <i>SN1</i> está involucrado en el balance hormonal.....	107
2.5 Conclusiones .....	112
Capítulo 3: Identificación de nuevos genes Snakin/GASA en <i>Solanum tuberosum</i> .....	114
3.1 Introducción .....	115
3.2 Materiales y Métodos.....	118
3.2.1 Identificación de genes de la familia Snakin/GASA en <i>Solanum tuberosum</i> .....	118
3.2.2 Clonado de los genes Snakin/GASA.....	118
3.2.2.1 Transformación de bacterias <i>E.coli</i> competentes .....	120
3.2.2.2 Aislamiento de ADN plasmídico y confirmación de los clones.....	121
3.2.2.3 Secuenciación y análisis de las secuencias .....	121
3.2.3 Análisis de las putativas regiones promotoras de los genes Snakin/GASA.....	122
3.2.4 Análisis de la regulación de la expresión génica.....	122
3.2.4.1 Expresión de genes Snakin/GASA en distintos tejidos .....	123
3.2.4.2 Tratamiento con hormonas vegetales en papa .....	123
3.2.4.3 Ensayos de infección con patógenos .....	123
3.3 Resultados .....	125
3.3.1 Identificación de nuevos genes Snakin/GASA en <i>Solanum tuberosum</i> .....	125
3.3.2 Análisis filogenético de las proteínas Snakin/GASA.....	131
3.3.3 Análisis de las regiones promotoras de los genes Snakin/GASA .....	133
3.3.4 Regulación de la expresión de los genes Snakin/GASA .....	135
3.4 Discusión.....	142
3.5 Conclusiones .....	149

Capítulo 4: Conclusiones generales ..... 150

4.1 Conclusiones generales ..... 151

Referencias bibliográficas ..... 157

Anexo ..... 166

## ÍNDICE DE TABLAS

### Capítulo 2

**Tabla 2.1.** Oligonucleótidos utilizados para cuantificar la expresión de genes involucrados en la síntesis de ácido ascórbico.

**Tabla 2.2.** Oligonucleótidos utilizados para cuantificar la expresión de genes relacionados al metabolismo y señalización hormonales.

**Tabla 2.3.** Niveles de metabolitos en hojas de las líneas transgénicas de *SNI*.

### Capítulo 3

**Tabla 3.1.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes Snakin/GASA en papa y evaluar sus niveles de expresión.

**Tabla 3.2.** Miembros de la familia de genes Snakin/GASA en papa.

**Tabla 3.3.** Elementos regulatorios identificados mediante la base PlantCARE en las secuencias promotoras putativas de los genes Snakin/GASA en papa.

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Capítulo 1

**Figura 1.1.** Mayor tolerancia a *Rhizoctonia solani* de las líneas sobreexpresantes de *SN1*.

**Figura 1.2.** Mayor tolerancia a *Erwinia carotovora* de las líneas sobreexpresantes de *SN1*.

**Figura 1.3.** Expresión de la proteína reportera  $\beta$ -glucuronidasa dirigida por el promotor de *SN1* en plantas transgénicas de papa.

**Figura 1.4.** Localización de *SN1* determinada por análisis microscopía confocal de la proteína de fusión *SN1*-EGFP en células epidérmicas agroinfiltradas de *N. benthamiana*.

**Figura 1.5.** Interacción entre moléculas de *SN1* *in vivo* mediante análisis de complementación bimolecular fluorescente (BIFC).

### Capítulo 2

**Figura 2.1.** Caracterización molecular de las líneas transgénicas.

**Figura 2.2.** Análisis fenotípico de las líneas transgénicas de *SN1*.

**Figura 2.3.** Tuberización de las líneas que sobreexpresan o silencian *SN1*.

**Figura 2.4.** Floración en las líneas que sobreexpresan o silencian *SN1*.

**Figura 2.5.** Medición de parámetros fisiológicos en las líneas que sobreexpresan o silencian *SN1*.

**Figura 2.6.** Fenotipo de las hojas y área foliar.

**Figura 2.7.** Análisis del área celular.

**Figura 2.8.** Análisis de los perfiles metabólicos de hojas de líneas transgénicas con niveles alterados de *SNI*.

**Figura 2.9.** Análisis de los niveles de ácido ascórbico total y reducido.

**Figura 2.10.** Análisis de la pared celular de las líneas transgénicas y del control NT.

**Figura 2.11.** Análisis de los niveles de especies reactivas de oxígeno en las líneas transgénicas y NT.

**Figura 2.12.** Determinación de los niveles de la enzima Ascorbato Peroxidasa.

**Figura 2.13.** Expresión relativa de genes involucrados en la síntesis y reciclaje de ácido ascórbico.

**Figura 2.14.** Efecto del ácido giberélico en el crecimiento de las líneas que sobreexpresan o silencian *SNI*.

**Figura 2.15.** Ensayo de crecimiento *in vitro* en condiciones de oscuridad de las líneas que silencian *SNI*.

**Figura 2.16.** Niveles de expresión de genes que codifican enzimas clave del metabolismo de GA y genes que forman parte de la vía de señalización de esta hormona.

**Figura 2.17.** Determinación de los niveles hormonales en las líneas que sobreexpresan o silencian *SNI*.

**Figura 2.18.** Niveles de expresión del gen *StPRI* en muestras de hoja de las líneas transgénicas.

**Figura 2.19.** Análisis de los perfiles transcripcionales en las líneas que sobreexpresan o silencian *SNI*.

**Figura 2.20.** Esquema simplificado de la vía de síntesis de esteroides.

**Figura 2.21.** Niveles de expresión del gen *StDIM/DWARF1* en muestras de ápice y hoja de las líneas transgénicas.

### Capítulo 3

**Figura 3.1.** Genes Snakin/GASA en papa.

**Figura 3.2.** Familia Snakin/GASA en papa.

**Figura 3.3.** Análisis filogenético de las proteínas Snakin/GASA.

**Figura 3.4.** Análisis de expresión de genes Snakin/GASA en distintos tejidos.

**Figura 3.5.** Regulación de la expresión de genes Snakin/GASA por GA y ABA.

**Figura 3.6.** Regulación de la expresión de genes Snakin/GASA por la bacteria *P. syringae*.

**Figura 3.7.** Regulación de la expresión de genes Snakin/GASA por el hongo *Rhizoctonia solani*.

### Capítulo 4

**Figura 4.1.** *Snakin-1* y su participación en el crecimiento y el desarrollo de la planta.

**Figura 4.2.** Modelo simplificado de la función de las proteínas Snakin/GASA.

## ABREVIATURAS

ABA: ácido absícico (*Abscisic Acid*)

ACP: análisis de componentes principales

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico copia

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

APX: ascorbato peroxidasa

BIFC: complementación bimolecular fluorescente (*Bimolecular Fluorescence Complementation*)

BSA: seroalbúmina bovina

BR: brasinoesteroides

BrEt: bromuro de etidio

°C: grados centígrados

cm: centímetros

col: colaboradores

CP: componente principal

DAB: diaminobencidina

dNTPs: deoxinucleósidos trifosfatos

DHA: dehidroascorbato

DHAR: dehidroascorbato reductasa

DO: densidad óptica

dpi: días luego de la infección (*days post-infection*)

EDTA: Etilenediaminotetracético

EROs: especies reactivas de oxígeno

FT-IR: espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (*Fourier Transformed-Infrared Spectroscopy*)

GA: ácido giberélico (*Gibberellic Acid*)

GASA: *Gibberellic Acid-Stimulated in Arabidopsis*

GC-MS: cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (*Gas chromatography–mass spectrometry*)

GFP: proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

GUS: gen de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa

H<sub>2</sub>DCF-DA: 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia (*High-performance liquid chromatography*)

JA: ácido jasmónico (*Jasmonic Acid*)

MDHA: monodehidroascorbato

MDHAR: monodehidroascorbato reductasa

M: molar

mg: miligramos

ml: mililitros

mM: milimolar

NBT: nitroazul de tetrazolio (*Nitroblue Tetrazolium*)

ng: nanogramos

nm: nanómetros

NT: no transgénica

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PGSC: Consorcio de Secuenciación del Genoma de la Papa (*Potato Genome Sequencing Consortium*)

RNA-seq: *RNA Sequencing*

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR: retro transcriptasa–reacción en cadena de la polimerasa

RT-qPCR: *Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction*

SA: ácido salicílico (*Salicylic Acid*)

SN1: Snakin-1

subsp: subespecie

U: unidades

YFP: proteína amarilla fluorescente (*Yellow Flourescent Protein*)

µg: microgramo

µl: microlitro

µm: micrómetro

µM: micromolar

35S: promotor 35S del virus del mosaico del coliflor

## RESUMEN

Snakin-1 (SN1) es un péptido antimicrobiano rico en cisteínas aislado a partir de *Solanum tuberosum* que fue clasificado como miembro de la familia Snakin/GASA. Con el objetivo de estudiar el rol de *SN1 in planta*, se realizó una caracterización detallada de líneas sobreexpresantes y silenciadas para este gen. Si bien la sobreexpresión de *SN1* no resultó en diferencias morfológicas evidentes con respecto a las plantas sin transformar, las líneas silenciadas mostraron una altura reducida, hojas de una forma atípica y de menor tamaño, e importantes defectos en los procesos de floración y de tuberización. El área foliar de las mismas presentó una disminución del 50-60% como resultado de un menor número de células por hoja. Con el fin de identificar vías metabólicas y procesos fisiológicos afectados en las líneas transgénicas se analizaron los perfiles metabólicos y la composición de la pared celular de las hojas. Asimismo, se estudió la participación de *SN1* en la homeostasis redox y en el balance hormonal. Finalmente se hicieron análisis de los perfiles transcripcionales de las líneas transgénicas con el fin de esclarecer el modo de acción de *SN1*. Los resultados obtenidos demuestran que el silenciamiento de *SN1* afecta la división celular, el metabolismo primario y la composición de la pared celular lo cual resulta en notorias alteraciones fenotípicas e indica que este gen participa en el crecimiento y en el desarrollo además de su rol en defensa. Como fue descrito para otros genes de la familia Snakin/GASA, es posible que *SN1* cumpla su rol mediante la modulación de las especies reactivas de oxígeno y de la síntesis de hormonas en la planta.

Asimismo, la disponibilidad del genoma secuenciado de la papa nos permitió identificar 14 nuevos miembros de la familia Snakin/GASA que se suman a los tres genes previamente reportados para esta especie.

Palabras clave: *Snakin-1*, Snakin/GASA, dominio rico en cisteínas, desarrollo, división celular, metabolismo primario, pared celular, regulación redox, *crosstalk* hormonal, papa

## ABSTRACT

### **Functional analysis of *Snakin-1* in *Solanum tuberosum* transgenic lines**

Snakin-1 (SN1) is an antimicrobial cysteine-rich peptide isolated from *Solanum tuberosum* that was classified as a member of the Snakin/GASA protein family. In this work, a transgenic approach was used to study the role of *SN1 in planta*. Even when overexpressing *SN1* potato lines did not show remarkable morphological differences from wild type (WT), *SN1* silencing resulted in reduced height, reduced leaf size, malformed leaves and severe alterations in tuberization and flowering process. *SN1* silenced lines had a leaf area reduction of 50-60% with respect to WT leaves as a result of a reduced number of epidermal cells. In order to identify metabolic pathways and physiological processes affected in transgenic lines we analyzed metabolic profiles and cell wall composition from overexpressing and silenced lines as well as WT leaves. Moreover, we studied *SN1* involvement in redox homeostasis and hormonal balance. Finally, transcriptional profiling analyses were performed to gain insight into the mode of action of *SN1*. We demonstrated that *SN1* silencing results in an abnormal phenotype and affects cell division, leaf primary metabolism and cell wall composition in potato plants, suggesting that *SN1* has additional roles in growth and development beyond its previously assigned role in plant defense. It is possible that SN1 plays its role by modulating reactive oxygen species and synthesis and hormone levels in plants, as it was described for others genes of Snakin/GASA family.

Furthermore, 14 novel Snakin/GASA family members were identified in the recently sequenced potato genome in addition to the previously reported genes (*SN1*, *SN2* and *SN3*) suggesting that the Snakin/GASA gene family in potato consists of 17 members.

Key words: *Snakin-1*, Snakin/GASA, cysteine-rich domain, plant development, cell division, cell wall, primary metabolism, redox regulation, hormone crosstalk, potato

# Capítulo 1: Introducción general

## 1.1 Introducción

### 1.1.1 Snakin-1 y su función en defensa

Snakin-1 (SN1) fue aislado a partir de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* cv. Desireé) y ha sido descrito como un péptido antimicrobiano (Segura y col. 1999). Se caracteriza por presentar 63 aminoácidos de los cuales 12 son cisteínas y fue clasificado como miembro de la familia Snakin/GASA basado en la alta homología de secuencia de aminoácidos que presenta cuando se lo compara con péptidos de la familia GASA (*Gibberellic Acid-Stimulated in Arabidopsis*) de *Arabidopsis* (Berrocal-Lobo y col. 2002).

Se demostró que el péptido purificado presenta actividad *in vitro*, aún en concentraciones menores a 10 mM, frente a patógenos fúngicos y bacterianos. Con respecto a las bacterias susceptibles a este péptido se encuentran: *Ralstonia solanaceacerum*, *Erwinia chrysanthemi*, *Rhizobium meliloti* y *Listeria monocytogenes*, y en cuanto a los hongos se describieron: *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxyspotum* f. sp *conglutinans*, *Fusarium oxyspotum* f. sp *lycopersici*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Colletotrichum graminicola*, *Colletotrichum lagenarium*, *Bipolares maydys* y *Aspergillus flavus* (Segura y col. 1999, Lopez-Solanilla y col. 2003). En combinación con PTH1, una defensina de papa, SN1 mostró tener un efecto sinérgico ante la bacteria *Clavibacter michiganensis* subespecie *sepedonicus* y efectos aditivos contra el hongo *B. cinerea*. (Segura y col. 1999). Posteriormente, la expresión y purificación de SN1 utilizando un sistema procariota y la caracterización subsecuente de la actividad antimicrobiana de la proteína recombinante demostraron que el crecimiento de la bacteria *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* fue completamente inhibido por 14 µM de SN1

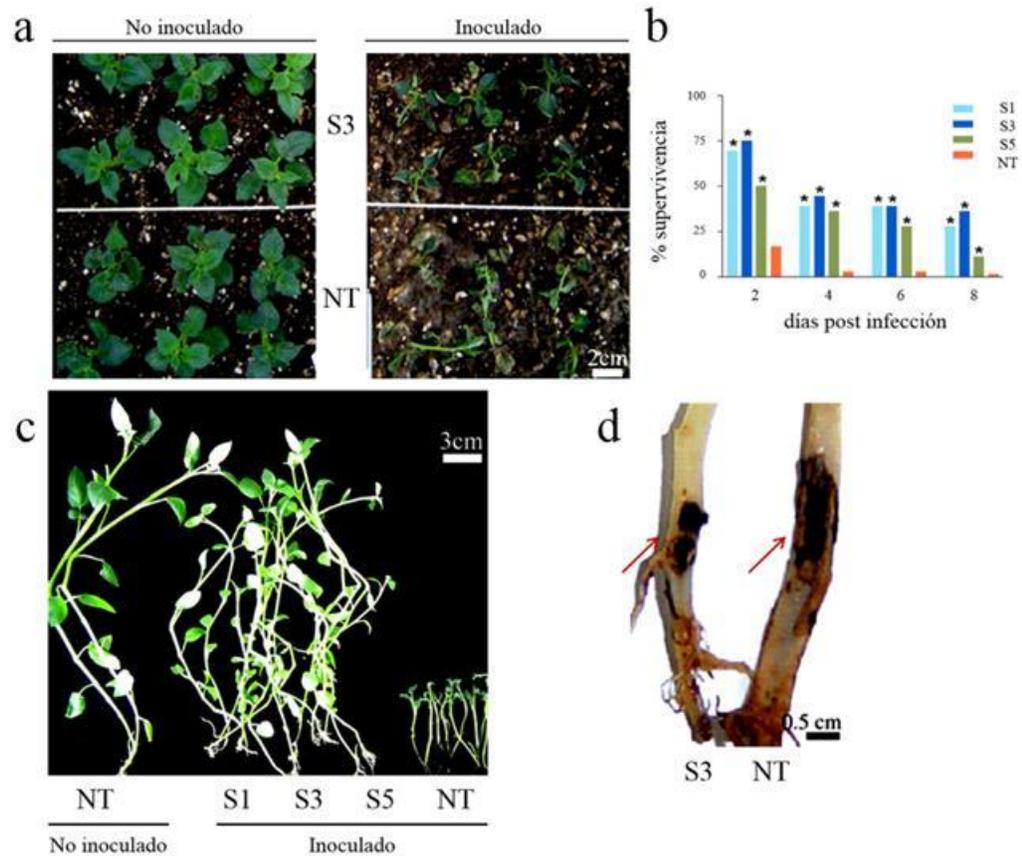
mientras que *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *P. syringae* pv. *tabaci* mostraron un menor nivel de sensibilidad; en cuanto a patógenos fúngicos evaluados, se observó que esa concentración de péptido es capaz de inhibir completamente la germinación de las esporas de *Collectotrichum coccoides* y *B. cinerea*. Asimismo, en combinación con PTH1 recombinante se observó un efecto sinérgico de SN1 frente a *P. syringae* pv. *syringae* y un efecto aditivo frente a *P. syringae* pv. *tabaci* (Kovalskaya y Hammond 2009).

SN1 es capaz de agregar bacterias *in vitro* aunque la actividad antimicrobiana observada no se correlaciona con dicha capacidad. Esto último fue demostrado en ensayos de crecimiento bacteriano en los cuales no se observó inhibición del mismo aún en concentraciones suficientes para generar agregación de las bacterias. De cualquier manera se sugirió que esta capacidad de agregación pueda ser relevante *in vivo* al controlar la migración del patógeno a áreas aún no afectadas (Segura y col. 1999).

Snakin-2 (SN2), es otro miembro de la familia Snakin/GASA de papa, que, así como SN1, fue aislado a partir de tubérculos y caracterizado como un péptido antimicrobiano al demostrarse su actividad *in vitro* frente a varios patógenos fúngicos y bacterianos (Berrocal-Lobo y col. 2002). Recientemente se demostró que el silenciamiento del homólogo de SN2 en tomate incrementa la susceptibilidad de *Nicotiana benthamiana* a la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y el desarrollo de síntomas de la enfermedad (Balaji y col. 2011). Asimismo, líneas transgénicas de tomate que sobreexpresan este gen no presentaron diferencias fenotípicas evidentes con respecto a las plantas no transformadas y exhibieron una reducción en el área de la lesión, en el tamaño de la población bacteriana *in planta* y en los síntomas cuando fueron desafiadas con

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, evidenciando la participación de este gen en las respuestas de defensa de la planta (Balaji y Smart 2012).

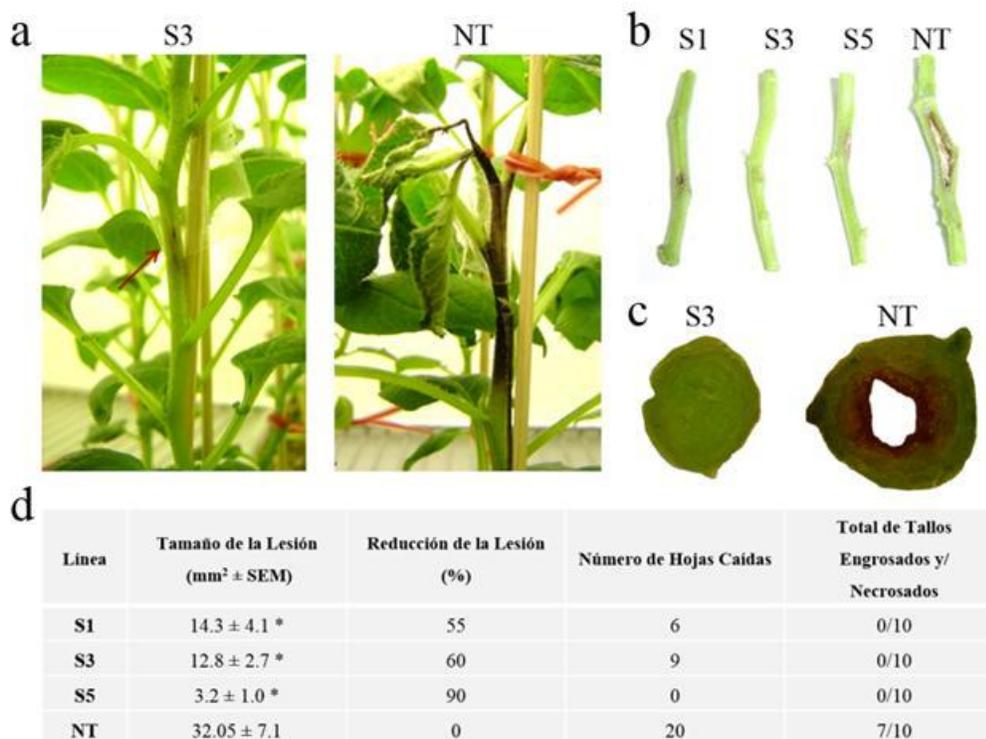
Con el objetivo de caracterizar *in vivo* la función del gen *SNI* en nuestro grupo se obtuvieron plantas transgénicas de papa que sobreexpresan o silencian el mismo. La sobreexpresión o silenciamiento de un gen de interés en plantas transgénicas puede resultar en la exacerbación del fenotipo en el cual el gen en cuestión estaría involucrado. Esto permite avanzar en la determinación de la función de genes candidatos e identificar aquellos con potencial interés biotecnológico. De esta manera, demostramos que plantas transgénicas de papa que sobreexpresan el gen *SNI* presentan resistencia a enfermedades causadas por patógenos de gran importancia comercial como *Rhizoctonia solani* y *Erwinia caratovora* (Almasia y col. 2008). Las líneas sobreexpresantes que acumulan altos niveles de ARNm de *SNI* (S1-S3-S5) mostraron porcentajes de supervivencia significativamente mayores a los de las plantas control no transgénicas (NT) y exhibieron reducciones de los síntomas causados por la infección provocada por el hongo *R. solani* (Figura 1.1).



**Figura 1.1. Mayor tolerancia a *Rhizoctonia solani* de las líneas sobreexpresantes de *SNI*.** (a) Vista en detalle de las plantas de la línea S3 y de las no transgénicas (NT) crecidas en suelo inoculado o no inoculado. A los 2 días post infección (dpi), la mayoría de las plantas no transgénicas crecidas en suelo inoculado presentaron el síntoma típico de la infección que consiste en la caída completa de la planta a la altura del suelo (*damping-off*) mientras que las líneas transgénicas no presentaban síntomas importantes. (b) Porcentaje de supervivencia a distintos días post infección. Los \* indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto a las plantas NT. (c) Plantas no transgénicas (NT) y sobreexpresantes (S1-S5) crecidas en medio no inoculado e inoculado a los 10 dpi. El fenotipo exhibido por las plantas sobreexpresantes crecidas en suelo inoculado fue comparable al de las plantas control no transformadas crecidas en suelo no inoculado. (d) Detalle del daño causado por *R. solani* en el tallo de una planta transgénica (S3) y una NT.

Las líneas sobreexpresantes de *SNI* (S1-S3-S5) mostraron también un fenotipo tolerante frente a infecciones provocadas por *E. carotovora*. La severidad de la lesión causada por

esta bacteria resultó ser claramente menor en las plantas transgénicas con respecto a las plantas control no transformadas (Figura 1.2).



**Figura 1.2. Mayor tolerancia a *Erwinia carotovora* de las líneas sobreexpresantes de *SNI*.** (a) Fotos representativas tomadas a los 10 dpi donde se observan las lesiones provocadas por el patógeno en una planta de la línea S3 y sin transformar NT. Mientras que las plantas no transformadas mostraban una lesión grande y continua de color marrón, las plantas de las líneas transgénicas exhibían sólo un pequeño daño en el sitio de la inoculación. (b) Detalle de tallos mostrando las lesiones causadas en las distintas líneas. (c) Sección transversal del tallo a la altura del punto de inoculación en la línea S3 y el control sin transformar donde se evidencia el daño producido. (d) Evaluación de los síntomas de la enfermedad calculados a partir de diez réplicas biológicas de cada línea transgénica (S1, S3 y S5) y de los controles NT a los 10 dpi. Considerando máximo al promedio de la lesión de las plantas no transgénicas y asignándole arbitrariamente 0 al porcentaje de reducción de la enfermedad, se determinó que los tallos de las plantas transgénicas exhibieron una significativa reducción de la lesión que osciló entre 55% y 90%.

Estos resultados indicaron que el gen *SNI* está involucrado en la defensa frente a infecciones fúngicas y bacterianas *in vivo*. Si bien las plantas sobreexpresantes y las no

transgénicas son indistinguibles fenotípicamente, se observan diferencias morfológicas evidentes entre líneas que silencian *SNI* y las no transformadas, lo que nos sugiere que este gen podría tener una función adicional además de su reconocida participación en defensa.

### 1.1.2. Familia de proteínas Snakin/GASA

En los últimos años, se han identificado miembros de la familia de proteínas Snakin/GASA en un amplio rango de especies, como tomate (*Solanum lycopersicum*) (*GAST1*, *RSI-1*, *SLSN2*) (Shi y col. 1992, Taylor y col. 1994, Balaji y col. 2011), petunia (*Petunia hybrida*) (*GIP1-5*) (Ben-Nissan y col. 1996), Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) (*GASA 1-15*) (Herzog y col. 1995, Aubert y col. 1998; Roxrud y col. 2007), papa (*Solanum tuberosum*) (*SNI-2-3*) (Segura y col. 1999, Berrocal-Lobo y col. 2002), poroto (*Phaseolus vulgaris*) (*FBCBP*) (Bindschedler y col. 2006), arroz (*Oryza sativa*) (*OsGASRI-2*, *OsGSRI*) (Furukawa y col. 2006, Wang y col. 2009), gerbera (*Gerbera hybrida*) (*GEG*) (Kotilainen y col. 1999), frutilla (*Fragaria ananassa*) (*FaGASTI-2*) (de la Fuente y col. 2006, Moyano-Cañete y col. 2012), haya (*Fagus sylvatica*) (*FsGASA4*) (Alonso-Ramírez y col. 2009), maíz (*Zea mays*) (*ZmGSL1-10*) (Zimmermann y col. 2010), soja (*Glicine soja*) (*GsGASA1*) (Li y col. 2011), pimiento (*Capsicum annuum*) (*CaSn*) (Mao y col. 2011), orquídea (*Gymnadenia conopsea*) (*GcGAST*) (Bai y col. 2013) y palta (*Persea americana*) (*PaSn*) (Guzmán Rodríguez y col. 2013). Los genes Snakin/GASA codifican para pequeñas proteínas en las cuales se pueden distinguir tres dominios característicos: (1) un péptido señal putativo de 18–29 aminoácidos; (2) una región intermedia que presenta gran variabilidad entre distintos miembros de la familia en cuanto a composición y número de aminoácidos; y (3) una región C-terminal de aproximadamente 60 aminoácidos con 12 cisteínas en posiciones conservadas denominado dominio GASA (Aubert y col. 1998). A

pesar de tener estas características comunes, sus funciones no han sido dilucidadas completamente y se conoce muy poco acerca de su mecanismo de acción hasta el momento. Ninguna de las proteínas Snakin/GASA tienen motivos o sitios activos conocidos, y si bien existen varios estudios donde se busca determinar sus funciones en distintas especies de plantas, aún no se conoce totalmente su actividad bioquímica y no existe un consenso en cuanto a su rol biológico. El hecho de que el número y posiciones de las cisteínas en el dominio GASA se hayan mantenido sin cambios durante la evolución sugiere que estos residuos cumplen un papel central y podrían ser importantes para determinar las funciones bioquímicas y/o propiedades estructurales de estas proteínas (Ben-Nissan y col. 2004).

#### 1.1.2.1 Los genes Snakin/GASA y su relación con las hormonas

El primer miembro de la familia Snakin/GASA identificado fue el gen *GAST1* (*Gibberellic Acid-Stimulated Transcript 1*) en tomate y se demostró que su expresión es inducida por ácido giberélico (GA, *Gibberellic Acid*) en mutantes deficientes de esta hormona (Shi y col. 1992). A partir de este trabajo, se han descrito un gran número de genes Snakin/GASA y se ha evidenciado que muchos de ellos están regulados transcripcionalmente por GA. En este sentido, se ha observado que la aplicación exógena de esta hormona incrementa el nivel de transcripción de 6 de los 15 genes GASA (*GASA1*, *GASA4*, *GASA6*, *GASA7*, *GASA8* y *GASA13*) (Herzog y col. 1995, Zhang y col. 2008), del gen *GEG* (Kotilainen y col. 1999), de los genes GIP (*GIP1*, *GIP2*, *GIP4* y *GIP5*) (Ben-Nissan y col. 2004), de *OsGASR1*, *OsGASR2* y *OsGSRI* (Furukawa y col. 2006, Wang y col. 2009), *FaGAST1* (de la Fuente y col. 2006), *FsGASA4* (Alonso-Ramírez y col. 2009), *ZmGSL1*, *ZmGSL2*, *ZmGSL4*, *ZmGSL6*, y *ZmGSL9* (Zimmermann y col. 2010). Contrariamente, la expresión de *GASA5*, *GASA9* y *GASA11* así como también de *SN2* es

inhibida por esta hormona (Berrocal-Lobo y col. 2002, Zhang y col. 2008, Zhang y col. 2009). Si bien en un principio se consideraba a la regulación de la expresión por GA como una característica que definía a la familia de genes Snakin/GASA, ésta no ha sido confirmada para todos los miembros. En este sentido, la expresión de *SNI*, *GASA10*, *GASA12*, *GASA14* y *GASA15* no sería afectada por esta hormona (Segura y col. 1999, Zhang y col. 2008).

Adicionalmente, se ha registrado la expresión diferencial de ciertos genes Snakin/GASA frente al tratamiento con ácido absícico (ABA, *Abscisic Acid*). De esta manera, se demostró que la expresión de *GASA2*, *GASA3* y *GASA14* es inducida por ABA y no se ve afectada por GA, mientras que la expresión de *GASA9* se inhibe por ambas hormonas (Zhang y col. 2008). Además, el ABA también actúa como antagonista con GA en la expresión de *GAST1*, *GIP1*, *GASA4-7* y *SN2* (Shi y col. 1992, Ben-Nissan y col. 1996, Berrocal-Lobo y col. 2002, Zhang y col. 2008, Zhang y col. 2009). Asimismo, el análisis de los promotores de estos genes en *Arabidopsis* reveló la presencia de un gran número de sitios de respuesta a GA y ABA (Zhang y col. 2008).

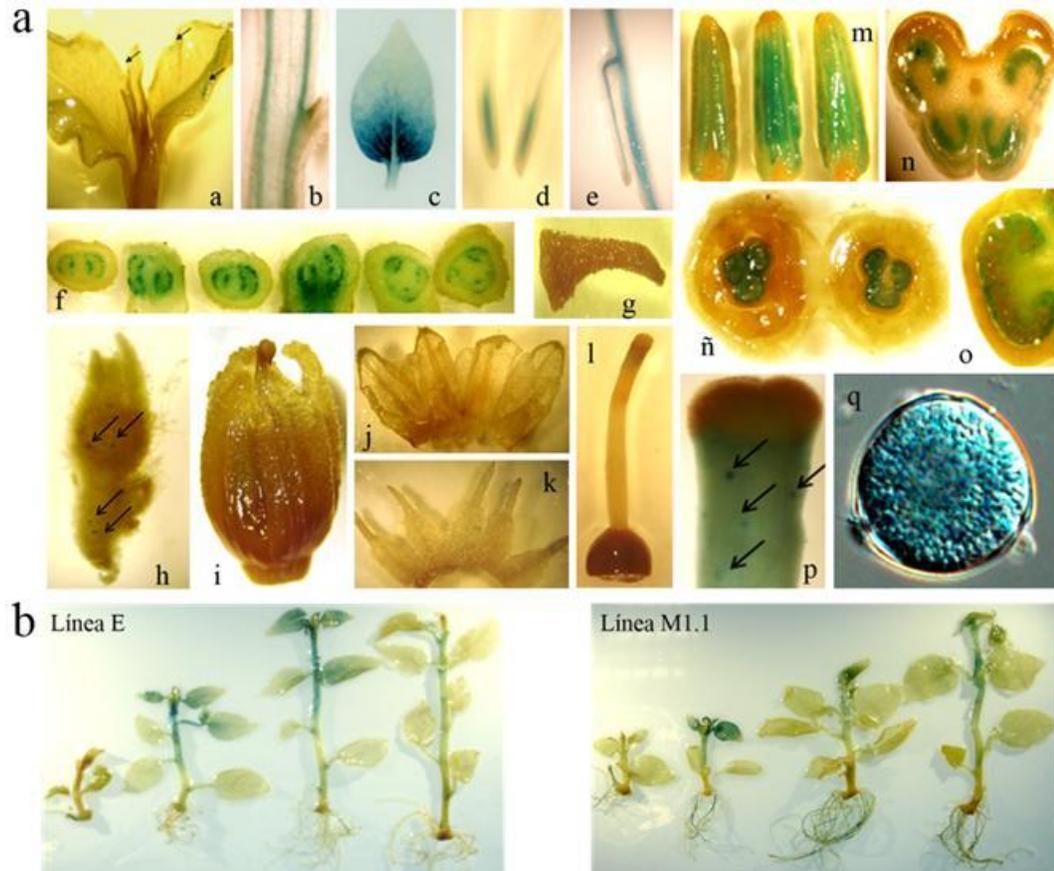
Estudios adicionales demostraron la participación de otras hormonas también en la modulación de la expresión de los genes Snakin/GASA sugiriendo que el patrón de regulación de estos genes es en realidad más complejo. Por ejemplo, la expresión de *RSI-1* es inducida por auxinas (Taylor y col. 1994) mientras que la expresión de *GASAI* y *OsGSRI* es inducida por GA y reprimida por brasinoesteroides (BR) (Bouquin y col. 2001, Wang y col. 2009).

### 1.1.2.2 Patrones de expresión temporales y espaciales de los genes Snakin/GASA

La expresión de los genes Snakin/GASA ha sido observada en diferentes órganos de la planta y en distintos momentos del desarrollo. Además, el análisis más detallado de la localización espacial por hibridación *in situ* o tinciones histoquímicas utilizando una proteína reportera fusionada al promotor del gen en estudio reveló que cada miembro de la familia presenta un patrón de expresión altamente específico y restringido a tejidos definidos (Taylor y col. 1994, Aubert y col. 1998, Roxrud y col. 2007, Segura y col. 1999, Wang y col. 2009, Kotilainen y col. 1999, de la Fuente y col. 2006, Zimmermann y col. 2010). Por ejemplo, en frutilla, la expresión de *FaGAST1* es elevada en frutos y raíces pero muy baja en hojas y estolones. Dentro del fruto, su expresión ha sido detectada únicamente en el receptáculo y no en aquenios, mientras que en raíces la expresión de *FaGAST1* está limitada a las células que se encuentran al final de la zona de elongación (de la Fuente y col. 2006). En *Arabidopsis*, la expresión de *GASA8* y *GASA10* fue detectada mediante RT-PCR en todos los órganos analizados (Zhang y col. 2008). Particularmente en raíces, la actividad de pGASA8::GUS es fuerte en las células de la zona de elongación y está ausente en la punta de la raíz, mientras que la actividad de pGASA10::GUS ha sido detectada en el tejido vascular y en la punta de la raíz (Roxrud y col. 2007).

Además, los genes Snakin/GASA se expresan en etapas precisas del desarrollo de la planta. Por ejemplo, en gerbera, el patrón de expresión de *GEG* coincide con el final de la elongación celular en corolas y carpelos (Kotilainen y col. 1999), y en petunia, *GIP2* se expresa en tallos y corolas en elongación, mientras que la expresión de *GIP4* y *GIP5* es detectada en etapas más tempranas del desarrollo (Ben-Nissan y col. 1996, Ben-Nissan y col. 2004).

En el caso de *SN1*, mediante ensayos de *Northern blot*, Segura y col. (1999) detectaron su expresión en tubérculos, tallos, yemas axilares y yemas florales jóvenes pero no en raíces, estolones ni hojas. Asimismo, no se registró expresión en hojas aún al agregar estímulos bióticos o abióticos por lo que se propuso que el péptido *SN1* podría ser un componente importante de las defensas constitutivas de la planta, expresándose especialmente en órganos de almacenamiento y reproductivos. El análisis mediante hibridación *in situ* reveló que *SN1* se expresa fuertemente en el estilo, en óvulos y en la región de las células acompañantes del tejido de transmisión de las flores antes de la antesis, en las capas epidérmicas y subepidérmicas del tallo así como también en la región correspondiente al ápice de la raíz (Segura y col. 1999). Posteriormente, nuestro grupo aisló y caracterizó la secuencia regulatoria de *SN1*. En ensayos de tinción histoquímica de GUS se demostró que el promotor es activo sólo en ciertos tejidos como cotiledones, raíces, hojas jóvenes y órganos florales, en células de rápida división y tejido meristemático como así también en tejido vascular (Figura 1.3 a). Asimismo, el estudio temporal permitió detectar la expresión de la proteína reportera con una fuerte intensidad en etapas tempranas del desarrollo que va disminuyendo con el crecimiento de la planta (Figura 1.3 b) (Almasia 2009).

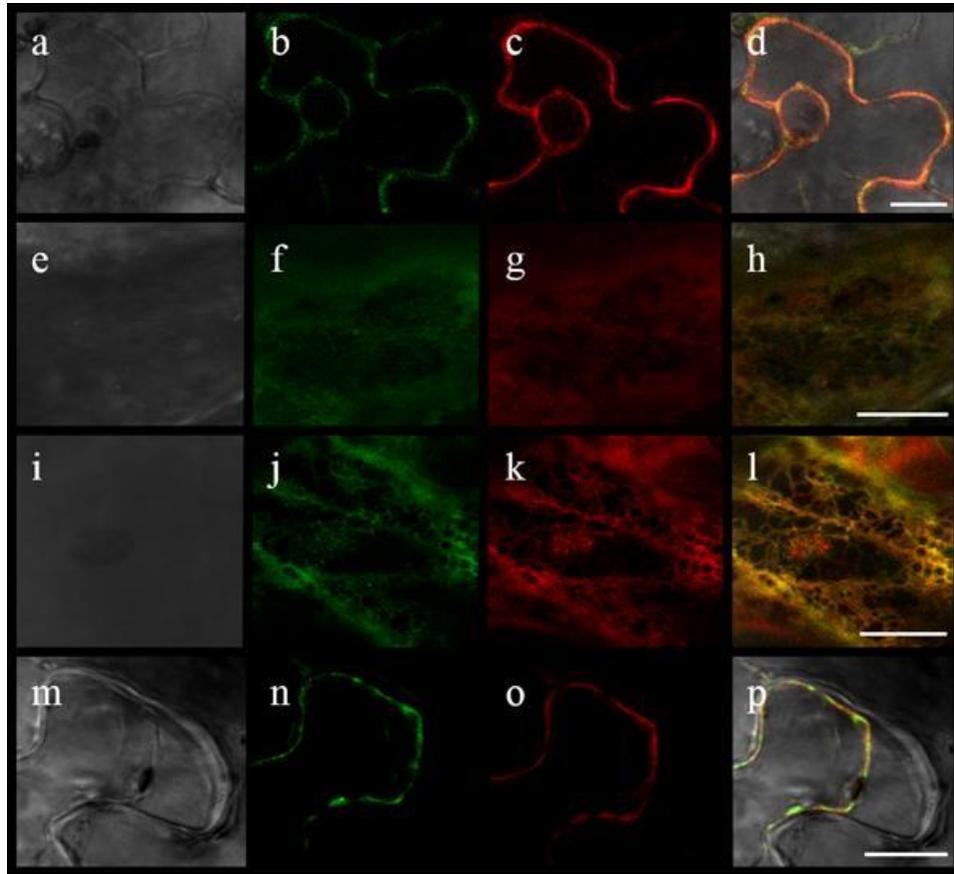


**Figura 1.3. Expresión de la proteína reportera  $\beta$ -glucuronidasa dirigida por el promotor de *SNI* en plantas transgénicas de papa.** (a) Expresión espacial de la proteína reportera dirigida por el promotor de *SNI* : (a) Ápice, (b) Corte longitudinal de tallo, (c) Hoja joven, (d) Raíces, (e) Raíz secundaria, (f) Cortes transversales seriados del tallo, (g) Pedúnculo floral, (h) Botón floral muy joven, (i) Capullo floral, (j) Pétalos, (k) Sépalos, (l) Carpelo, (m) Anteras, (n) Corte transversal de la antera, (ñ) Receptáculo y estigma floral, (o) Corte transversal del capullo floral, (p) Detalle del ovario, (q) Vista microscópica de un grano de polen. (b) Expresión temporal de la proteína reportera dada por el promotor de *SNI*.

### 1.1.2.3 Localización subcelular de las proteínas Snakin/GASA

La determinación de la localización subcelular de una proteína puede brindar información relevante que aporte al entendimiento de su función y en el caso de las proteínas Snakin/GASA las evidencias indican que es variable entre los diferentes miembros de la familia. Si bien la posible localización de varios de estos péptidos ha sido

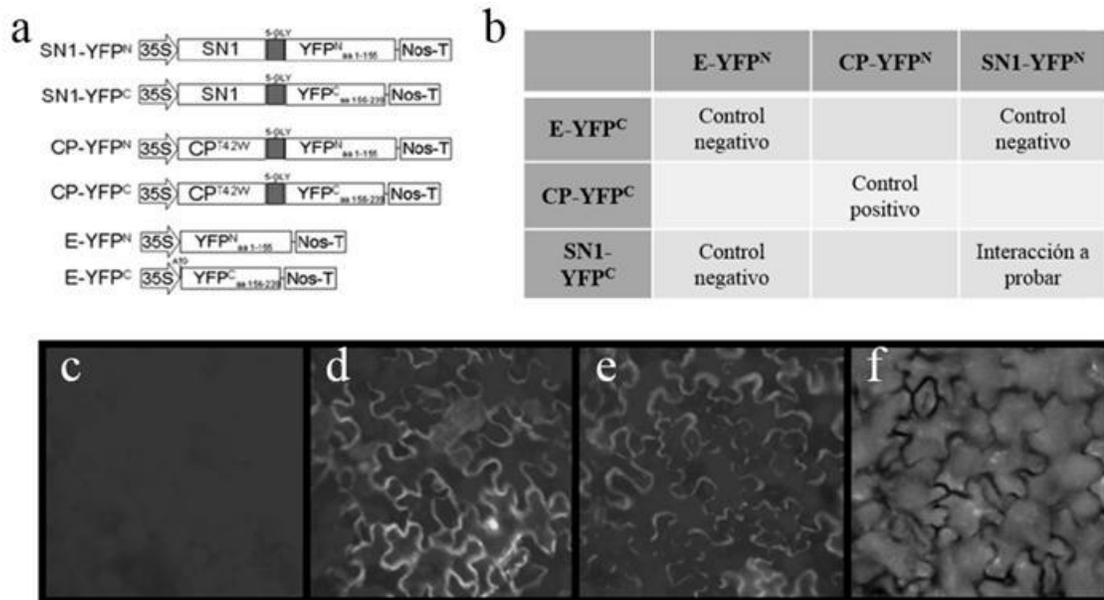
predicha a partir del análisis de sus secuencias, solamente se ha determinado experimentalmente la localización subcelular de algunos de ellos. La expresión transiente de la proteína de fusión GIP1::GFP (*Green Fluorescent Protein*) en células de tabaco *bright yellow 2* (BY2) sugirió que GIP1 se localiza en retículo endoplasmático (Ben-Nissan y col. 2004). Asimismo, cuando se expresaron transientemente las fusiones OsGASR1::GFP, OsGASR2::GFP y OsGSR1::GFP en células epidérmicas de cebolla, se observó que los péptidos OsGASR están restringidos al apoplasto o pared celular, mientras que OsGSR1 se localiza en membrana plasmática, citoplasma y núcleo (Furukawa y col. 2006, Wang y col. 2009). También se ha demostrado, mediante el mismo sistema experimental, que GASA5 se localiza en la pared celular y/o matriz extracelular y que GsGASA1 se encuentra en membrana plasmática, citoplasma y núcleo (Zhang y col. 2009, Li y col. 2011). En experimentos de co-localización nuestro grupo demostró que SN1::GFP se localiza en la membrana plasmática de hojas agroinfiltradas de *Nicotiana benthamiana* (Figura 1.4) (Almasia 2009). Recientemente, a partir del estudio de plantas transgénicas 35S:GASA14-GFP se determinó que la localización subcelular de GASA14 se corresponde con la membrana plasmática (Sun y col. 2013).



**Figura 1.4. Localización de SN1 determinada por análisis microscopía confocal de la proteína de fusión SN1-EGFP en células epidérmicas agroinfiltradas de *N. benthamiana*.** (b, f, j y n) Expresión de SN1-EGFP, (c, g y o) marcador de membrana plasmática (pm-rk), (k) marcador de retículo endoplasmático (ER-rk). (a-d) Corte transversal de una célula sin plasmólisis. (m-p) Corte transversal de una célula con plasmólisis. (e-l) Corte transversal de células agroinfiltradas. (a, e, i y m) Campo claro. (d, h, l y p). Superposición de los canales GFP y RED. Barra = 10  $\mu$ m.

A pesar de la presencia de un péptido señal putativo y la ausencia de otras posibles señales de localización, no todas las proteínas Snakin/GASA están direccionadas a la pared celular y/o matriz extracelular. Es posible que en algunos casos la localización esté determinada por modificaciones post-traduccionales, interacciones electrostáticas, uniones covalentes a lípidos de membrana o asociación/interacción con otras proteínas. En este sentido, existen algunos ejemplos de interacciones proteicas que involucran proteínas Snakin/GASA. Se ha demostrado que un péptido similar a SN2 de poroto se encuentra

asociado a una proteína rica en prolina, dando como resultado un complejo de dos componentes (FBCBP) (Bindschedler y col. 2006). Asimismo, se ha observado que OsGSR1 interactúa con la enzima DIM/DWF1 implicada en la síntesis de BR (Wang y col. 2009), y en nuestro grupo se demostró que al menos dos moléculas de SN1 son capaces de interactuar *in vivo* en ensayos de complementación bimolecular fluorescente (BIFC) (Figura 1.5) (Almasia 2009). Recientemente, se demostró que SN1 interactúa con el transportador de sacarosa StSUT1 aunque el rol fisiológico de esta interacción no se conoce hasta el momento (Krügel y col. 2012)



**Figura 1.5. Interacción entre moléculas de SN1 *in vivo* mediante análisis de complementación bimolecular fluorescente (BIFC).** (a) Esquema de los plásmidos empleados en los ensayos de BiFC: SN1: gen *SN1*, 35S: promotor del virus del mosaico del coliflor; NosT: terminador de la transcripción del gen *nos*; YFP<sup>N</sup><sub>aa 1-155</sub>: Fragmento N-terminal de la YFP incluyendo los aminoácidos del 1 al 155; YFP<sup>C</sup><sub>aa 156-239</sub>: fragmento C-terminal de YFP desde los aminoácidos 156 al 239; CP<sup>T42W</sup>: Proteína de cápside viral mutante de *Tobacco mosaic virus*. (b) Combinación de las construcciones coexpresadas en los ensayos de BIFC. (c-f) Imágenes del microscopio de fluorescencia de células epidérmicas de hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas: (c) control negativo, (d) control positivo, (e) SN1-YFP<sup>N</sup> y SN1-YFP<sup>C</sup> y (f) imagen del microscopio con luz blanca de las células epidérmicas. Barra = 10  $\mu$ m.

#### 1.1.2.4 Participación de los genes Snakin/GASA en el desarrollo de la planta y tolerancia a estreses

La determinación de la función de algunos genes Snakin/GASA se ha basado principalmente en análisis de patrones de expresión y la caracterización fenotípica de mutantes y plantas transgénicas. De esta manera, algunos de ellos han sido involucrados en procesos celulares como la promoción de la elongación celular (Shi y col. 1992, Ben-Nissan y col. 1996, Ben-Nissan y col. 2004), la inhibición de la elongación (Kotilainen y col. 1999, de la Fuente y col. 2006), y la división celular (Aubert y col. 1998, Ben-Nissan y col. 2004, Furukawa y col. 2006). Por otro lado, también se ha demostrado que las proteínas Snakin/GASA cumplen importantes roles en el desarrollo de las plantas y en algunos casos se vio que participan en la formación de las raíces, en el crecimiento del tallo, el tiempo de floración y la maduración de los frutos (Taylor y col. 1994, Ben-Nissan y col. 2004, de la Fuente y col. 2006, Zhang y col. 2009, Zimmermann y col. 2010). Además, algunos miembros de la familia fueron implicados en respuestas a estreses bióticos o abióticos como la defensa frente a patógenos (Segura y col. 1999, Berrocal-Lobo y col. 2002, Almasia y col. 2008, Faccio y col. 2011, Mao y col. 2011) y la tolerancia a estrés oxidativo o térmico (Alonso-Ramírez y col. 2009a, Ko y col. 2011).

Es importante destacar que diferentes miembros de la familia pueden cumplir la misma función o justamente la opuesta. Además, las evidencias indican que un determinado gen Snakin/GASA puede cumplir diferentes roles y podría participar en más de un proceso de desarrollo de la planta. En *Arabidopsis*, *GASA4* ha sido implicado en la regulación de la identidad del meristema floral y también se vio que afecta el peso y tamaño de las semillas (Roxrud y col. 2007). Por otro lado, también se ha demostrado que *GASA4* está involucrado en la elongación del hipocótilo y floración en respuesta a la integración de la señalización

por luz y GA (Chen y col. 2008), y, además, su sobreexpresión incrementa la tolerancia a estrés por calor (Ko y col. 2007). Contrariamente, se ha sugerido que *GASA5* actúa como un regulador negativo no sólo del crecimiento del tallo y del desarrollo floral sino también en la respuesta de la planta frente a temperaturas elevadas (Zhang y col. 2009, Zhang y col. 2011). Asimismo, la sobreexpresión de *GASA5* bloquea la señalización por ácido salicílico (SA, *Salicylic Acid*) y reduce la capacidad antioxidante y la acumulación de proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*) (Zhang y col. 2011). Finalmente, la sobreexpresión de *FsGASA4* aumenta la tolerancia frente a estrés salino, oxidativo y causado por calor durante la germinación a través del incremento de la síntesis de SA (Alonso-Ramírez y col. 2009a, Alonso-Ramírez y col. 2009b).

#### 1.1.2.5 Las proteínas Snakin/GASA y el balance redox

Los análisis informáticos sugieren que las cisteínas presentes en las proteínas Snakin/GASA podrían crear potencialmente hasta cinco puentes disulfuro (Wigoda y col. 2006). Estas cisteínas conservadas podrían ser importantes para la generación de una estructura tridimensional esencial y/o para la interacción con otras proteínas (Ben-Nissan y col. 2004).

Por otro lado, los puentes disulfuro podrían actuar catalíticamente en caso de ser oxidados o reducidos reversiblemente. Dado que todas las proteínas Snakin/GASA tienen sitios redox putativamente activos, es decir, pares de cisteínas separadas por uno o dos aminoácidos, se ha especulado que podrían cumplir un rol en la regulación redox (Wigoda y col. 2006). En este sentido, Weiss y colaboradores han demostrado que la expresión de *GIP2*, *GIP4* y *GIP5* se induce por  $H_2O_2$  y que la sobreexpresión de *GIP2* en líneas transgénicas de petunia reduce los niveles de  $H_2O_2$  en hojas previamente dañadas y en

células de la guarda luego de un estrés osmótico o al ser tratadas con ABA (Wigoda y col. 2006). De la misma forma, este grupo ha demostrado recientemente que la sobreexpresión de *GASA4* en *Arabidopsis* es capaz de suprimir la acumulación tanto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como de óxido nítrico en hojas heridas. Además, la expresión en plantas de versiones mutadas de esta proteína reveló que las cisteínas conservadas de *GASA4* son esenciales para su actividad redox y la promoción de las respuestas asociadas a GA como son la floración y la germinación de las semillas (Rubinovich y col. 2010).

### 1.1.3. Modelo de trabajo: *Solanum tuberosum*

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es un miembro de las Solanaceas, una familia importante económicamente que incluye tomate, pimiento, berenjena, petunia y tabaco. *S. tuberosum* se divide en dos subespecies: la *andigena*, adaptada a condiciones de días breves, cultivada principalmente en los Andes, y *tuberosum*, la variedad que hoy se cultiva en todo el mundo y se piensa que descende de una pequeña introducción en Europa de papas *andigena*, posteriormente adaptadas a días más prolongados. Esta especie ocupa un rango eco-geográfico amplio, y es uno de los cultivos más importantes entre los que producen estolones, a partir de los cuales y bajo condiciones ambientales apropiadas generan tubérculos. Los tubérculos cumplen una función doble, como órganos de almacenamiento (constituyen una importante fuente de almidón, proteínas, antioxidantes y vitaminas en la dieta) y como un sistema de propagación vegetativa. Un tubérculo de tamaño mediano provee la mitad de los requerimientos diarios de vitamina C. Debido a sus propiedades nutricionales y a la facilidad de propagación, la papa es el tercer cultivo más importante en el mundo luego del arroz y el trigo en términos de consumo humano (<http://www.cipotato.org/potato>). Su importancia a nivel mundial, especialmente en países

en desarrollo, viene creciendo rápidamente en los últimos años, con una producción que alcanzó en el año 2009, 300 millones de toneladas (<http://www.fao.org>).

La papa es una planta herbácea anual. Al crecer, las hojas compuestas de la planta de la papa producen almidón, el cual se desplaza hacia la parte final de los tallos subterráneos o estolones. Estos tallos sufren a consecuencia un engrosamiento y así se producen los tubérculos cerca de la superficie del suelo. El número de tubérculos que llegan a madurar depende de la disponibilidad de humedad y nutrientes del suelo. Los mismos pueden tener formas y tamaños distintos, y por lo general pesan hasta 300 gramos. Al terminar el período de crecimiento, las hojas y tallos de la planta se marchitan y los tubérculos se desprenden de los estolones. A partir de este momento, los tubérculos funcionan como depósito de nutrientes que permite a la planta subsistir en el frío y posteriormente reverdecer y reproducirse. Cada tubérculo tiene de 2 hasta 10 brotes laterales (los "ojos"), distribuidos en espiral en toda la superficie, desde los cuales brotan las nuevas plantas, cuando las condiciones vuelven a ser favorables.

La papa se cultiva en más de 100 países, en clima templado, subtropical y tropical. Es esencialmente un "cultivo de clima templado", para cuya producción la temperatura representa el límite principal: las temperaturas inferiores a 10°C y superiores a 30°C inhiben el desarrollo del tubérculo, mientras que la mejor producción ocurre donde la temperatura diaria se mantiene en promedio de 18°C a 20° C. La papa es una planta que tiene una gran capacidad de adaptación y se da bien sin que el suelo ni las condiciones de cultivo sean ideales. Sin embargo, también es susceptible a una serie de plagas y enfermedades. Con buenas prácticas agrícolas, una hectárea de papas en las regiones templadas del norte de Europa y de América del Norte, puede producir más de 40 toneladas

de tubérculos frescos a cuatro meses de la siembra. Sin embargo, casi en todos los países desarrollados la producción promedio es mucho más baja, desde escasas 5 hasta 25 toneladas, debido a la falta de semillas de buena calidad y de cultivares mejorados, a un uso inferior de fertilizantes e irrigación, y a problemas de plagas y enfermedades. Una vez cosechada, la papa se destina a diversos fines siendo el consumo fresco menos del 50% de la producción mundial. Con el resto se obtienen alimentos e ingredientes alimentarios industriales y tubérculos semilla para la siguiente cosecha (<http://www.potato2008.org>).

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo General

El objetivo general del presente proyecto es avanzar en el conocimiento de la familia de genes Snakin/GASA en *Solanum tuberosum* y particularmente, profundizar el estudio funcional del gen *SNI*.

### 1.2.2 Objetivos particulares

I- Estudiar la función *in vivo* del gen *SNI* mediante la caracterización de líneas transgénicas de papa que sobreexpresan o silencian del mismo.

1-Evaluar el número de copias y niveles de expresión de *SNI* en las líneas transgénicas.

2-Analizar fenotípicamente las líneas transgénicas de *SNI*.

3-Identificar vías metabólicas y procesos fisiológicos afectados en las líneas transgénicas.

3.1-Analizar los perfiles metabólicos y composición de la pared celular de las líneas transgénicas de *SNI*.

3.2-Estudiar la participación de *SNI* en la homeostasis redox y en el balance hormonal.

3.3-Analizar perfiles transcripcionales en las líneas transgénicas de *SNI*.

II- Identificar nuevos genes Snakin/GASA en *Solanum tuberosum*.

## 1.3 Hipótesis

Nos planteamos como hipótesis de trabajo que el gen *SNI* presenta un rol dual en defensa y desarrollo. Como se dijo anteriormente el rol de defensa previamente asignado no es incompatible con la posibilidad de que *SNI* esté involucrado también en otros procesos y funciones biológicas como se ha descrito para homólogos de este gen en otras especies. Éstos han sido implicados en la regulación de la elongación celular, división celular, estimulación o inhibición de la elongación del tallo y la corola. Además, las características observadas en las líneas transgénicas de papa capaces de silenciar el gen endógeno *SNI* y la expresión temporal y espacial observada en las líneas de papa que portan el promotor de *SNI* sugieren que este péptido podría tener más de una función.

Asimismo, acorde a lo observado para otras especies (*Arabidopsis*, maíz, arroz), nos planteamos que podrían existir más miembros Snakin/GASA en papa que los aislados hasta el momento y que era posible su identificación disponiendo de la secuenciación completa del genoma de esta especie.

## 1.4 Estructura de la Tesis

Esta Tesis está organizada en 4 capítulos, el primero de ellos corresponde a una introducción general acerca de los antecedentes sobre el gen *SNI* y la familia Snakin/GASA a la cual pertenece así como también una breve descripción de *Solanum tuberosum*, la especie en estudio en este trabajo. En este contexto, nos planteamos dos grandes objetivos desarrollados en los capítulos 2 y 3. El capítulo 2 corresponde al estudio de la función *in vivo* del gen *SNI* mediante la caracterización de líneas transgénicas de papa que sobreexpresan o silencian del mismo mientras que el capítulo 3 describe la identificación de nuevos genes Snakin/GASA en *Solanum tuberosum*. Finalmente en el capítulo 4 se exponen conclusiones generales obtenidas a partir de este trabajo.

## Capítulo 2: Estudio de la función *in vivo* del gen *Snakin-1*

## 2.1 Introducción

El desarrollo de la planta es el resultado de la expansión ordenada de células que proliferan en los meristemas. La formación de un órgano puede entenderse como la consecuencia de la multiplicación celular mediante la división de las células y su expansión subsecuente; por lo tanto, la morfología final de una planta se logra mediante la regulación fina de ambos procesos (Meyerowitz 1997). El crecimiento de las plantas puede ser influenciado significativamente por señales ambientales, es decir que, la altura, el tamaño y la forma pueden ser modificados dependiendo de las condiciones en las que crezcan. Asimismo, existe información genética que controla el tamaño intrínseco de los órganos de la planta durante el desarrollo (Mizukami y Fischer 2000). En este sentido, el rol del ciclo celular en el crecimiento y desarrollo de las plantas ha sido objeto de considerable debate dado que existen evidencias que demuestran que el arresto de la división produce resultados variables. En algunos casos la disminución en el número celular tiene poco efecto en el tamaño y la forma final debido a que es compensado por un aumento en el tamaño celular (Busov y col. 2008). Sin embargo, también se ha demostrado en *Arabidopsis* que la inhibición de la proliferación celular en las hojas resulta en un menor número de células, y que a pesar de una compensación parcial mediante un incremento del tamaño, las líneas transgénicas muestran alteraciones del crecimiento y forma de los órganos sugiriendo la participación del proceso de división celular en la morfogénesis (Wang y col. 2000, Mizukami y Fischer 2000, De Veylder y col. 2001, Verkest y col. 2005). La determinación de la morfología y el tamaño celular durante el desarrollo de la planta también están condicionados por la compleja estructura de la pared celular. Ésta otorga resistencia

mecánica, a la vez que le da plasticidad, regulando la forma y el volumen de las células vegetales, de modo que define su morfología, estructura y función a lo largo de su desarrollo. Constituye una estructura dinámica que regula las respuestas de la planta a distintos estreses y estímulos externos incluyendo la interacción con patógenos (Humphrey y col. 2007); asimismo, lleva información del medio ambiente hacia el citoplasma de la célula a través de distintas vías de transducción de señales (Hématy y col. 2009). La pared celular está formada por microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz de polisacáridos que pueden dividirse en dos clases: hemicelulosas y pectinas (Cosgrove 2005), así como también proteínas. Las hemicelulosas son polisacáridos ramificados que contienen esqueletos de azúcares neutros mientras que las pectinas se definen por la presencia de ácidos urónicos como principales componentes (Somerville y col. 2004). Si bien se conoce muy poco acerca de la biosíntesis de los polisacáridos de la pared celular, se sabe que muchos de los azúcares necesarios para la formación de la pared también son intermediarios de otras vías biosintéticas esenciales, como la del ácido ascórbico (Gilbert y col. 2009, Di Matteo y col. 2010).

### 2.1.2 Ácido ascórbico

La vitamina C o ácido ascórbico es una pequeña molécula antioxidante que cumple funciones metabólicas esenciales en la vida de las plantas: contribuye a la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (EROs) generadas durante la fotosíntesis y en situaciones de estrés, actúa como cofactor de varias enzimas (involucradas en la síntesis de hidroxiprolina, etileno, GA, antocianinas y otros metabolitos secundarios) y está involucrado en la regulación de la elongación celular y la progresión a través del ciclo celular (Smirnoff y Wheeler 2000). El ácido ascórbico es ubicuo en los organismos eucariotas pero es

particularmente abundante en plantas donde es claramente esencial en la regulación del crecimiento y desarrollo (Foyer y Noctor 2009). Los mutantes de *Arabidopsis* con niveles parcialmente reducidos de ascorbato exhiben retrasos en la floración y disminución en el crecimiento mientras que la depleción total de esta molécula resulta en plantas no viables (Barth y col. 2006, Olmos y col. 2006, Kotchoni y col. 2009). La letalidad de suprimir la síntesis de ascorbato se debe a sus múltiples funciones en el crecimiento y desarrollo de la planta así como también en el metabolismo y defensa (Smirnoff y col. 2001). En este sentido, se ha demostrado que el ácido ascórbico modula la defensa e interacciona extensivamente con el metabolismo de las hormonas y su señalización para controlar el desarrollo de la planta (Pastori y col. 2003).

En cuanto a los factores que controlan la acumulación del ácido ascórbico, se sabe que la capacidad de reciclar ascorbato reducido a partir de sus formas oxidadas es tan vital para mantener elevados sus niveles como la capacidad de sintetizarlo (Chen y col. 2003). Con respecto a su síntesis existen varios caminos alternativos identificados en plantas. La primera vía descrita (vía de Smirnoff-Wheeler) involucra la generación de ácido ascórbico a partir de L-galactosa (Wheeler y col. 1998). La L-galactono-1,4-lactona constituye el precursor inmediato del ácido ascórbico la cual es oxidada a ascorbato por la enzima L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GalLDH) localizada en el lado externo de la membrana interna de la mitocondria. Si bien los pasos iniciales de la vía ocurren en el citosol, la oxidación de la L-galactono-1,4-lactona vía el citocromo c en la mitocondria sugiere la integración de la biosíntesis del ácido ascórbico con el metabolismo energético y el estado redox de la célula. En frutilla, se ha descrito además una vía que se inicia a partir de D-galacturonato generado a partir de la ruptura de pectinas en el fruto en la etapa de

maduración (Agius y col. 2003). Posteriormente, el ácido D-galacturónico es reducido a ácido L-galactónico que luego es convertido espontáneamente a L-galactono-1,4 lactona. Como ocurre en la vía Smirnoff-Wheeler, la enzima GalLDH convierte L-galactono-1,4 lactona a ácido ascórbico. Si bien la síntesis de ácido ascórbico a través de ácido D-galacturónico representa sólo una pequeña fracción del ascorbato total, se ha sugerido que esta vía podría ser un mecanismo de recuperación de carbono en ciertos órganos luego de la ruptura de la pared celular, como ocurre durante la maduración del fruto. El ácido D-galacturónico se libera a partir de la hidrólisis de homogalacturonanos y ramnogalacturonanos I, que en conjunto constituyen los principales componentes de las pectinas de la pared celular (Agius y col. 2003). Finalmente, se ha propuesto una vía basada en mioinositol y la generación del ácido D-glucurónico como intermediario por acción de la enzima mioinositol oxigenasa (Lorence y col. 2004).

Para cumplir su función antioxidante, el ácido ascórbico es utilizado por la enzima ascorbato peroxidasa (APX) para convertir  $H_2O_2$  a agua. La oxidación del ascorbato, como consecuencia de la acumulación de EROs, resulta en la generación del radical monodehidroascorbato (MDHA), el cual puede ser reducido nuevamente a ascorbato por la enzima monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) o bien dismutar no enzimáticamente para formar ácido ascórbico y el dehidroascorbato (DHA). Si el DHA no es reciclado rápidamente a ácido ascórbico; sufre hidrólisis irreversible a ácido 2,3 diketo-L-gulónico lo cual representa una pérdida del *pool* de ácido ascórbico total (Valpuesta y Botella 2004). El DHA es reducido a ácido ascórbico por la enzima dehidroascorbato reductasa (DHAR) que usa glutatión como reductor. La reducción por parte de la DHAR permite a la planta reciclar DHA y por lo tanto, recapturar ascorbato antes de que sea perdido. Dado que el

ácido ascórbico constituye el mayor antioxidante en plantas, la enzima DHAR es de fundamental importancia y contribuye a la regulación del estado redox en la planta. Por lo tanto, la capacidad de reciclar eficientemente DHA a ascorbato puede ser crítica en condiciones donde el ácido ascórbico es consumido rápidamente.

### 2.1.3 Homeostasis redox y desarrollo

Las EROs se producen continuamente en diferentes compartimientos celulares como subproductos de varios procesos metabólicos. Bajo condiciones fisiológicas normales, estas moléculas son eliminadas a través de una serie de complejos mecanismos enzimáticos y no enzimáticos que constituyen la defensa antioxidante de la planta. Cuando el equilibrio entre la producción y la eliminación de EROs es perturbado por factores externos adversos, ya sean bióticos o abióticos, se produce lo que se conoce como estrés oxidativo (Apel y Hirt 2004).

Por otro lado, desde hace algunos años, se ha empezado a reconocer que las EROs tienen un papel importante en los procesos de señalización y han sido involucradas en procesos fundamentales en las plantas tales como el crecimiento, el desarrollo, la respuesta a estímulos medioambientales y la muerte celular (Mittler 2002, Apel y Hirt 2004, Foyer y Noctor 2005, Pitzschke y col. 2006, Miller y col. 2008). Las plantas responden a cambios en su ambiente mediante la modulación de los niveles de EROs y así transmitir las señales externas hacia el núcleo y transcribir genes específicos (Apel y Hirt 2004). En este sentido, la homeostasis redox de la célula es considerada como un integrador de la información del metabolismo y del medio ambiente que regula las respuestas de aclimatación y el crecimiento de la planta. Los antioxidantes como el glutatión y el ascorbato sirven no solo para limitar la vida de las EROs sino que también participan en un amplio rango de eventos

de señalización y funciones regulatorias (Foyer y Noctor 2009). Se acepta generalmente la idea de que bajas concentraciones de EROs conducen a la transducción de señales y respuestas de aclimatación mientras que niveles elevados generan daño oxidativo en los componentes celulares. La intensidad, duración y localización de las distintas señales de EROs están determinadas por el balance entre las vías de producción y de eliminación de la célula (Vranová y col. 2002). El uso de EROs como moléculas señal por las células vegetales sugiere que, durante la evolución, las plantas fueron capaces de alcanzar un alto grado de control sobre la toxicidad de las mismas (Mittler y col. 2004). Mientras que el daño oxidativo es bastante inespecífico y conduce a la acumulación de modificaciones irreparables en proteínas y ácidos nucleicos, la señalización oxidativa debe ser reversible y estar bajo estrecha regulación (Foyer y Noctor 2009). Esta modulación tan precisa de los niveles de EROs permite la existencia de umbrales donde estas moléculas pueden actuar como señal de diferentes procesos celulares, no sólo en respuestas de estrés sino que también participan en la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta (Van Breusegem y col. 2001, Van Breusegem y Dat 2006).

Bajo condiciones de estrés, una estrategia que las plantas han adoptado es disminuir la velocidad del crecimiento. La habilidad de reducir la división celular en condiciones desfavorables permitiría no solo guardar energía para propósitos de defensa, sino también limitar el riesgo de daños heredables. Si bien se conoce poco hasta el momento acerca del mecanismo de las EROs en el crecimiento y desarrollo de las plantas, se sabe por ejemplo, que la progresión del ciclo celular esta negativamente regulado por EROs (Gapper y Dolan 2006). En este contexto, es imposible hablar de EROs y señalización redox sin considerar a las hormonas, las cuales actúan en conjunto con las vías de señalización moduladas por el

balance redox para procesar, transmitir señales y producir respuestas apropiadas (Kwak y col. 2006). Así por ejemplo, se ha demostrado que una parte importante del control del crecimiento de las células de la raíz a través de la regulación de las proteínas DELLAs vía GA está determinado por la regulación de la acumulación de EROs mediante los efectos sobre la expresión de enzimas antioxidantes (Achard y col. 2008).

#### 2.1.4 Balance hormonal y desarrollo

El crecimiento y desarrollo de las plantas implica la integración de señales externas y endógenas que, en conjunto con el programa genético, determinan la forma de la planta. En este proceso son fundamentales los reguladores del crecimiento denominados hormonas vegetales; este grupo incluye auxinas, citoquinas, GA, ABA, etileno, BR y ácido jasmónico, los cuales actúan a bajas concentraciones para regular distintos aspectos del crecimiento y desarrollo (Gray 2004). Cada una de las hormonas puede regular una gran variedad de procesos celulares independientemente, pero también varias hormonas pueden participar en un mismo proceso simultáneamente, indicando que las distintas vías de señalización se cruzan y actúan en conjunto (Depuydt y Hardtke 2011). La sorprendente plasticidad del desarrollo de las plantas se basa en redes de vías de transducción de señales interconectadas que integran múltiples señales hormonales y medioambientales coordinadamente para regular actividades celulares y procesos del desarrollo comunes (Bai y col. 2012). La actividad de cada hormona está determinada por su disponibilidad, la cual a su vez está regulada a nivel de su metabolismo como de su distribución, y por la eficiencia de la percepción de la señal hormonal y su transducción. La modulación de cualquiera de estas etapas puede tener un impacto directo en las respuestas río abajo como

el control de la expresión de genes blanco o la actividad de proteínas específicas (Vanstraelen y Benkova 2012).

## 2.2 Materiales y Métodos

### 2.2.1 Material vegetal

Se utilizaron líneas transgénicas de papa (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum* cv *Kennebec*) que sobreexpresan o silencian el gen *Snakin-1* bajo el promotor constitutivo 35S generadas previamente en el laboratorio (Almasia y col. 2008). Estas plantas fueran obtenidas mediante la transformación de discos de hojas vía *Agrobacterium tumefaciens* siguiendo el protocolo descrito por Rocha-Sosa y col. (1989) y modificado por del Vas y col. (1992).

Las plantas de papa fueron mantenidas por micropropagación en medio MSS (Sales de Murashige-skoog con sacarosa) en cámaras de cría reguladas a 22° C, bajo un fotoperiodo de 16 horas luz (5000 lux)- 8 horas oscuridad.

### 2.2.2 Caracterización molecular de las plantas

#### 2.2.2.1 Extracción de ADN de hojas de papa

Se tomaron muestras de hojas, se agregaron 700 µl de buffer de extracción (Tris-HCl pH=8 50 mM, EDTA pH=8 10 mM, NaCl 100 mM, b-mercaptoetanol 10 mM, SDS 1%) y se calentaron 10 minutos a 65° C. Luego se agregaron 200 µl de Acetato de potasio 5 M y se dejaron 20 minutos en hielo. Se centrifugaron a 13000 rpm durante 20 minutos a 4° C. Se transfirieron los sobrenadantes a tubos limpios. Se precipitó el ADN con unos 600 µl de isopropanol y se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron 10-15 minutos a máxima velocidad, se descartaron los sobrenadantes y se

lavarón los precipitados con etanol 70% (400 µl), se centrifugaron 2 minutos a 10000 rpm. Se repitió el lavado. Se centrifugaron 2 minutos a 10000 rpm, se eliminaron los sobrenadantes, se secaron los precipitados a temperatura ambiente y se resuspendieron en 20-50 µl de agua destilada.

#### 2.2.2.2 PCR a tiempo final

Las reacciones de PCR a tiempo final se realizaron utilizando una mezcla que contenía: 1X buffer (*Invitrogen*); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,25 µM de cada oligonucleótido; 0,2 mM dNTPs; 0,75 U Taq Polimerasa (*Invitrogen*) en un volumen final de 25 µl. Los oligonucleótidos utilizados para evaluar la presencia del transgén fueron los siguientes: *SN1* Up: 5' TTCAGCTCGAGAAAAAATGAAGTTATTTCTATTA ACT`3; *SN1* Low: 5' AATACAGGATCCTCAAGGGCATTTAGACTTGCC`3; 35S: 5'ATCTCCACTGACGTAAGGGA`3.

#### 2.2.2.3 Southern blot

Los ADNs genómicos fueron digeridos durante 16 horas a 37°C con las enzimas indicadas en cada caso. Posteriormente se corrieron las muestras en un gel de agarosa 0,8%. Las sondas radiactivas se prepararon usando como templado productos de digestión de un plásmido que contuviese al promotor 35S y purificados en geles de agarosa mediante el kit *QIAquick Gel Extraction (Quiagen)*. Se marcaron radiactivamente con α-[<sup>32</sup>P]-dCTP haciendo uso del kit *Prime-a-Gene Labeling System (Promega)*. Para ello, 30 ng del producto purificado utilizado como sonda se desnaturalizaron por incubación a 99°C durante 2 minutos. Se adicionaron 2 µl de BSA, 5U de Klenow polimerasa I, 20 µM de dATP, dGTP y dTTP, 50 µCi (333 nM) dCTP [<sup>32</sup>P] 3000 Ci/mmol y buffer de marcado

5X, que contiene los oligonucleótidos iniciadores, de acuerdo a las instrucciones del kit. Se incubó durante 1 hora a 37°C y posteriormente se adicionaron 30 µl NaOH 0,5 M.

La transferencia e hibridación se realizaron siguiendo las técnicas ya descritas por Sambrook y col. en 1989. Se utilizaron membranas *Hybon N<sup>+</sup>* (Amersham). Para la prehibridación e hibridación se empleó la solución *ULTRA<sup>hyb</sup>* (Ambion). Se prehibridó durante 1 hora a 65°C y se hibridó durante toda la noche a la misma temperatura. Luego de descartada la sonda se realizaron dos lavados sucesivos a temperatura ambiente durante 15 minutos con SSC (2X), SDS (0,1%) y SSC (1X), SDS (0,1%). Posteriormente se repitieron los lavados pero a la temperatura de hibridación. Se realizaron exposiciones durante períodos variables y luego se obtuvieron las autorradiografías que fueron escaneadas utilizando el equipo *Typhoon 9400* (GeHealthcare).

#### 2.2.2.4 Extracción de ARN

El ARN total fue extraído a partir de 75-100 miligramos (mg) de tejido de papa procesado en nitrógeno líquido mediante el kit comercial *RNAqueous* (Ambion) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración de las muestras de ARN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm considerando que DO (260 nm) = 1 equivale a 40 µg/ml de ARN. También se determinó la pureza del ARN midiendo las absorbancias a 280 y 230 nm, que corresponden a los picos máximos de absorción de proteínas y polisacáridos y polifenoles respectivamente, y calculando las relaciones a 260/280 y a 260/230. Se consideró como buena la calidad del ARN cuando dichas relaciones estaban entre 1,8 y 2,1 y mayor a 2, respectivamente. Para estas mediciones se utilizó un espectrofotómetro *NanoDrop 1000A* (Thermo Scientific). La integridad de ARN se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% utilizando MOPs 1X como buffer de corrida y

desnaturalizando previamente las muestras agregándoles buffer de siembra en una relación 1/3 v/v (60% formamida deionizada; ME 1,2X; 8,5% formaldehído; 0,01% p/v azul de bromofenol/xilen cianol), incubándolas durante 5 minutos a 65°C y transfiriéndolas inmediatamente a hielo (Sambrook y col. 1989).

#### 2.2.2.5 Northern blot

Los ARNs se corrieron en un gel de agarosa 1,5% con MOPs 1X como buffer de corrida. A las muestras se les agregó buffer de siembra preparado con formamida deionizada (60%), formaldehído (8,5%) y azul de bromofenol (0,01%). Las sondas radiactivas se prepararon usando productos purificados de PCR. Se marcaron radiactivamente con  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP haciendo uso del kit *Prime-a-Gene Labeling System*, según las especificaciones del fabricante (*Promega*).

La transferencia e hibridación se realizaron siguiendo las técnicas ya descritas por Sambrook y col. en 1989. Se utilizaron membranas *Hybond N<sup>+</sup>* (*Amersham*). Para la prehibridación e hibridación se empleó la solución *ULTRA<sup>hyb</sup>* (*Ambion*). Se prehibridó durante 2 horas a 42°C y se hibridó durante toda la noche a la misma temperatura. Luego de descartada la sonda se realizaron dos lavados sucesivos a temperatura ambiente durante 15 minutos con SSC (2X), SDS (0,1%) y otro de 15 minutos con SSC (1X), SDS (0,1%) a 42°C. Se realizaron exposiciones durante períodos variables y luego se escanearon las imágenes mediante un *Typhoon 9400* (*GeHealthcare*).

## 2.2.3 Caracterización fenotípica de las plantas

### 2.2.3.1 Evaluación de parámetros de crecimiento y desarrollo

Diez plantas micropropagadas *in vitro* fueron trasplantadas a macetas en condiciones controladas de invernáculo (24°C a 26°C, con ciclos de 16 horas luz y 8 horas oscuridad). Las mismas fueron mantenidas aproximadamente 3 meses y en los ensayos donde se evaluó floración y tuberización este tiempo se extendió por dos meses más.

### 2.2.3.2 Ensayos de tuberización en placas

Segmentos de tallo incluyendo al menos un nudo fueron pasados a placas con MS (medio Murashige-Skoog) con 10% sacarosa. Después de una semana en día largo (16 horas luz/ 8 horas oscuridad) y 24°C se pasaron a oscuridad para inducir tuberización. Se cosecharon después de 20 días.

### 2.2.3.3 Medición de fotosíntesis, conductancia y transpiración

Las medidas de intercambio gaseoso fueron realizadas usando el sistema portátil gaseoso *Licor-6400* (Li-Cor; [www.licor.com](http://www.licor.com)) que consiste en un sistema abierto conteniendo un analizador de gases por infrarrojo (IRGA) que infiere con el diferencia entre CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O en un flujo de aire que pasa por la cámara donde está la unidad foliar que es analizada. La fotosíntesis, conductancia estomática y transpiración fueron evaluadas en hojas completamente expandidas de plantas crecidas en invernáculo (n=6) y en horas del mediodía. Se realizaron curvas de respuesta a luz utilizando los siguientes puntos: 50, 100, 300, 700, 1200, 1500 y 1700  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (PFD), 400 PPM CO<sub>2</sub> y una temperatura en la hoja de 25°C.

#### 2.2.3.4 Medición del área foliar y celular

Con el fin de determinar el área foliar se tomaron imágenes de la 5<sup>ta</sup> hoja de plantas de las líneas transgénicas y del control NT (10 réplicas) crecidas a 22°C durante 8 semanas y se cuantificó el área con el programa *Image J* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Para determinar el área celular, la 5<sup>ta</sup> hoja de 5 plantas independientes fueron clarificadas y fijadas durante toda la noche en una solución de etanol: ácido acético (1:1), lavadas en etanol y mantenidas en hidrato cloral (160 gramos hidrato cloral, 20 ml glicerol, 40 ml H<sub>2</sub>O destilada). Se tomaron imágenes de las células utilizando el programa *LAS core* (*Leica Application Suite*) del microscopio *Leica TCS-SPS* y se midió el área de aproximadamente 100 células epidérmicas utilizando el programa *ImageJ*. Los valores de área foliar y área celular promedio fueron utilizados para estimar el número de células por hoja. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis (*InfoStat*, <http://www.infostat.com.ar>).

#### 2.2.3.5 Análisis histológicos

Se realizaron cortes transversales a partir de la parte media de hojas completamente expandidas. Las muestras fueron fijadas en glutaraldehído durante toda la noche a 4°C y lavadas 2 veces en buffer fosfato de sodio (pH=7,2) a 4°C. Luego de deshidratarlas en series crecientes de etanol y xileno, las muestras fueron embebidas en parafina y se realizaron cortes con la ayuda de un micrótopo. Se montaron preparados sobre portaobjetos previamente cubiertos con poli-L-lisina y se desparafinaron con xileno durante 15 minutos. Se tomaron imágenes con un microscopio *Leica TCS-SPS* de 3 réplicas biológicas de cada línea transgénica y del control (2 experimentos independientes).

## 2.2.4 Identificación de vías metabólicas y procesos fisiológicos afectados en las líneas transgénicas

### 2.2.4.1 Análisis de perfiles metabólicos y composición de la pared celular

#### 2.2.4.1.1 Extracción, derivatización y análisis de metabolitos solubles mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas

Se utilizó el protocolo descrito por Roessner-Tunalli y col. (2000). Brevemente, se obtuvieron extractos crudos a partir de 100 mg de tejido de hojas de papa. Las muestras fueron homogeneizadas en 1400  $\mu$ l 100% metanol con 60  $\mu$ l de un estándar interno (ribitol, 0,2 mg/ml) y mantenidas durante 15 minutos a 70°C. Se mezcló el sobrenadante con 750  $\mu$ l cloroformo y 1500  $\mu$ l de agua y se centrifugó a 3600 rpm. Alícuotas del sobrenadante (150  $\mu$ l) fueron secadas con vacío durante 4 horas, resuspendidas en 40  $\mu$ l metoxiamina clorhidrato (20 mg/ml en piridina) y derivatizadas durante 2 horas a 37°C. Se agregó N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamida (70  $\mu$ l) y una mezcla de alcanos (7  $\mu$ l) y se dejó 30 minutos a 37°C. Los análisis de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (*Gas chromatography–mass spectrometry*, GC-MS) fueron realizados en un cromatógrafo gaseoso *HP 5980 (Agilent)* acoplado a un espectrómetro de masas *Pegasus II (Leco)* El análisis de los datos de los perfiles metabólicos se realizó mediante los programas *Chroma Tof (Leco)* y *Tag Finder 4.0* (Luedemann y col. 2008). Se hicieron análisis estadísticos de prueba t mediante *Microsoft Excel (Microsoft)*. Los datos presentados corresponden a la media  $\pm$  desvío estándar de 6 réplicas biológicas en cada caso. Los análisis de componentes principales (ACP) fueron realizados mediante el programa *Infostat* (<http://www.infostat.com.ar>).

#### 2.2.4.1.2 Determinación de azúcares solubles

Se homogeneizaron 10–20 mg de tejido de hoja en 250 µl de etanol 98% y se dejaron 20 minutos a 80°C. Luego de centrifugar, se agregó 150 µl de etanol 80% al precipitado, se mezcló y se incubó durante 20 minutos a 80°C. Se resuspendió el precipitado en 250 µl de etanol 50% y se dejó minutos a 80°C. Los contenidos de sacarosa, glucosa y fructosa fueron determinados espectrofotométricamente a partir del sobrenadante (Stitt y col. 1989).

#### 2.2.4.1.3 Determinación de ácido ascórbico total y ácido dehidroascórbico

La determinación de ácido ascórbico total y DHA se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (*High-performance liquid chromatography*, HPLC) con detección electroquímica amperométrica como fue descrito por Diliberto y col. (1983). Para la extracción, se homogeneizaron 100 mg de tejido fresco de hojas en 750 µl de ácido trifluoroacético 3% y se centrifugó rápidamente a máxima velocidad por 5 minutos en frío. Se pasaron 500 µl de sobrenadante por una columna *Bond Elut C18* (Agilent) (previamente equilibrada en metanol, agua y buffer fosfato 100 mM pH=7). Se descartaron los primeros 500 µl y luego se realizó una elución con 1,5 ml de buffer fosfato 100 mM pH=7 y se recuperó el eluido. Luego se mezclaron partes iguales del sobrenadante (bien agitado) con sal de  $K_2HPO_4$  100 mM (pH próximo a 8,5). La mezcla queda con pH cercano a 6. Para ácido ascórbico total se tomaron 450 µl de esta mezcla y se agregaron 15 µl de DTT 100 mM. Para ácido ascórbico reducido se tomaron 450 µl de esta mezcla y se agregaron 15 µl de agua. Luego se llevó a pH ácido agregando 110 µl de ácido trifluoroacético 3%.

Para la determinación de ácido ascórbico y DHA se inyectaron muestras en columnas C18 de sílica en fase reversa (partículas de 5 µm, 150X 4,6 mm, HL90-5s, Bio-Sil, *Bio-Rad*). La fase móvil compuesta por una solución de  $KH_2PO_4$  (100 mM) a pH 3 (con ácido

fosfórico) fue corrida isocráticamente con un flujo de 0,5 ml/minuto. El pico de ácido ascórbico se observó a los 3,5 minutos. La concentración de ácido ascórbico total (reducido más oxidado) fue determinada luego de reducir con DTT (1 mM). La cantidad de DHA se determinó como la diferencia entre las áreas de los picos de las formas reducida y no reducida.

#### 2.2.4.1.4 Análisis de la composición de la pared celular

Para los análisis de espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (*Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*, FT-IR) se tomaron muestras de hojas de plantas de 8 semanas de edad y se hicieron extracciones con metanol. Para ello, se homogeneizaron 500 mg de tejido en 1,5 ml de metanol, se centrifugó durante 10 minutos a 7000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se repitieron los lavados con metanol 3 veces y se dejó secar el precipitado durante 90 minutos en un concentrador de vacío. Se analizaron 2 o 3 réplicas biológicas y se hicieron 10 réplicas técnicas. Se obtuvieron 14 espectros mediante FT-IR para cada línea mediante un espectrómetro *Thermo Nicolet Nexus 470* (*ThermoElectric Corporation*) dentro del rango 4,000–400  $\text{cm}^{-1}$ . Para cada espectro, se obtuvieron 64 escaneos con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  para el procesamiento de la transformación de Fourier y el cálculo del espectro absorbancia se realizó usando el programa *OMNIC* (*Thermo Nicolet*). Se corrigieron y normalizaron los espectros mediante el programa *windas* (*Wiley*), y se evaluaron mediante ACP y el método de la matriz de covariancia (Kemsley, 1996). Los monosacáridos de la pared celular fueron estimados como derivados de acetato de alditol (n= 3) (Stevenson y Furneaux 1991) por cromatografía gaseosa realizada en un equipo *SP-2330* (*Bellefonte*), y los resultados fueron validados como se reportó previamente (Gibeaut y Carpita 1991). Se utilizó mioinositol (*Sigma*) como

estándar interno. El contenido de celulosa fue determinado a partir de la fracción resistente a la extracción con ácido trifluoracético 2M (n=3) (Morrison 1988) mediante el ensayo de fenol-ácido sulfúrico utilizando equivalentes de glucosa como estándares (Dubois y col. 1956). Los ácidos urónicos fueron cuantificados usando la fracción soluble de ácido trifluoracético 2M (n=5) (Filisetti-Cozzi y Carpita 1991).

#### 2.2.4.2 Estudio de la participación de *SNI* en la homeostasis redox y en el balance hormonal

##### 2.2.4.2.1 Tinciones histoquímicas para la determinación de especies reactivas de oxígeno

Los niveles de  $H_2O_2$  en hojas se detectaron mediante 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato ( $H_2DCF$ -DA) así como también utilizando diaminobencidina (DAB) (*Sigma*).

En el caso de la tinción con  $H_2DCF$ -DA, hojas completamente expandidas fueron sumergidas en 10 mM Tris-HCl (pH=7,2) con 50 mM de KCl y 50  $\mu$ M  $H_2DCF$ -DA por 10 ó 20 minutos. El exceso de colorante fue lavado con el mismo buffer y se escaneó la emisión de fluorescencia verde en un *Typhoon 9400* (*GeHealthcare*). Para el análisis cuantitativo, se incubó un disco de hoja en un *ependorf* con 500  $\mu$ l de solución de  $H_2DCF$ -DA y se midió el cambio de absorbancia a 488 nm a distintos tiempos.

Para realizar la tinción histoquímica mediante la técnica de DAB que permite detectar la acumulación de  $H_2O_2$ , se incubaron las muestras de hojas (discos foliares) recientemente colectadas en 1 mg.ml<sup>-1</sup> de DAB-HCl, pH=3,8, como fue previamente descrito por Thordal-Chriestensen (1997).

Para la tinción histoquímica con NBT (*Nitroblue Tetrazolium*), que permite detectar la acumulación de iones superóxido, las muestras de hojas (discos foliares) recientemente

colectados se sumergieron en una solución de NBT 0,1% en 50 mM de fosfato de potasio, pH=7,8, como fue previamente descrito por (Wohlgemuth y col. 2002).

Para ambas tinciones, los discos fueron sumergidos en las soluciones (en cajas de Petri) y las soluciones fueron infiltradas en los tejidos mediante pequeños pulsos de vacío de 2 minutos y posteriormente incubadas en oscuridad por 16 horas (solución DAB) o 2 horas (solución NBT). El exceso de colorante y los pigmentos foliares fueron removidos mediante sucesivos lavados con etanol (90%, v/v) caliente. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se visualiza como un precipitado marrón y los iones superóxido se detectan como un precipitado de color azul.

#### 2.2.4.2.2 Cuantificación de los niveles de la enzima Ascorbato Peroxidasa

Las muestras de hoja fueron molidas en morteros con N<sub>2</sub> y al material así obtenido le agregó buffer de extracción de proteínas (100 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 400 mM Sacarosa; 100 mM TrisHCl pH=8; 10% glicerol; 10 mM β-mercaptoetanol; 2 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo) en una proporción 200 µl por cada 100 mg de tejido. La mezcla se incubó en hielo durante 10 a 30 minutos y se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos y a 4°C. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo limpio. Se determinó la concentración total proteica de cada muestra utilizando el kit *Protein Assay (BioRad)*. Las extracciones proteicas así obtenidas se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Para el *Western blot*, los extractos proteicos (20 µg) fueron resueltos en geles *SDS-PAGE* 15%. Los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (*Amersham*) utilizando el sistema de transferencia semiseca *Fastblot (Biometra)*. Las membranas se bloquearon con caseína (leche en polvo) 0,5% TBS durante 1 hora a 37 °C. Se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente a 4°C durante toda la noche, y luego se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 0,005% de 5 minutos cada uno. Posteriormente se

incubaron con el anticuerpo secundario durante 2 horas y se hicieron tres lavados en TBS. Para el revelado se hizo una incubación de 10 minutos en buffer AP y luego de ese tiempo se la reemplazó por 10 ml de buffer AP + 33  $\mu$ l BCIP + 44  $\mu$ l NBT (*Gibco*).

#### 2.2.4.2.3 Cuantificación relativa de la expresión de genes involucrados en la síntesis y reciclaje de ácido ascórbico

El ARN fue extraído como se describió previamente (2.2.2.4). Previamente a la síntesis del ADNc, cada muestra de ARN fue tratada con ADNasa para remover en su totalidad el ADN contaminante. Para ello, se añadió 1  $\mu$ l de ADNasa (*Invitrogen*) y 1  $\mu$ l del buffer a 1,5  $\mu$ g de ARN y se llevó a un volumen de 10  $\mu$ l con H<sub>2</sub>O libre de ARNasas. Luego de una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente se agregó 1  $\mu$ l de EDTA (20 mM) y se calentó a 65°C 10 minutos.

Posteriormente, se agregó 1  $\mu$ l de una solución de hexanucleótidos de secuencia al azar (150 ng/ $\mu$ l) y 1  $\mu$ l de dNTPs (10mM), se calentó a 65°C durante 10 minutos y se incubó en hielo 5 minutos. Luego de centrifugar se agregaron 4  $\mu$ l de buffer de síntesis 10X [Tris-HCl (200 mM, pH 8,4), KCl (500 mM), MgCl<sub>2</sub> (25 mM), BSA (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)], 1  $\mu$ l de DTT (0,1 M), 1  $\mu$ l de *RNaeOUT* (*Invitrogen*) y 1  $\mu$ l de transcriptasa reversa *SuperScript III RT* (200 U/ $\mu$ l, *Invitrogen*). Luego se incubó 15 minutos a 25 °C, 50 minutos a 42°C y 15 minutos a 70°C.

Se evaluaron los niveles de expresión de los genes mediante RT-qPCR utilizando un termociclador en tiempo real *ABI PRISM 7500* (*Applied Biosystems*). Se realizaron al menos tres réplicas biológicas y dos réplicas técnicas. Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron utilizando el kit comercial *QuantiTect™ SYBR Green PCR* (*Qiagen*), siguiendo las instrucciones del fabricante (volumen final de 25  $\mu$ l). Se utilizó el siguiente programa: 10 minutos iniciales a 95 °C y 40 ciclos de dos pasos: 15 segundos a 95 °C y 1

minuto a 60 °C. Una vez terminada la amplificación se creó la curva de disociación, medida como cambios en los niveles de fluorescencia en función de la temperatura, de modo de detectar los productos no específicos.

La cuantificación relativa se determinó usando el gen del factor de elongación (*Efl $\alpha$* ) que fue reportado como gen de referencia en papa (Nicot y col. 2005). Se diseñaron oligonucleótidos específicos mediante el software *Primer3*. La lista de oligonucleótidos específica se detalla en la Tabla 2.1. Las eficiencias de los pares de oligonucleótidos y los valores de Ct (*Cycle Threshold*) se obtuvieron mediante el software *LinRegPCR* (Ramakers y col. 2003). Los análisis de expresión relativa fueron realizados mediante el software *fgStatistics* (Di Rienzo 2009) (<http://sites.google.com/site/fgStatistics/>) que utiliza el algoritmo desarrollado por Pfaffl y col. (2001).

**Tabla 2.1. Oligonucleótidos utilizados para cuantificar la expresión de genes involucrados en la síntesis y reciclaje de ácido ascórbico.**

Gen	Secuencia (5' a 3')
<i>Efl<math>\alpha</math></i> Up	ATTGGAACGGATATGCTCCA
<i>Efl<math>\alpha</math></i> Low	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA
<i>StPMI</i> Up	ATGGAGGCTGATGGTCTGTC
<i>StPMI</i> Low	ACAAGATTCCTTTGCCGAAC
<i>StGMP1</i> Up	TGAAGGAGGACAAACCACAT
<i>StGMP1</i> Low	CATCTCAGGCAAAGGAAAGC
<i>StGMP2</i> Up	ATTACCTGCTCGACCCTTG
<i>StGMP2</i> Low	CCAGGAAGGACCATAGCGTA
<i>StGME1</i> Up	CGATTGGAAGAAGAATGAGCA
<i>StGME1</i> Low	CAGCAGCGAGATTGAAGACA
<i>StGME2</i> Up	CCTCCAATCCATCACATCC
<i>StGME2</i> Low	CAACCCATCCTTCAACTTCAT
<i>StGGP1</i> Up	GATGTCAGTCTTGCAGAAAC
<i>StGGP1</i> Low	TGCAGCACCTTATCAACTCG
<i>StGGP2</i> Up	CCTCCGATCTCCTCTTCCTC
<i>StGGP2</i> Low	AACATCGGTCCTGTTCTTGG
<i>StGPP1</i> Up	TTGGAACACTACGCGGGATAAC
<i>StGPP1</i> Low	ACATGCCACCCAACAGAGAT

<i>StMDHAR1</i> Up	GAGACAAACGCCTGATTGGT
<i>StMDHAR1</i> Low	AGGGTGCCATACTTGAGCAG
<i>StMDHAR2</i> Up	CAGTGGCTGTTGGGTTTGAT
<i>StMDHAR2</i> Low	TGCCCTTTGAATAGAGTCGTG
<i>StDHAR</i> Up	CGCATGAACTGACTCGAAAC
<i>StDHAR</i> Low	TCCACAGACCAACGATGAAC
<i>StGR</i> Up	TACGGTGGATGTGGATGGTA
<i>StGR</i> Low	ATCAAGGGCAGCATCAGAAT
<i>StGalDH</i> Up	CAGCTCAGACATTGCAGCTC
<i>StGalDH</i> Low	GCGTCTTGTTCGGAGACATC
<i>StGalLDH</i> Up	TTCGGTATGCTCCGTTGC
<i>StGalLDH</i> Low	GCTTCCTCACATTGCTTCT

#### 2.2.4.2.4 Tratamiento con ácido giberélico

Para evaluar el efecto de la aplicación exógena de GA se hicieron ensayos de crecimiento *in vitro* y en invernáculo. En el primer caso, ápices provenientes de plantas de las líneas transgénicas y el control fueron micropropagados *in vitro* en medio MS suplementado con 10  $\mu$ M de GA (o sin hormona para los controles). Para el ensayo en invernáculo las plantas fueron pasadas a macetas y crecidas en bajo condiciones controladas de humedad y temperatura. Las plantas tratadas fueron rociadas cada 3 días con una solución de GA (10  $\mu$ M) y en el caso de los controles con agua, y dejadas en las mismas condiciones de luz y temperatura en que estaban creciendo.

#### 2.2.4.2.5 Cuantificación relativa de la expresión de genes relacionados al metabolismo y señalización hormonales

La extracción de ARN, síntesis de ADNc y RT-qPCR como se describió previamente (2.2.2.4 y 2.2.5.3).

**Tabla 2.2. Oligonucleótidos utilizados para cuantificar la expresión de genes relacionados al metabolismo y señalización hormonales.**

<b>Gen</b>	<b>Secuencia (5' a 3')</b>
<i>Eflα</i> Up	ATTGGAAACGGATATGCTCCA
<i>Eflα</i> Low	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA
<i>StGAI</i> Up	CCAACTGGGATTCTTCCTCA
<i>StGAI</i> Low	CTTCACAAGCCACCACGTTA
<i>StCO</i> Up	CAGGCCCTCCAATTCAGATA
<i>StCO</i> Low	TGCATAGGCTTTTCTTGAAGC
<i>StLFY</i> Up	GCGACACTATGTGCATTGCT
<i>StLFY</i> Low	AGCCACCAATGGCTTGTAAC
<i>StGA20</i> Up	AGCTTGTTGGAGAAGCGTGT
<i>StGA20</i> Low	AAAAGCGGCAAGTCAAAGAA
<i>StFT</i> Up	CCAAGCGACCCTAACTTGAG
<i>StFT</i> Low	ATGAGCAAATGGTGGTCTCTC
<i>StPRI</i> Up	TATCTTGCGGTTTACAACGA
<i>StPRI</i> Low	AGGTTCTCTCCTGCACCTGA

#### 2.2.4.2.6 Determinación de hormonas vegetales en muestras de tallos y hojas de las líneas transgénicas

Las determinaciones de hormonas fueron realizadas en el laboratorio del Dr Sergio Alemano, Departamento de Ciencias Naturales, FCEF-QyN, Universidad de Río Cuarto (Córdoba). La extracción y purificación de ácido jasmónico (JA), ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA) y ácido giberélico 1 (GA<sub>1</sub>) del tejido vegetal se realizó por el método modificado de Durgbanshi y col. (2005). Como estándares internos se adicionaron 50 ng de [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-JA, [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ABA, [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-SA y 100 ng de [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-GA<sub>1</sub>. La separación cromatografía se realizó con un HPLC Alliance 2695 (Waters, Inc., California, USA) equipado con una columna de fase reversa C18 (100 mm x 2.1 mm, 3-μm) el cual se encuentra acoplado con un espectrómetro de masa con triple cuadrupolo (Quattro Ultima pt; Micromass, Manchester, UK), realizándose la ionización por electrospray (ESI). La identificación y cuantificación se llevó a cabo por inyección de las muestras en modo MRM (Monitoreo de Reacciones Múltiples). La adquisición de datos por MRM se realizó por monitoreo de iones

parentales y sus transiciones para JA, 209 > 59 y para su estándar interno 215>59; para ABA, 263>153 y 269>159; para SA, 137>93 y 141>97 y para GA<sub>1</sub>, 347>273 y 349>275. El software utilizado fue MassLynx (TM v. 4.1, Micromass, Manchester, UK). Las determinaciones son expresadas en pmol. X gr<sup>-1</sup> de peso seco.

### 2.2.4.3 Análisis de los perfiles transcripcionales en plantas transgénicas que sobreexpresan o silencian *SNI*

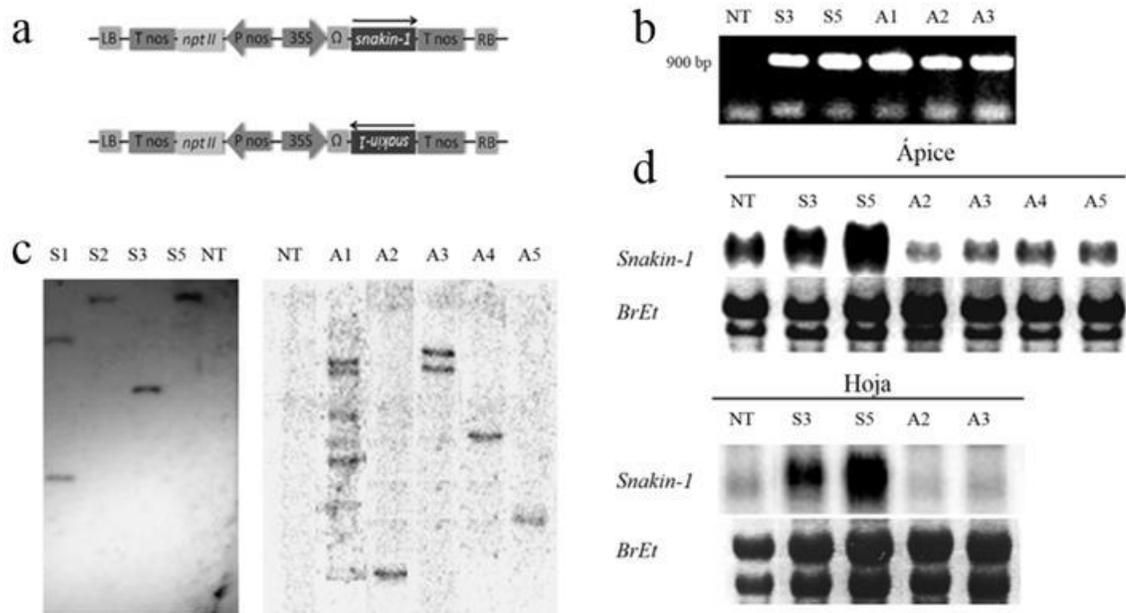
Se han crecido plantas en invernáculo de las líneas que sobreexpresan o silencian *SNI* y control NT y se tomaron muestras de ápices y hojas (5<sup>ta</sup> hoja), a partir de las cuales se realizaron las extracciones de RNA como se describió previamente (2.2.2.4). Se hicieron dos réplicas biológicas, cada una de ellas correspondientes a un pool de muestras obtenidas a partir de 3 plantas la línea sobreexpresante S3, la línea silenciada A2 y el control NT. Las muestras fueron procesadas por el servicio de secuenciación del Instituto LANGEBIO-CINVESTAV ([www.langebio.cinvestav.mx](http://www.langebio.cinvestav.mx)) utilizando la plataforma SOLID. El análisis de los datos generados de esta manera se realizó en colaboración con el Dr. Máximo Rivarola de la unidad de bioinformática del INTA. Se utilizaron los siguientes programas: *NovoAlignCS* (<http://www.novocraft.com/wiki/tiki-index.php?page=NovoalignCS>), *Cufflinks* (<http://cufflinks.cbc.umd.edu/manual.html>) y *CummeRbund* (<http://compbio.mit.edu/cummeRbund/>) (Trapnell y col. 2012). El análisis de los genes diferencialmente expresados se realizó mediante las herramientas disponibles a partir de la secuenciación del genoma de la papa (<http://www.potatogenome.net/>) así como de otras bases de datos públicas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://solgenomics.net/>) y el programa *Blast2GO* (Conesa y col. 2005) (<http://www.blast2go.de>).

Los oligonucleótidos utilizados para la cuantificación relativa por RT-qPCR del gen *StDIM/DWARF1* fueron los siguientes: *StDIM/DWARF1* Up: CGTTGTATTGGGAAGGGAAA y *StDIM/DWARF1* Low: CTTTGTGTGGCTTTGAGCAG.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Evaluación del número de copias y de los niveles de expresión de *SNI* en las líneas transgénicas

Con el objetivo de profundizar el análisis funcional del gen *SNI* se obtuvieron previamente en nuestro grupo líneas transgénicas de papa que sobreexpresan o silencian el mismo. El uso de plantas transgénicas para un determinado gen, ya sea por aumento o disminución de sus niveles de expresión, constituye una herramienta muy útil para estudiar el gen en cuestión y su participación en las funciones fisiológicas *in vivo*. En el marco de esta tesis se extendió la caracterización molecular realizada con anterioridad a las líneas que sobreexpresan *SNI* (Almasia y col. 2008) y se seleccionaron dos de ellas para estudios posteriores (S3 y S5); asimismo, se analizaron por primera vez líneas que portan este gen en antisentido (líneas antisentido, A1-A5). En primer lugar, se evaluó la presencia del transgén mediante la técnica de PCR y el número de copias que se había incorporado al genoma de la planta por *Southern blot* empleando una sonda marcada radiactivamente correspondiente al promotor 35S. Los datos obtenidos a partir de las digestiones con la enzima EcoRI indican que existen múltiples inserciones en la línea A1 (por este motivo no fue considerada en los siguientes análisis), al menos una copia del transgén en las líneas A2, A4 y A5 y al menos dos copias en la línea A3. Finalmente, se analizó el nivel de expresión de *SNI* en las líneas transgénicas mediante *Northern blot*, confirmando la sobreexpresión del mismo en las líneas S3 y S5 y la disminución en los niveles de ARNm de *SNI* en las líneas antisentido (A2-A5) con respecto al control NT (Figura 2.1).



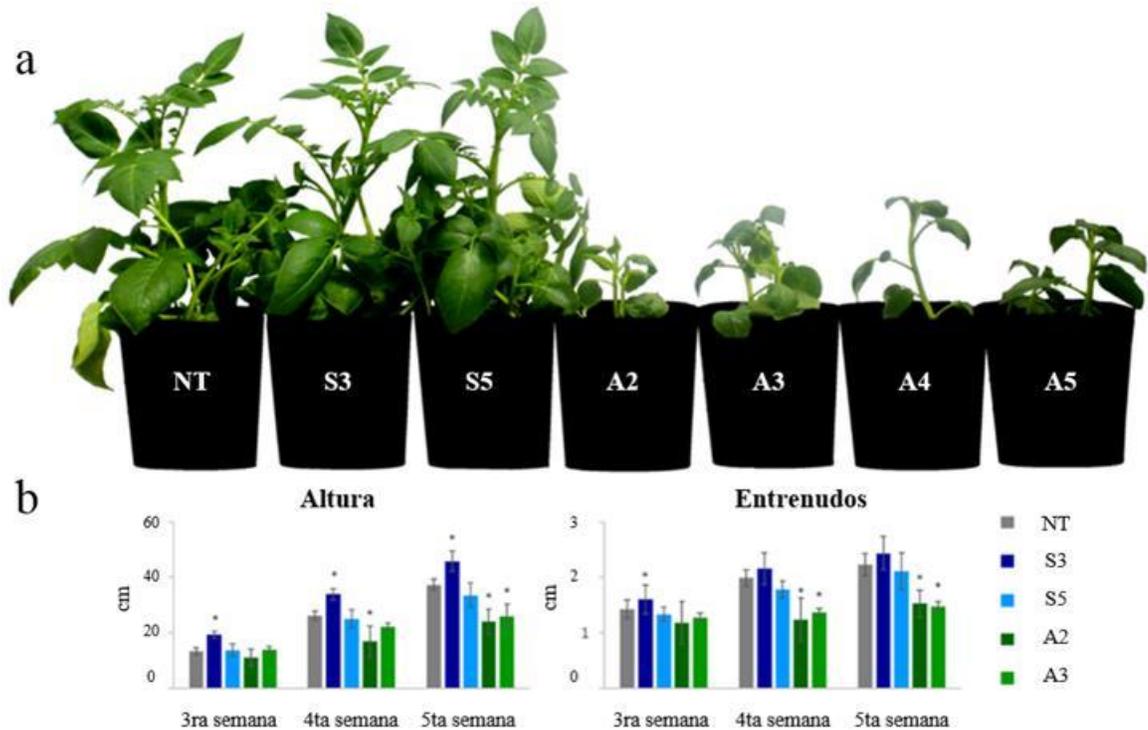
**Figura 2.1. Caracterización molecular de las líneas transgénicas.** (a) Representación esquemática de los vectores empleados en los ensayos de transformación. (b) Amplificación por PCR de un fragmento de 900 pb correspondiente a la secuencia completa de *SN1*, el *enhancer*  $\Omega$  y parte de la secuencia promotora CaMV35S en las líneas transgénicas. (c) Evaluación del número de copias del transgén mediante *Southern blot*. El ADN fue digerido previamente con la enzima EcoRI y se utilizó una sonda marcada radiactivamente correspondiente al promotor 35S. (d) Análisis de expresión del transgén por *Northern blot*. El ARN total fue extraído a partir de ápices y hojas de plantas crecidas durante 8 semanas en condiciones controladas de invernáculo. Se hibridó con una sonda correspondiente al ADNc de *SN1* y como control de siembra se muestra el ARN total teñido con bromuro de etidio (BrEt). NT: control no transgénico; S3 y S5: líneas sobreexpresantes de *SN1*; A1-A5: líneas antisentido.

### 2.3.2 Análisis fenotípico de las líneas transgénicas de *SN1*

Con el fin de caracterizar fenotípicamente las líneas transgénicas se micropropagaron 10 plantas de cada línea seleccionada (líneas sobreexpresantes S3 y S5 y líneas silenciadas A2 y A3, en los ensayos en que fue posible se incluyeron también A4 y A5) y el control NT que fueron trasplantadas a macetas y crecidas en invernáculo con condiciones controladas de humedad y temperatura. Se evaluaron caracteres de crecimiento y desarrollo como

altura, longitud de entrenudos, área foliar, tiempo de floración y rendimiento y parámetros fotosintéticos. Si bien no se observan diferencias morfológicas evidentes entre las plantas sobreexpresantes y las no transgénicas, las líneas que poseen el gen endógeno *SNI* silenciado presentan alteraciones fenotípicas notorias (Figura 2.2 a).

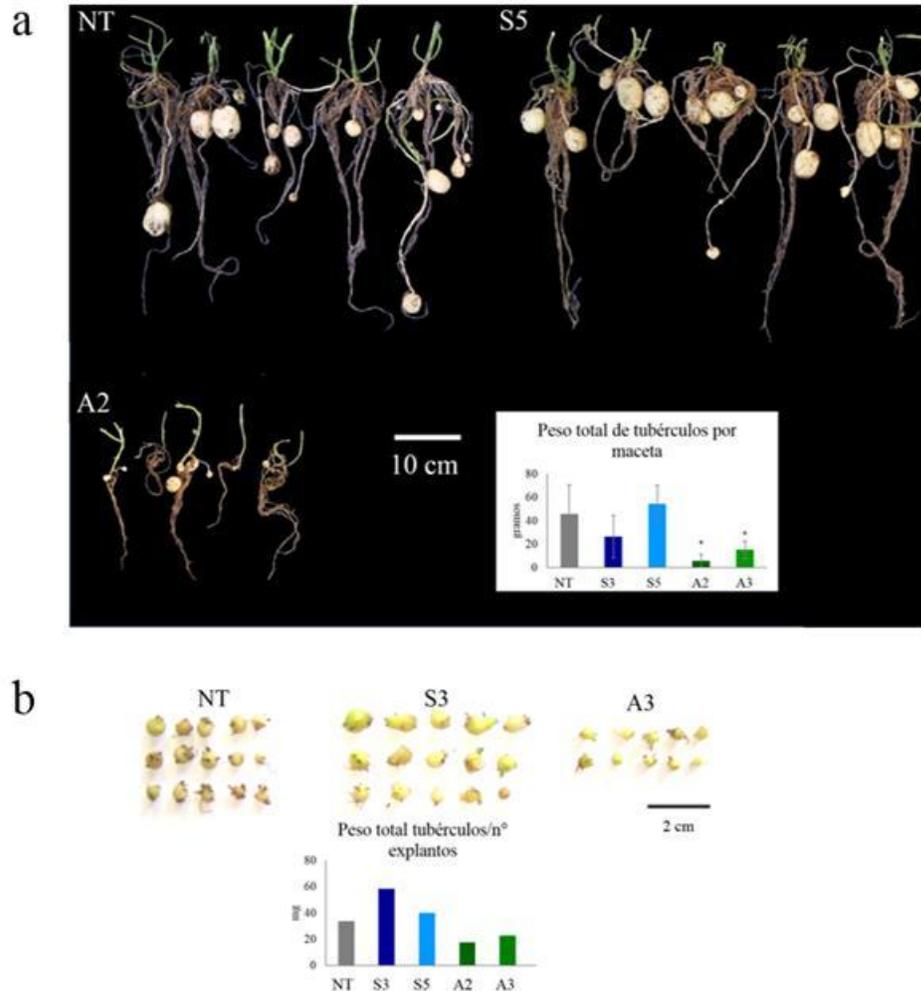
Las líneas silenciadas mostraron menor altura y reducida elongación de entrenudos a lo largo del tiempo; en el caso de las sobreexpresantes, en la línea S3 se observó una mayor altura con respecto al NT mientras que no se registraron diferencias para la S5 (Figura 2.2 b).



**Figura 2.2. Análisis fenotípico de las líneas transgénicas de *SNI*.** (a) Fenotipo de las líneas transgénicas que sobreexpresan o silencian *SNI* y del control (NT). (b) Altura y longitud de entrenudos de las líneas transgénicas y NT a lo largo del tiempo. \* indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al NT.

### 2.3.2.1 Tuberización

Con el objetivo de estimar el rendimiento de las líneas transgénicas, se analizó la producción de tubérculos en macetas y se realizaron ensayos de tuberización *in vitro*. En el primer caso, 10 plantas micropropagadas de 4 semanas de las líneas sobreexpresantes, silenciadas y el control, fueron trasplantadas a macetas individuales y crecidas en invernáculo. Luego de aproximadamente 4 meses se cosecharon los tubérculos. Para el ensayo de tuberización en placas, se partió de entrenudos de plantas crecidas *in vitro* que fueron incubados en condiciones inductoras de la tuberización. El rendimiento se estimó como el peso promedio de tubérculos por maceta y peso promedio de microtubérculos relativizado al número inicial de entrenudos, respectivamente. En ambos casos, las líneas silenciadas presentaron un rendimiento significativamente menor al NT produciendo tubérculos muy pequeños. Las líneas sobreexpresantes no mostraron diferencias significativas con respecto al NT en ninguno de los dos ensayos (Figura 2.3).

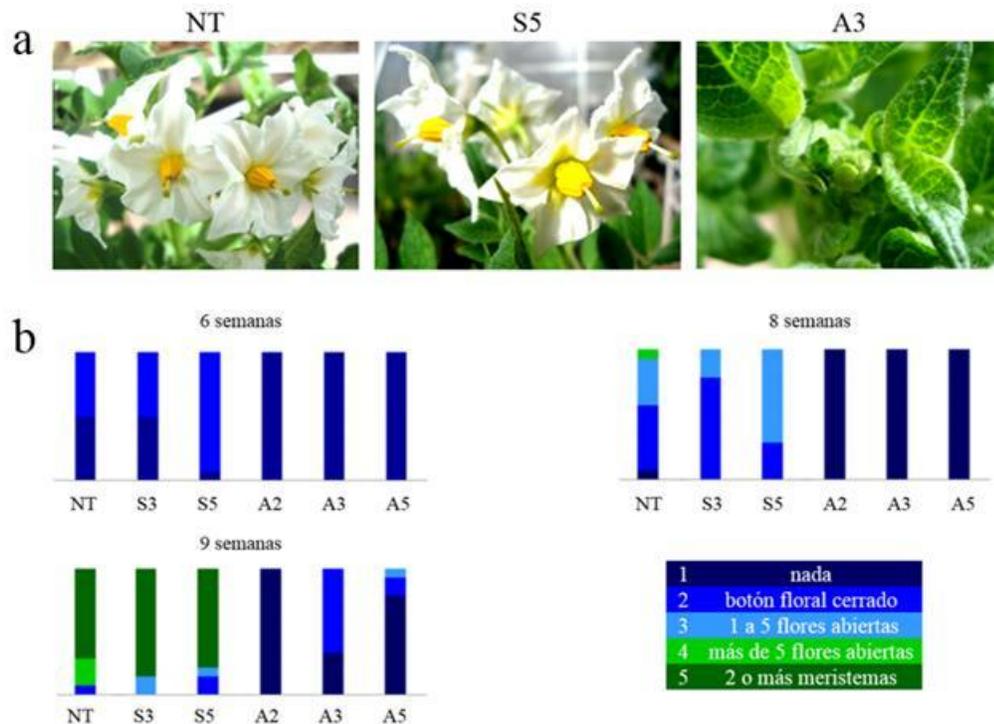


**Figura 2.3. Tuberización de las líneas que sobreexpresan o silencian *SNI*.** (a) Producción de tubérculos en macetas de plantas NT y líneas sobreexpresantes y silenciadas de *SNI*. Se grafica el peso promedio de los tubérculos correspondientes a 10 plantas de cada línea y el desvío estándar. Se realizaron 4 ensayos independientes obteniéndose resultados similares. \* indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control NT. (b) Ensayos de tuberización en placas del NT y líneas transgénicas.

### 2.3.2.2 Floración

Con respecto al proceso de floración, se observaron alteraciones en el caso de las líneas silenciadas ya que las mismas no llegan a formar botones florales o lo hacen con un retraso muy marcado (y que finalmente no progresan) en comparación a las plantas NT. Las líneas sobreexpresantes no mostraron diferencias en cuanto al tiempo de aparición de botones

florales o número de flores en relación al NT (Figura 2.4). Con el objetivo de graficar estas observaciones, decidimos establecer una escala numérica que nos permitiera agrupar a las plantas según su estado con respecto al proceso de floración, asignándole un valor de 1 a una planta sin desarrollo de botones florales y un valor de 5 a una planta donde se observaban flores de 2 o más meristemas. Teniendo en cuenta esto, registramos los datos de aparición de botones florales y desarrollo de las flores en 14 plantas crecidas en invernáculo de cada línea transgénica y el control a lo largo del tiempo, y luego graficamos el porcentaje de plantas en cada categoría. Los resultados se muestran en la Figura 2.4 b donde se puede ver que mientras que las líneas sobreexpresantes de *SNI* se comportan de manera similar al control, aquellas que lo silencian presentan claras diferencias en el tiempo de floración.

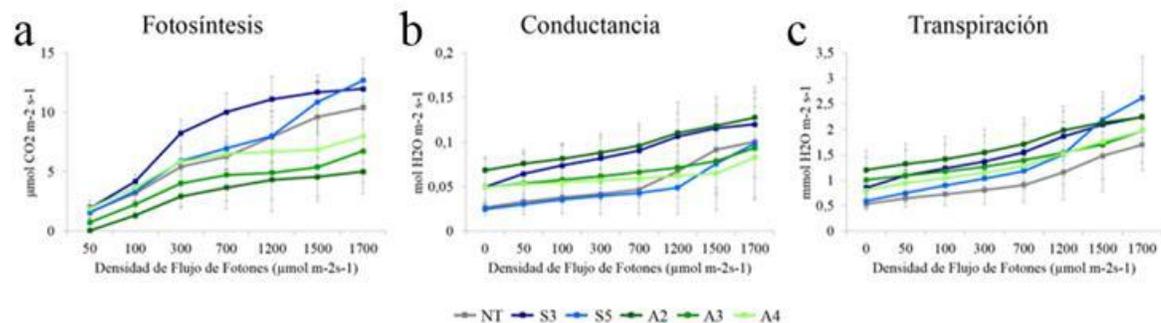


**Figura 2.4. Floración en las líneas que sobreexpresan o silencian *SNI*.** (a) Fotos representativas de la floración en las plantas NT y líneas sobreexpresantes y silenciadas de *SNI*. (b) Registro de la aparición de botones florales a lo largo del tiempo en plantas NT y líneas transgénicas. Se grafica el

porcentaje de plantas en cada categoría según su estado con respecto al proceso de floración (se evaluó la floración en 14 plantas de cada línea y se les asignó una categoría siguiendo una escala numérica como se describe en el texto). Se realizaron 2 ensayos independientes obteniéndose resultados similares.

### 2.3.2.3 Medición de fotosíntesis, conductancia y transpiración

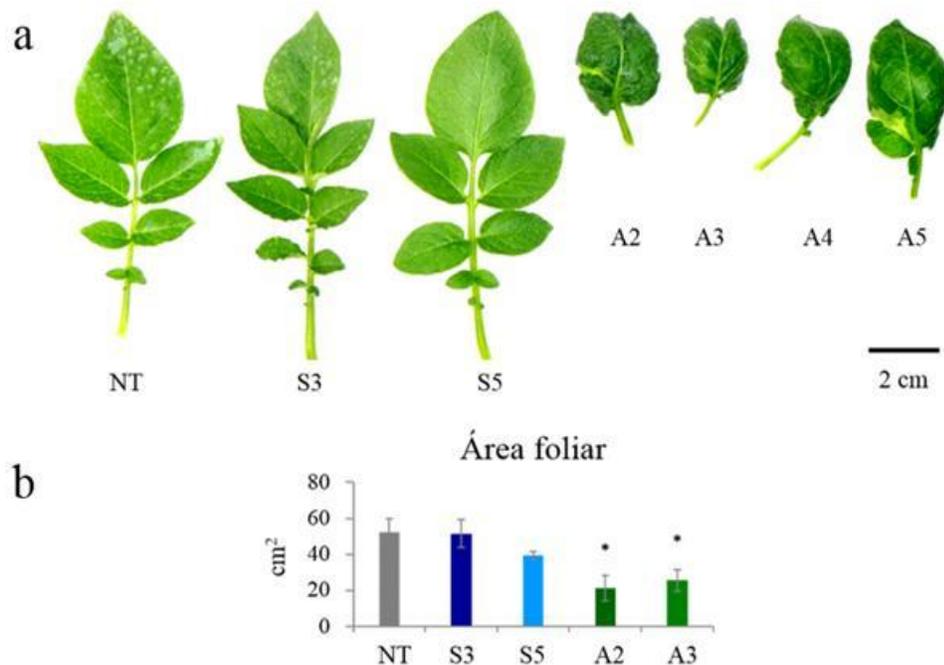
Para evaluar el posible efecto de la alteración de los niveles de *SNI* en la fisiología de la planta se realizaron mediciones de intercambio gaseoso en diferentes intensidades de luz en hojas completamente expandidas. La tasa de fotosíntesis se define como la cantidad de  $\text{CO}_2$  fijado o asimilado por fotosíntesis, menos el  $\text{CO}_2$  liberado por respiración y fotorrespiración, por unidad de tiempo y de superficie de la hoja. Por su parte la conductancia estomática es la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}$  perdida por la superficie de la hoja, por unidad de tiempo y superficie. Si bien se observó una tendencia de una mayor tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  en las líneas sobreexpresantes y menor en las silenciadas con respecto a las plantas control NT, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas. En el caso de los resultados obtenidos para la conductancia estomática y la transpiración, el patrón no fue tan claro y las diferencias observadas tampoco fueron significativas (Figura 2.5).



**Figura 2.5. Medición de parámetros fisiológicos en las líneas que sobreexpresan o silencian *SNI*.** (a) Fotosíntesis ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). (b) Conductancia estomática ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). (c) Transpiración ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Se analizaron 6 plantas de cada línea transgénica y el control NT.

### 2.3.2.4 Área foliar y celular

Continuando con la caracterización fenotípica de las líneas transgénicas nos concentramos en el fenotipo de las hojas. Las líneas sobreexpresantes (S3, S5), silenciadas (A2, A3) y el control (NT) fueron micropropagadas *in vitro*, luego pasadas a macetas y crecidas en condiciones controladas de invernáculo. Se seleccionó la 5<sup>ta</sup> hoja (contando desde el ápice hacia abajo) de plantas de 8 semanas de edad para análisis posteriores. Si bien no se observaron diferencias morfológicas evidentes entre las hojas de las líneas sobreexpresantes y de las plantas NT, las líneas silenciadas presentaron hojas de una morfología atípica (no compuestas) y de menor tamaño (Figura 2.6 a). La cuantificación del tamaño de hojas completamente expandidas, reveló una disminución estadísticamente significativa del área foliar en las líneas silenciadas con respecto al control NT (50-60% de reducción) mientras que no observamos diferencias en el caso de las líneas sobreexpresantes (Figura 2.6 b).



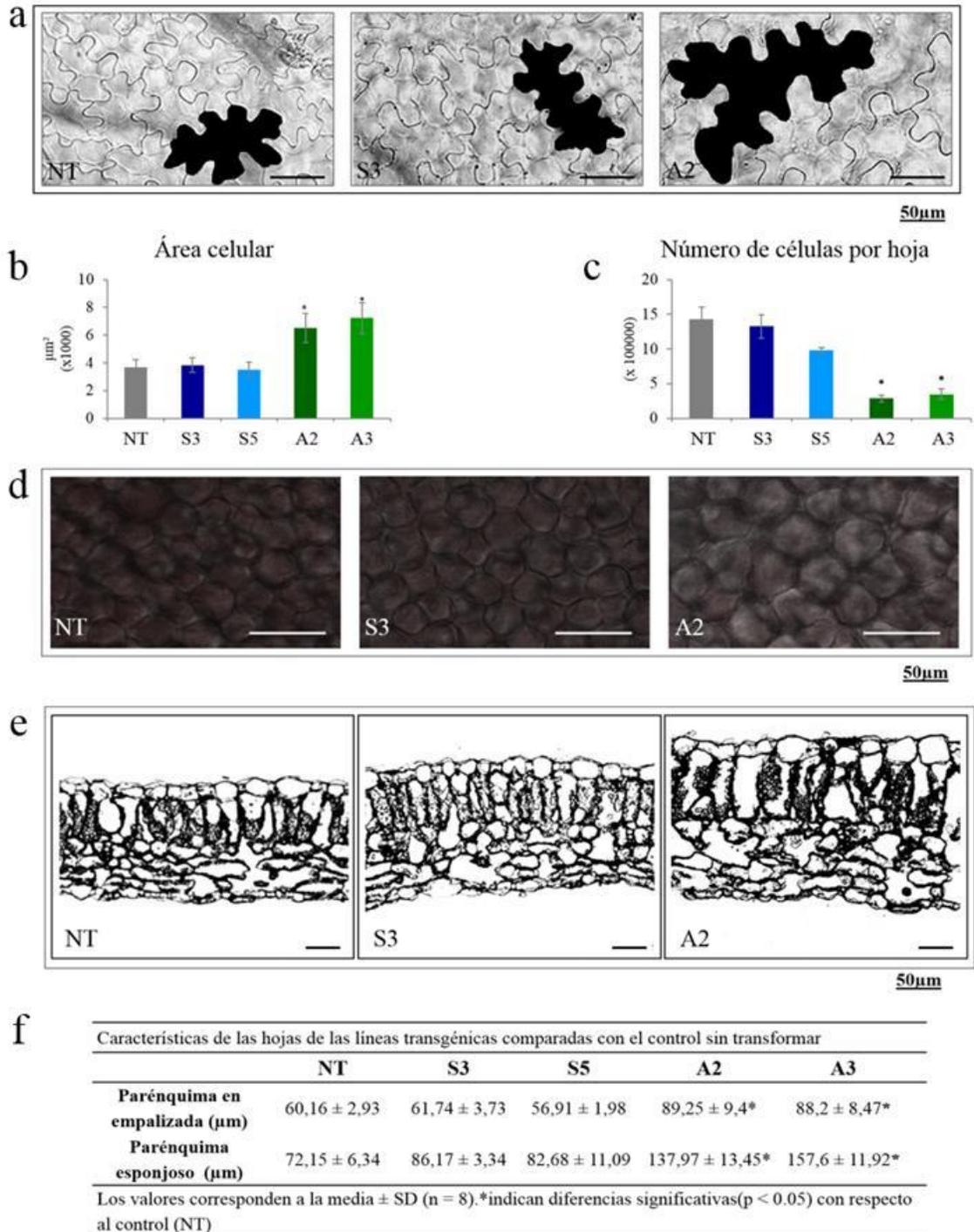
**Figura 2.6. Fenotipo de las hojas y área foliar.** (a) Fenotipo de hojas de plantas NT y de las líneas transgénicas (5ta hoja expandida de plantas de 8 semanas crecidas en invernáculo). (b) Área foliar

promedio (cm<sup>2</sup>) del NT y las líneas transgénicas (n=10). \* indican diferencias significativas (p < 0,05) con respecto al control NT.

Dado que el tamaño de la hoja está determinado por la proliferación y expansión celular, nos propusimos evaluar si la reducción observada en el área foliar de las líneas silenciadas estaba relacionada con una disminución en el tamaño celular y/o en el número de células. El análisis microscópico de la epidermis adaxial reveló un aumento en el área celular de las líneas silenciadas con respecto al NT (Figura 2.7 a). La cuantificación del área celular mostró un incremento significativo en el tamaño de las células epidérmicas de las líneas A2 y A3 (70 a 90% con respecto al NT) (Figura 2.7 b). Posteriormente, se estimó el número de células por hoja dividiendo el área foliar media por el área celular promedio. Como se muestra en la Figura 2.7 c, el número de células en la epidermis adaxial por hoja es significativamente menor en las líneas silenciadas en comparación al NT. Por su parte, la sobreexpresión de *SNI* no resultó en cambios significativos del área foliar ni del tamaño de las células epidérmicas, por lo tanto, no se encontraron diferencias en el número estimado de células por hoja con respecto al NT. Si bien el área celular fue cuantificada solamente en la epidermis adaxial, también observamos diferencias en el tamaño de las células del parénquima. De la misma forma que se vio en la epidermis, las líneas silenciadas mostraron células parenquimáticas más grandes (Figura 2.7 d).

Para investigar si los cambios en la expresión de *SNI* afecta a las hojas a nivel histológico, se analizaron cortes transversales del folíolo principal de plantas NT y de las líneas transgénicas. Se observó que la organización de los tejidos no presentaba alteraciones, sin embargo las hojas de las líneas silenciadas eran notablemente más anchas (Figura 2.7 e). La cuantificación de los tejidos mostró que el mayor grosor de las mismas era resultado de un incremento significativo en la longitud tanto del parénquima en

empalizada como del esponjoso con respecto al NT, mientras que no se observaron diferencias entre las hojas de las líneas sobreexpresantes y del control NT (Figura 2.7 f).



**Figura 2.7. Análisis del área celular.** (a) Fotos representativas de las células epidérmicas adaxiales del control NT y de las líneas transgénicas. (b) Área celular promedio (n= 100-150 células) (μm<sup>2</sup>). (c) Número estimado de células por hoja. (d) Fotos representativas de las células del parénquima

esponjoso del control NT y de las líneas transgénicas. (e) Cortes transversales de hojas de plantas NT y de líneas transgénicas. (f) Cuantificación de la longitud del parénquima en empalizada y esponjoso. \* indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al NT. Estos análisis se realizaron a partir de muestras de plantas crecidas en invernáculo en 2 ensayos independientes con resultados similares.

### 2.3.3 Identificación de vías metabólicas y procesos fisiológicos afectados en las líneas transgénicas

#### 2.3.3.1 Análisis de perfiles metabólicos y composición de la pared celular de hojas de líneas transgénicas con niveles alterados de *SNI*

##### 2.3.3.1.1 Metabolitos solubles

Se realizó un análisis de los perfiles metabólicos de las líneas transgénicas y el control NT mediante técnicas espectrofotométricas y GC-MS. A partir de hojas completamente expandidas (5<sup>ta</sup> hoja) de plantas de 8 semanas de edad crecidas en invernáculo se prepararon extractos crudos de la fracción soluble como fue descrito por Roessner y col. (2001) y Fernie y col. (2001) y en el caso de las determinaciones de sacarosa, glucosa y fructosa según Stitt y col. (1989). Estos análisis permitieron identificar 46 metabolitos incluyendo aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares y precursores de la pared celular (Tabla 2.2).

Con el fin de interpretar las diferencias metabólicas observadas en las líneas transgénicas se realizó un análisis de componentes principales (ACP). El ACP es una operación matemática que permite reducir una gran cantidad de caracteres a un número limitado de variables o componentes. Cada componente contiene información de todos los caracteres, pero en diferente proporción, y “explica” así una parte de la variabilidad total

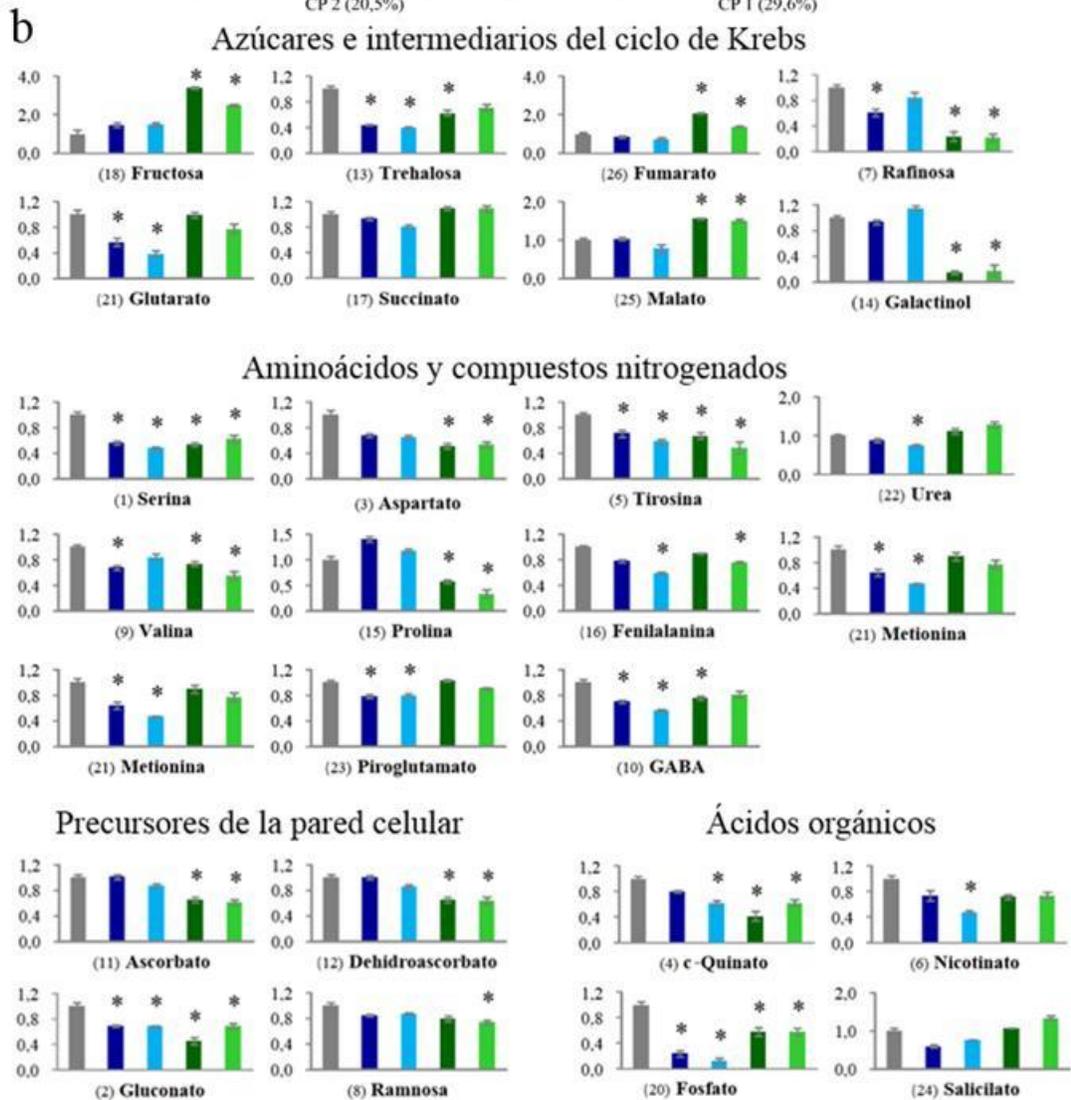
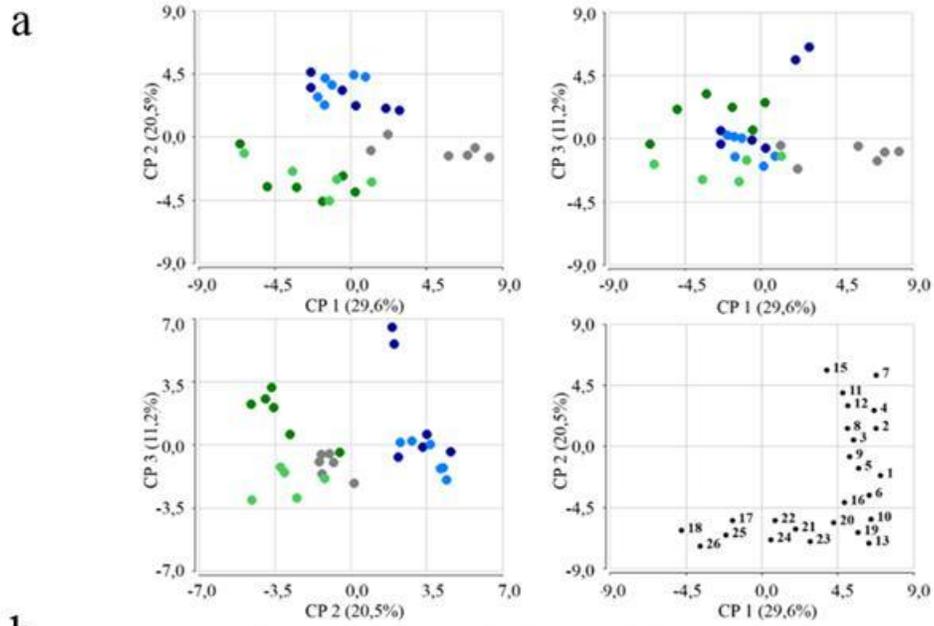
entre las muestras. En general, la mayor parte de la variabilidad está comprendida en los primeros dos o tres componentes. De este modo, y representando cada componente como un eje, las muestras pueden ser caracterizadas de acuerdo al valor que les corresponde respecto a cada uno de esos ejes. Como se muestra en la Figura 2.8 a, en un modelo que explica 61% de la varianza de los datos el primer y segundo componentes pueden discriminar las muestras de las líneas transgénicas en relación a las del control. El análisis de la contribución relativa de las variables individuales en estas dos dimensiones resultó en la identificación de 26 metabolitos con mayor efecto en la separación de los genotipos por el componente principal 1 y 2 ( $\geq 0,18$  y  $\leq -0,18$ ). Todas estas variables correspondieron a azúcares y alcoholes de azúcares (fructosa, trehalosa, rafinosa y galactinol), intermediarios del ciclo de Krebs (glutarato, malato, fumarato y succinato), aminoácidos y compuestos nitrogenados (fenilalanina, metionina, piroglutamato, ácido gamma-aminobutírico, serina, aspartato, tirosina, valina, prolina y urea), ácidos orgánicos (quinato, nicotinato, salicilato y fosfato) e interesantemente cuatro metabolitos involucrados directamente en el metabolismo de la pared celular (ramnosa, gluconato, ascorbato y dehidroascorbato) (Figura 2.8 b).

La comparación de las cantidades relativas de los compuestos solubles reveló la existencia de un gran número de diferencias en los niveles de metabolitos primarios en las líneas transgénicas en relación al control NT. Los niveles de aminoácidos fueron menores tanto en las líneas sobreexpresantes como en las silenciadas; asimismo, los intermediarios del ciclo de Krebs también resultaron alterados, siendo estos cambios más pronunciados en las líneas que silencian *SNI*. Con respecto a los azúcares y alcoholes de azúcares, la glucosa y fructosa mostraron incrementos del doble o más en las líneas silenciadas mientras

que la rafinosa, el galactinol y el precursor de la pared celular ramnosa se encontraron reducidos en estas líneas. En este sentido, las líneas A2 y A3 mostraron niveles reducidos de gluconato 1,4-lactona, precursor de biosíntesis ácido ascórbico, así como también de menores contenidos de ascorbato y DHA.

**Tabla 2.3 .Niveles de metabolitos en hojas de las líneas transgénicas de *SNI*.**

	NT	S3	S5	A2	A3
<b>Fración Soluble</b>					
<b>Azúcares</b>					
Eritrosa	1 ± 0,047	0,773 ± 0,054	0,632 ± 0,037	0,729 ± 0,051	0,525 ± 0,092
Rafinosa	1 ± 0,037	<b>0,601 ± 0,057*</b>	0,842 ± 0,077	<b>0,231 ± 0,077*</b>	<b>0,210 ± 0,063*</b>
Ramnosa	1 ± 0,033	0,842 ± 0,017	0,868 ± 0,021	0,790 ± 0,039	<b>0,730 ± 0,038</b>
Trehalosa	1 ± 0,048	<b>0,433 ± 0,010*</b>	<b>0,398 ± 0,008*</b>	<b>0,624 ± 0,039</b>	0,709 ± 0,044
Glucosa	1 ± 0,160	1,369 ± 0,159	1,578 ± 0,061	<b>2,931 ± 0,055</b>	<b>2,573 ± 0,063</b>
Fructosa	1 ± 0,193	1,465 ± 0,116	1,486 ± 0,090	<b>3,375 ± 0,043</b>	<b>2,492 ± 0,050</b>
Sacarosa	1 ± 0,032	1,257 ± 0,059	1,230 ± 0,025	1,659 ± 0,010	1,627 ± 0,024
<b>Alcoholes de azúcares</b>					
Galactinol	1 ± 0,019	0,928 ± 0,035	1,138 ± 0,046	<b>0,135 ± 0,029*</b>	<b>0,171 ± 0,091*</b>
Glicerol	1 ± 0,035	<b>0,691 ± 0,030</b>	0,837 ± 0,026	<b>0,715 ± 0,031</b>	0,892 ± 0,072
Mioinositol	1 ± 0,029	0,823 ± 0,029	<b>0,780 ± 0,020</b>	0,862 ± 0,019	1,009 ± 0,032
<b>Aminoácidos</b>					
Alanina	1 ± 0,060	0,697 ± 0,038	0,865 ± 0,035	<b>0,592 ± 0,056</b>	0,726 ± 0,066
Aspartato	1 ± 0,059	0,675 ± 0,031	0,643 ± 0,032	<b>0,501 ± 0,037</b>	<b>0,525 ± 0,042</b>
GABA	1 ± 0,035	<b>0,693 ± 0,026</b>	<b>0,557 ± 0,011*</b>	<b>0,752 ± 0,027</b>	0,806 ± 0,051
Glutamato	1 ± 0,051	1,360 ± 0,041	1,009 ± 0,051	0,773 ± 0,034	<b>0,513 ± 0,055</b>
Isoleucina	1 ± 0,028	<b>0,722 ± 0,034</b>	0,956 ± 0,037	0,951 ± 0,042	<b>0,672 ± 0,067</b>
Lisina	1 ± 0,027	1,743 ± 0,071	1,083 ± 0,017	0,855 ± 0,044	<b>0,707 ± 0,050</b>
Metionina	1 ± 0,048	<b>0,632 ± 0,059</b>	<b>0,460 ± 0,011*</b>	0,886 ± 0,057	0,763 ± 0,065
Fenilalanina	1 ± 0,011	0,776 ± 0,054	<b>0,588 ± 0,017*</b>	0,892 ± 0,039	<b>0,762 ± 0,049</b>
Prolina	1 ± 0,054	1,398 ± 0,059	1,167 ± 0,036	<b>0,569 ± 0,036</b>	<b>0,331 ± 0,074*</b>
Pirrolutamatato	1 ± 0,023	<b>0,777 ± 0,025</b>	<b>0,794 ± 0,020</b>	1,022 ± 0,015	0,900 ± 0,014
Serina	1 ± 0,037	<b>0,553 ± 0,031*</b>	<b>0,476 ± 0,022*</b>	<b>0,527 ± 0,034*</b>	<b>0,616 ± 0,060</b>
Treonina	1 ± 0,027	0,881 ± 0,038	0,827 ± 0,024	1,000 ± 0,025	0,844 ± 0,032
Tiramina	1 ± 0,032	<b>0,428 ± 0,077*</b>	<b>0,285 ± 0,036*</b>	<b>0,301 ± 0,046*</b>	1,371 ± 0,118
Triptófano	1 ± 0,026	<b>0,633 ± 0,086</b>	1,095 ± 0,018	<b>0,790 ± 0,034</b>	<b>0,651 ± 0,073</b>
Tirosina	1 ± 0,022	<b>0,704 ± 0,054</b>	<b>0,575 ± 0,037*</b>	<b>0,663 ± 0,051*</b>	<b>0,477 ± 0,092*</b>
Valina	1 ± 0,030	<b>0,672 ± 0,038*</b>	0,836 ± 0,051	<b>0,734 ± 0,036</b>	<b>0,547 ± 0,070*</b>
<b>Intermediarios ciclo TCA</b>					
Citrato	1 ± 0,035	0,882 ± 0,066	<b>0,673 ± 0,057</b>	<b>0,623 ± 0,067</b>	<b>0,689 ± 0,061</b>
Fumarato	1 ± 0,040	0,830 ± 0,057	0,737 ± 0,070	<b>2,054 ± 0,025*</b>	<b>1,377 ± 0,038</b>
Malato	1 ± 0,034	1,023 ± 0,044	0,770 ± 0,103	<b>1,550 ± 0,017*</b>	<b>1,492 ± 0,039</b>
Oxo-Glutarato	1 ± 0,061	<b>0,562 ± 0,059</b>	<b>0,379 ± 0,043*</b>	0,985 ± 0,046	0,767 ± 0,077
Succinato	1 ± 0,036	0,928 ± 0,023	0,801 ± 0,035	1,089 ± 0,033	1,084 ± 0,048
<b>Ácidos Orgánicos</b>					
Ascorbato	1 ± 0,039	1,006 ± 0,034	0,862 ± 0,035	<b>0,644 ± 0,047</b>	<b>0,603 ± 0,044*</b>
Benzato	1 ± 0,017	<b>0,583 ± 0,022*</b>	<b>0,688 ± 0,009*</b>	<b>0,690 ± 0,025*</b>	0,971 ± 0,058
t-Caffeato	1 ± 0,003	0,882 ± 0,029	1,025 ± 0,011	1,018 ± 0,008	1,187 ± 0,045
Dehidroascorbato	1 ± 0,034	0,997 ± 0,033	0,849 ± 0,032	<b>0,645 ± 0,046</b>	<b>0,631 ± 0,048*</b>
Galactonato	1 ± 0,019	0,885 ± 0,054	<b>0,690 ± 0,037*</b>	1,019 ± 0,026	<b>0,830 ± 0,020</b>
Gluconato 1,4-lactone	1 ± 0,046	<b>0,684 ± 0,017</b>	<b>0,676 ± 0,014</b>	<b>0,446 ± 0,054*</b>	<b>0,681 ± 0,038</b>
Glicerato	1 ± 0,033	1,478 ± 0,093	1,165 ± 0,034	<b>1,952 ± 0,039*</b>	1,035 ± 0,055
Nicotinato	1 ± 0,047	0,733 ± 0,077	<b>0,477 ± 0,024*</b>	0,717 ± 0,034	0,739 ± 0,053
Fosfato	1 ± 0,054	<b>0,234 ± 0,050*</b>	<b>0,127 ± 0,044*</b>	<b>0,580 ± 0,066</b>	<b>0,579 ± 0,059</b>
c-Quinato	1 ± 0,037	0,799 ± 0,015	<b>0,620 ± 0,040*</b>	<b>0,414 ± 0,071*</b>	<b>0,622 ± 0,053</b>
t-Quinato	1 ± 0,026	0,852 ± 0,016	0,880 ± 0,016	<b>0,577 ± 0,050*</b>	0,872 ± 0,069
Salicilato	1 ± 0,072	0,594 ± 0,031	0,761 ± 0,009	1,059 ± 0,011	1,329 ± 0,046
<b>Ácidos Grasos</b>					
Estearato	1 ± 0,029	1,030 ± 0,017	0,866 ± 0,033	0,927 ± 0,041	0,834 ± 0,039
<b>Otros</b>					
Dopamina	1 ± 0,030	<b>3,381 ± 0,091</b>	<b>2,244 ± 0,026*</b>	1,688 ± 0,078	2,051 ± 0,087
Urea	1 ± 0,022	0,880 ± 0,046	<b>0,733 ± 0,043</b>	1,114 ± 0,065	1,280 ± 0,070
<b>Fración Insoluble</b>					
Galactosa	1 ± 0,015	0,996 ± 0,006	0,955 ± 0,023	<b>0,851 ± 0,043*</b>	<b>0,892 ± 0,062*</b>
Manosa	1 ± 0,007	1,125 ± 0,037	1,014 ± 0,013	<b>0,436 ± 0,016*</b>	<b>0,377 ± 0,313*</b>
Xilosa	1 ± 0,140	0,904 ± 0,017	0,928 ± 0,003	0,980 ± 0,015	0,935 ± 0,164
Arabinosa	1 ± 0,005	1,017 ± 0,005	1,002 ± 0,007	0,977 ± 0,020	0,980 ± 0,048
Ramnosa	1 ± 0,028	1,101 ± 0,027	1,049 ± 0,037	<b>0,808 ± 0,012</b>	<b>0,665 ± 0,049</b>
Celulosa	1 ± 0,006	<b>0,577 ± 0,023*</b>	<b>0,638 ± 0,013*</b>	<b>0,923 ± 0,015</b>	<b>0,868 ± 0,027</b>
Ácidos Urónicos	1 ± 0,015	0,971 ± 0,010	0,960 ± 0,007	<b>0,849 ± 0,013</b>	<b>0,850 ± 0,001</b>

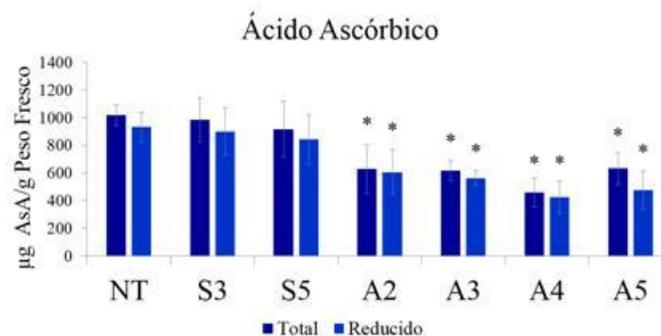


**Figura 2.8. Análisis de los perfiles metabólicos de hojas de líneas transgénicas con niveles alterados de *SNI*.** (a) Análisis de componentes principales de los perfiles metabólicos de las líneas transgénicas y del control NT. El porcentaje de varianza explicado por cada componente se muestra entre paréntesis. Cada punto representa una réplica biológica independiente. En el panel inferior a la derecha se muestran los 26 metabolitos específicos que tienen mayor impacto en la separación de los genotipos por el componente principal 1 y 2 (b) Contenidos relativos de los metabolitos más relevantes en el agrupamiento observado en el panel (a). Los \* indican diferencias significativas con respecto al control de acuerdo a la prueba t ( $p \leq 0,05$ ). Las muestras corresponden a hojas del control NT (gris), líneas sobreexpresantes S3 (azul) y S5 (celeste) y líneas silenciadas A2 (verde oscuro) y A3 (verde claro).

### 2.3.3.1.2 Medición de los niveles de ácido ascórbico mediante HPLC

El ácido ascórbico constituye un metabolito esencial, participa tanto en el crecimiento como en el desarrollo de las plantas, siendo una de sus características principales su función antioxidante. Para confirmar lo observado mediante los análisis de perfiles metabólicos por GC-MS, los niveles de ácido ascórbico total y reducido fueron medidos mediante HPLC en muestras de hojas de las líneas transgénicas y el control NT.

Las líneas silenciadas mostraron una reducción significativa en el contenido de ácido ascórbico total y reducido, mientras que no se encontraron diferencias en las líneas sobreexpresantes con respecto al control, validándose así los resultados obtenidos previamente (Figura 2.9).



**Figura 2.9. Análisis de los niveles de ácido ascórbico total y reducido.** Estudio realizado mediante HPLC en las líneas transgénicas y en el control NT. Los \* muestran las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control NT ( $p < 0,05$ ).

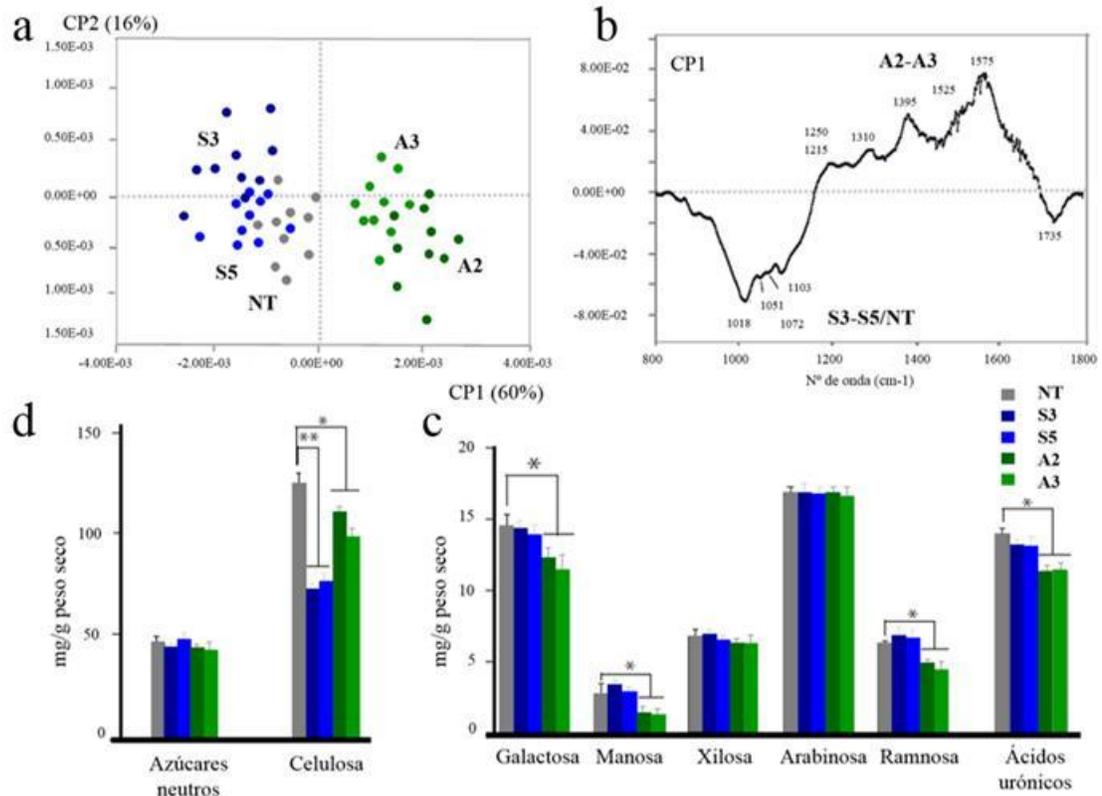
### 2.3.3.1.3 Análisis de la pared celular mediante FT-IR

Dado el fenotipo observado en las líneas que silencian *SNI* y para investigar si la función de este gen podría estar mediada por cambios en la composición/estructura de la pared celular, muestras de hojas maduras provenientes de las líneas transgénicas y de plantas control NT fueron analizadas mediante espectroscopia infrarroja transformada de Fourier.

Los espectros IR de estructuras de gran complejidad como las paredes celulares son extremadamente complejos y para su estudio se requieren herramientas estadísticas como el ACP. En el caso de FT-IR acoplada a ACP, los caracteres son las absorbancias a distintas longitudes de onda, siendo expresada la contribución de éstas a cada componente en los gráficos llamados *loadings* (Kemsley 1988, Chen y col. 1998). En este sentido, el análisis de componentes principales mostró que el mayor porcentaje de variabilidad se explica a partir del CP1 (66%), donde las líneas S3 y S5 se agrupan cercanas al NT y en conjunto se separan claramente de A2 y A3 (Figura 2.10 a). El *loading* correspondiente a CP1 muestra cuáles son las longitudes de onda que más aportan a la separación de ambos grupos. Las mayores intensidades, de signo negativo o positivo (el signo es indistinto), se corresponden con los valores negativos o positivos del eje de CP1. Es decir, las muestras que presentan mayor intensidad de absorción en las longitudes de onda en las que se observan picos negativos en el gráfico del *loading*, se ubican hacia la parte negativa del eje CP1 y están enriquecidas en esas bandas de absorbancia. Las absorbancias en el CP1 a  $1018\text{ cm}^{-1}$ ,  $1051\text{ cm}^{-1}$ ,  $1072\text{ cm}^{-1}$ ,  $1103\text{ cm}^{-1}$ , comunes a varios polisacáridos de pared celular son más

abundantes en las muestras correspondientes al control y las líneas sobreexpresantes, mientras que las bandas a  $1215\text{ cm}^{-1}$ ,  $1250\text{ cm}^{-1}$ ,  $1310\text{ cm}^{-1}$ ,  $1395\text{ cm}^{-1}$ ,  $1525\text{ cm}^{-1}$ , y  $1575\text{ cm}^{-1}$  estarían incrementadas en las líneas silenciadas (Figura 2.10 b).

Con el fin de obtener un análisis cuantitativo de los cambios en la pared celular de las líneas transgénicas, se hizo una comparación de la composición de monosacáridos neutros no celulósicos así como también de los contenidos de celulosa y ácidos urónicos en hojas (Reiter y col. 1993). La espectroscopia FT-IR es una técnica muy sensible que permite la caracterización de macromoléculas en base a la absorción de luz asociada a la vibración de enlaces químicos presentes en sus componentes monoméricos. Es posible detectar pequeñas diferencias en la composición de dos muestras, aunque no siempre esas diferencias pueden asignarse claramente a una determinada estructura o grupo funcional. Las determinaciones químicas y la espectroscopia FT-IR, por lo tanto, proveen distinto tipo de información acerca de los componentes de la pared, por lo que pueden considerarse enfoques complementarios a la hora de lograr una caracterización integral de estructuras tan complejas. Las cantidades de celulosa fueron significativamente menores en las líneas sobreexpresantes ( $p \leq 0,001$ ) y silenciadas ( $p \leq 0,05$ ) en relación al NT (Figura 2.10 c). En las líneas silenciadas el contenido de galactosa, ramnosa, manosa y ácidos urónicos fue significativamente menor mientras que no se observaron cambios en los niveles de xilosa o arabinosa respecto al NT. Por otro lado, no se observaron cambios significativos en las líneas sobreexpresantes en los niveles de ácidos urónicos o en los contenidos de monosacáridos neutros analizados con respecto al control NT (Figura 2.10 d).



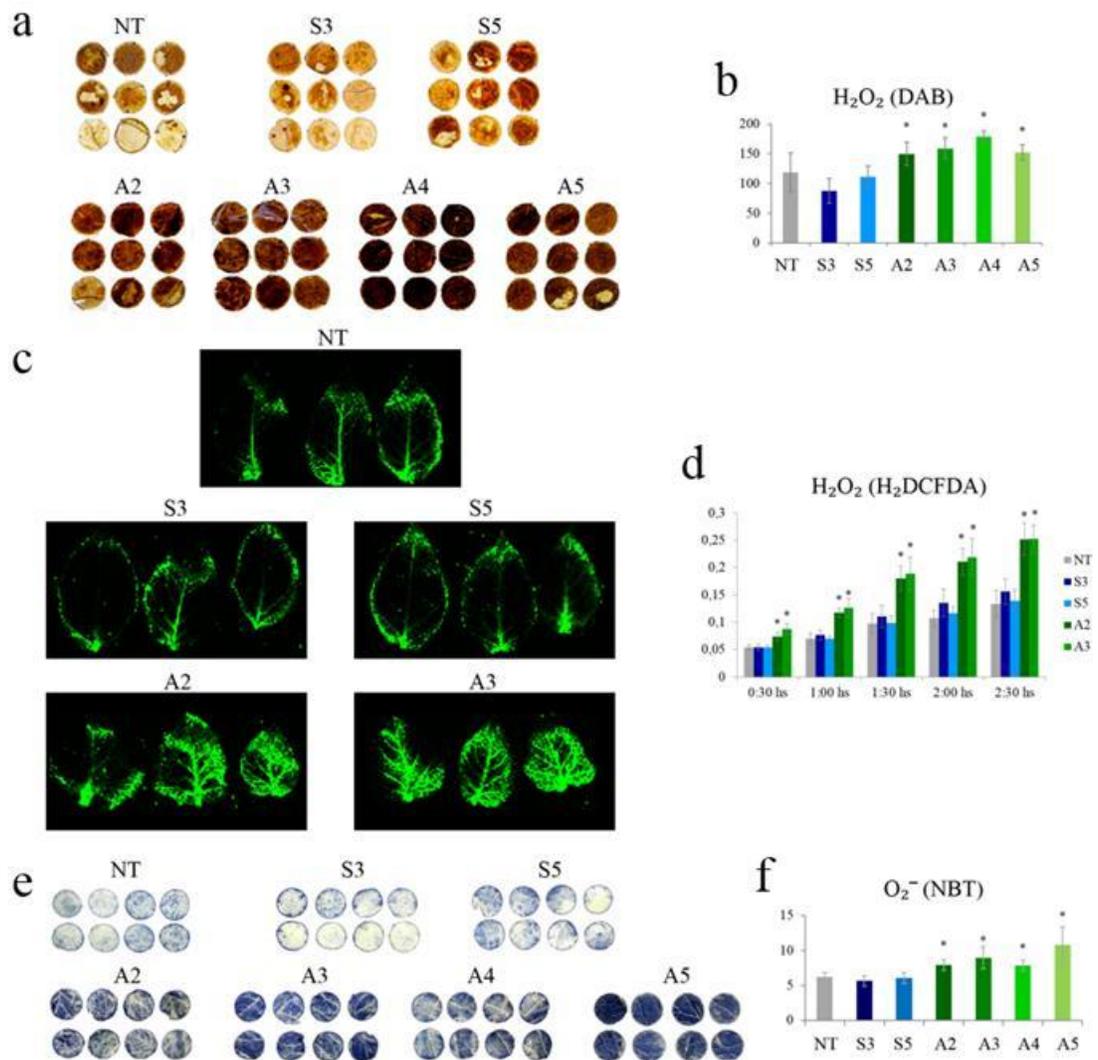
**Figura 2.10. Análisis de la pared celular de las líneas transgénicas y del control NT.** (a) Análisis de la pared celular mediante FT-IR y componentes principales de los espectros obtenidos. Los componentes 1 y 2 muestran la separación del control (NT) y las líneas sobreexpresantes (S3 y S5) con respecto a las líneas silenciadas (A2 y A3). (b) Componente principal 1 donde se muestran las principales bandas infrarrojas. (c) Contenido de azúcares neutros y celulosa. Los datos representan valores promedios ( $\pm$  error estándar) de 3 réplicas. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba t (\*=  $p \leq 0,05$  y \*\*=  $p \leq 0,001$ ). (d) Contenido de monosacáridos neutros no celulósicos y ácidos urónicos. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba t (\*= $p \leq 0,001$ ).). Las muestras corresponden a hojas del control NT (gris), líneas sobreexpresantes S3 (azul) y S5 (celeste) y líneas silenciadas A2 (verde oscuro) y A3 (verde claro).

### 2.3.3.2 Estudio de la participación de *SNI* en la homeostasis redox y en el balance hormonal

#### 2.3.3.2.1 Determinación de especies reactivas de oxígeno

Teniendo en cuenta los antecedentes que proponen que los péptidos Snakin/GASA actúan como antioxidantes a través de su dominio rico en cisteínas y considerando la disminución observada en los niveles de ácido ascórbico en las líneas silenciadas, nos propusimos evaluar si *SNI* participa en la homeostasis redox mediante el análisis de la acumulación de EROs.

Como resultado de las tinciones histoquímicas (DAB, H<sub>2</sub>DFCA y NBT), observamos que las líneas silenciadas acumulan más EROs (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>-</sup>) comparado con el NT (Figura 2.11).

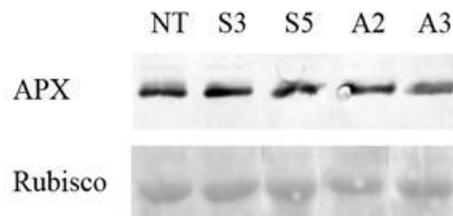


**Figura 2.11. Análisis de los niveles de especies reactivas de oxígeno en las líneas transgénicas y en el control NT.** (a) Tinción histoquímica de DAB para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en discos de hojas de las líneas sobreexpresantes, silenciadas y de plantas NT. (b) Análisis cuantitativos de (a). (c) Tinción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en hojas mediante el compuesto H<sub>2</sub>DCFCA en las líneas transgénicas y el control NT. (d) Análisis cuantitativos de (c) en función del tiempo. (e) Tinción de NBT para O<sub>2</sub><sup>-</sup> en discos de hojas de las líneas sobreexpresantes, silenciadas y de plantas NT. (f) Análisis cuantitativos de (e). Los \* muestran las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control NT ( $p < 0,05$ ).

### 2.3.3.2.2 Cuantificación de los niveles de la enzima Ascorbato Peroxidasa

Considerando los datos previos que indican que las líneas silenciadas presentan una disregulación en la homeostasis redox, analizamos los niveles de la enzima ascorbato

peroxidasa, la cual está involucrada en la eliminación de  $H_2O_2$  utilizando ácido ascórbico como donante de electrones. El análisis por *Western blot* empleando un anticuerpo anti-APX mostró niveles similares de proteína en las líneas transgénicas y el control. Estos resultados sugieren que la mayor acumulación de  $H_2O_2$  observada en las líneas silenciadas no se debe a una disminución en los niveles de la enzima ascorbato peroxidasa; aunque no se pueden descartar cambios a nivel de su actividad. La alteración en los niveles de EROs detectada en estas líneas podría explicarse por el bajo contenido de ácido ascórbico. Además, considerando que se ha sugerido que las proteínas Snakin/GASA actúan como antioxidantes a través de su dominio rico en cisteínas, el silenciamiento de *SNI* podría contribuir a la falta de capacidad antioxidante en estas líneas.



**Figura 2.12. Determinación de los niveles de la enzima Ascorbato Peroxidasa.** *Western blot* realizado a partir de hojas de las líneas transgénicas y el control y revelado con un anticuerpo anti-APX.

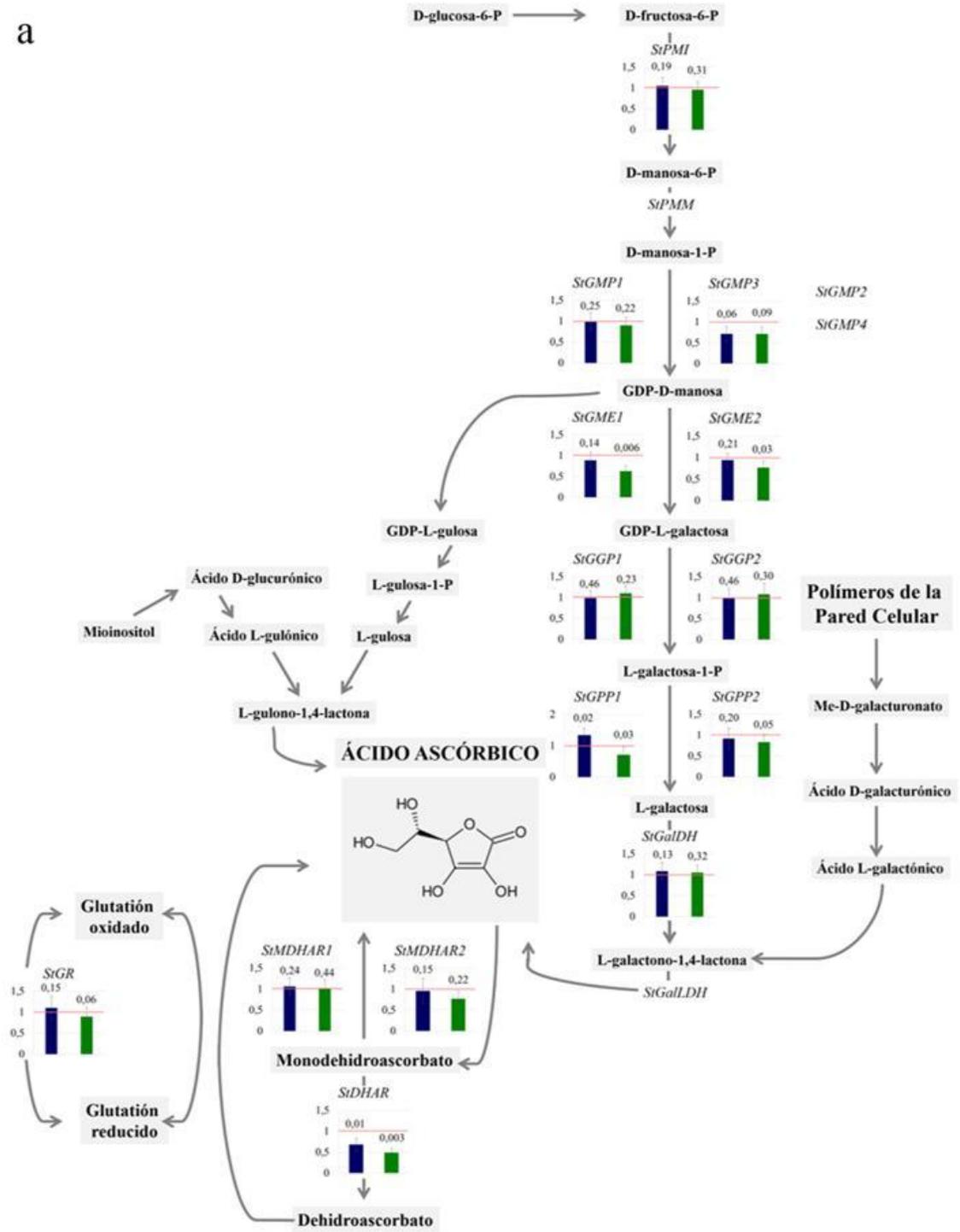
### 2.3.3.2.3 Cuantificación relativa de la expresión de genes involucrados en la síntesis de ácido ascórbico

Los niveles endógenos de ácido ascórbico están determinados tanto por la biosíntesis *de novo* del mismo como por el reciclaje de sus formas oxidadas. Existen varios caminos alternativos para su síntesis siendo la vía conocida como Smirnoff-Wheeler la de mayor importancia en plantas. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se decidió profundizar en el estudio de la regulación génica de las enzimas involucradas en el metabolismo del

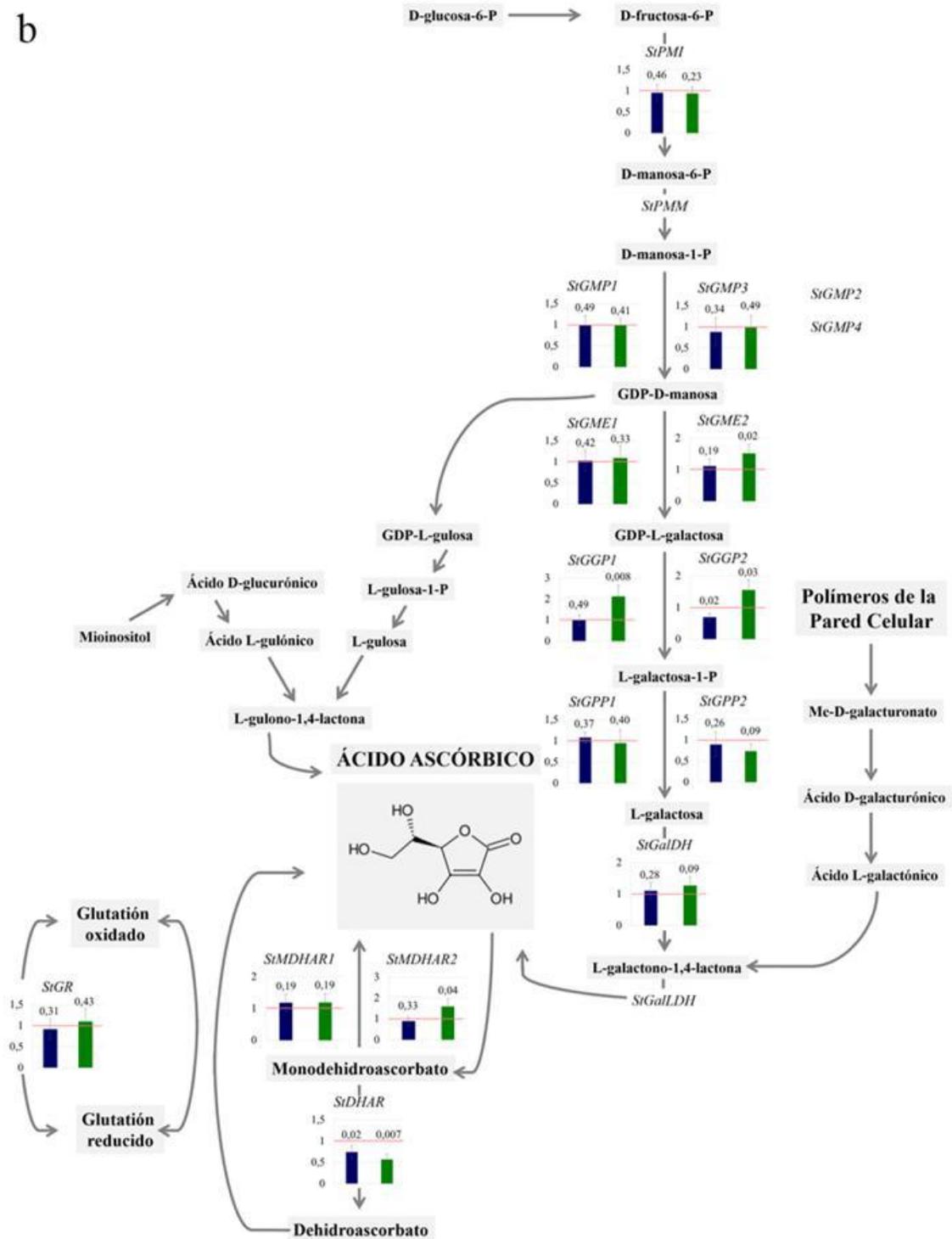
ácido ascórbico en muestras de dos tejidos distintos (ápice y hojas) de las líneas transgénicas y del control NT mediante RT-qPCR (Figura 2.13).

Estos análisis mostraron una disminución significativa de la expresión del gen *StGME1* en los ápices de la línea A2. La enzima GDP-D-manosa 3,5-epimerase convierte GDP-D-manosa a GDP-L-galactosa y es considerada una enzima central de la principal vía de síntesis de ácido ascórbico en plantas. Asimismo, esta línea también mostró una reducción importante en la expresión del gen *StDHAR* involucrado en el reciclaje del ascorbato tanto en ápices como en hojas. Este gen codifica para la enzima dehidroascorbato reductasa la cual es necesaria para recuperar el ácido ascórbico a partir de ácido dehidroascórbico y evitar su hidrólisis irreversible a ácido 2,3-diketogulónico. Estos resultados están en concordancia con la disminución en los niveles de ácido ascórbico observada en las líneas silenciadas y sugieren que la reducción en el contenido de ascorbato podría explicarse por una regulación negativa en su biosíntesis así como también por el reciclaje menos eficiente.

a



b



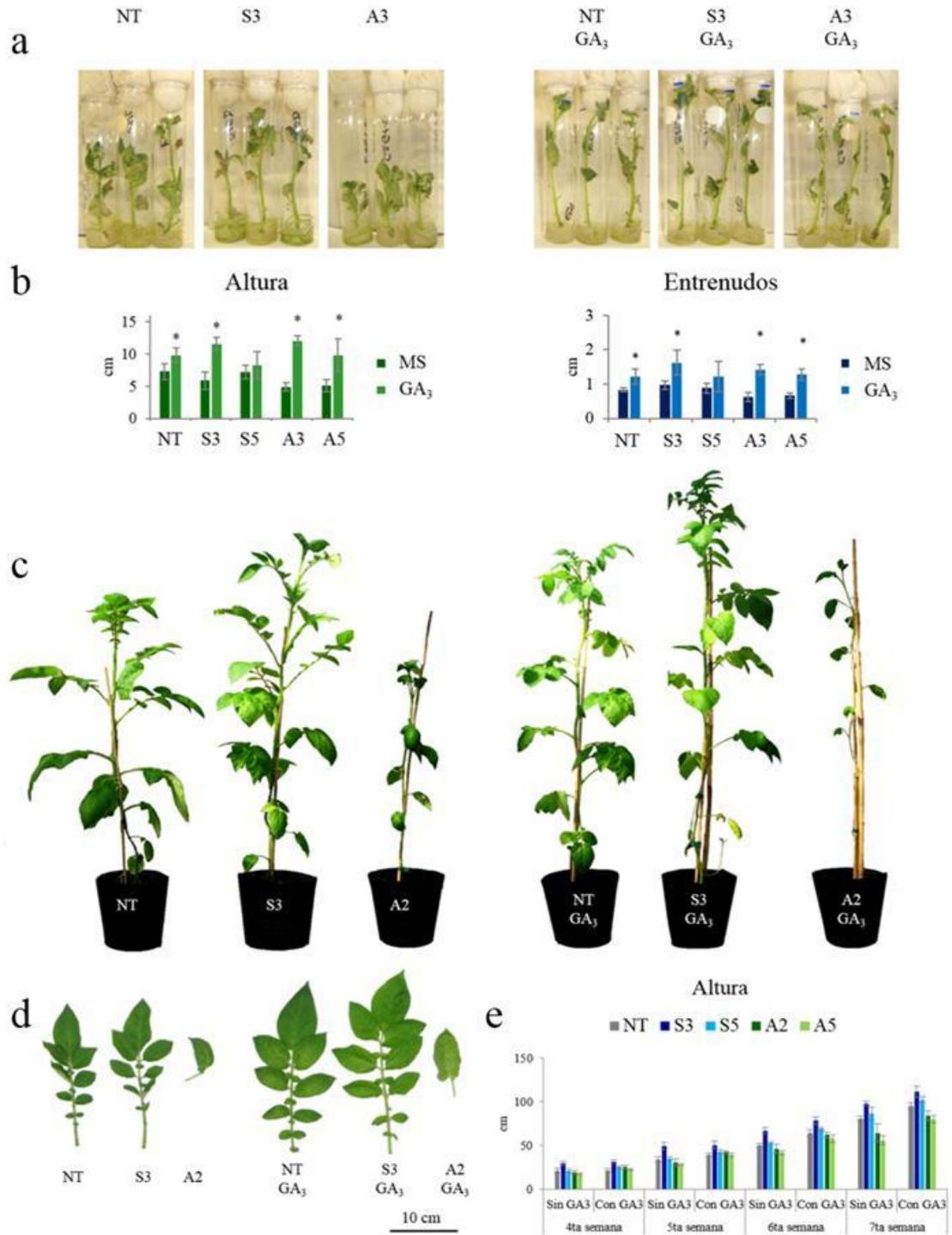
**Figura 2.13. Expresión relativa de genes involucrados en la síntesis y el reciclaje de ácido ascórbico.** Niveles de expresión relativa determinados mediante RT-qPCR en muestras de ápices (a) y hojas (b) de las líneas S3 (azul) y A2 (verde) de los siguientes genes: *StPMI* (D-mannosa-6-fosfato isomerasa); *StPMM* (fosfomanomutasa); *StGMP* (GDP- manosa pirofosforilasa (manosa-1-

fosfato guanyltransferasa); *StGME* (GDP-manosa-3',5'-epimerasa); *StGGP* (GDP-L-galactosa fosforilasa); *StGPP* (L-galactosa-1-fosfato fosfatasa); *StGalDH* (L-galactosa deshidrogenasa); *StGalLDH* (L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa); *StMDHAR* (monodehidroascorbato reductasa); *StDHAR* (dehidroascorbato reductasa); *StGR* (glutación reductasa). Se analizaron 3 réplicas biológicas y 2 réplicas técnicas en cada caso y se utilizó el gen del factor de elongación *Efl $\alpha$*  como gen de referencia.

#### 2.3.3.2.4 Relación entre *SNI* y el metabolismo de hormonas en líneas de papa que sobreexpresan o silencian este gen

Dado que algunas de las características fenotípicas observadas en las líneas silenciadas son similares a alteraciones descritas para mutantes deficientes en GA y teniendo en cuenta los antecedentes que sustentan la vinculación de los genes de la familia Snakin/GASA con esta hormona, nos planteamos estudiar la función de *SNI* en el desarrollo en relación a las respuestas mediadas por GA. La modulación de los niveles de GA y la regulación de los componentes de la vía de señalización afectan directamente el crecimiento y desarrollo de las plantas. En este contexto, buscamos entender si *SNI* participa de alguna manera en los procesos regulados por esta hormona.

Con el fin de evaluar el efecto de la aplicación exógena de GA en el crecimiento y el desarrollo de las plantas que sobreexpresan o silencian *SNI* se realizaron ensayos tanto *in vitro* como en invernáculo. Si bien el agregado de la hormona al medio de cultivo en ensayos *in vitro* permite que las plantas silenciadas se elonguen a niveles comparables al control NT, no es posible recuperar el fenotipo normal de las hojas (Figura 2.14 a y b). Asimismo, se obtuvieron resultados similares rociando plantas crecidas en maceta con una solución 10  $\mu$ M de GA<sub>3</sub> (Figura 2.14 c, d y e).



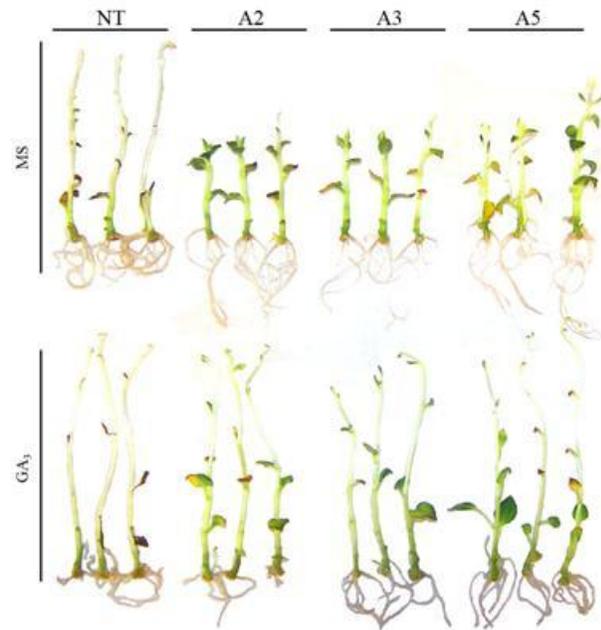
**Figura 2.14. Efecto del ácido giberélico en el crecimiento de las líneas que sobreexpresan o silencian *SNI*.** (a) Ensayo *in vitro* de crecimiento en medio de cultivo MS sólo o con el agregado de GA<sub>3</sub>. (b) Altura y longitud de los entrenudos de las líneas transgénicas y del control NT crecidas en ambas condiciones. (c) Ensayo de aplicación exógena de GA<sub>3</sub> en plantas crecidas en invernáculo.

(d) Fenotipo de las hojas tratadas y no tratadas con GA<sub>3</sub>. (e) Altura de plantas tratadas y no tratadas con GA<sub>3</sub>. \* indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de cada línea tratada con respecto la misma línea no tratada.

Se ha demostrado que plantas de *Arabidopsis* con niveles reducidos de GA muestran características de plantas crecidas en luz cuando son mantenidas en oscuridad. Los cambios morfológicos inducidos en la oscuridad en estas plantas con bajos niveles endógenos de GA son reducidos mediante el tratamiento con paclobutrazol, lo que sugiere que el ácido giberélico es necesario para completar el desarrollo etiolado. El análisis de mutantes *gal-3* deficientes en GA (este gen codifica una enzima que cataliza el primer paso en la síntesis de esta hormona) crecidas en oscuridad indica que el ácido giberélico es necesario para que ocurra la escotomorfogénesis en estas condiciones. La reversión de este fenotipo por la aplicación exógena de GA es consistente con el rol de esta hormona en la represión de la fotomorfogénesis ante la falta de luz en *Arabidopsis* (Alabadí y col. 2004).

Como se mencionó anteriormente, las líneas que silencian *SNI* presentan un fenotipo que comparte ciertas características con plantas con niveles reducidos en GA; teniendo en cuenta esto y los antecedentes que sugieren que esta hormona es necesaria para la represión de la fotomorfogénesis en ausencia de luz, realizamos un ensayo de crecimiento *in vitro* en condiciones de total oscuridad. Los resultados indicaron que luego de crecer en medio MS y en oscuridad durante 3 semanas las plantas de las líneas silenciadas mostraron un fenotipo muy parecido a plantas crecidas en luz, mientras que los controles exhibieron un aspecto etiolado muy marcado. Con el fin de evaluar si este comportamiento podía ser revertido por la aplicación de GA al medio, también se crecieron plantas en oscuridad con el agregado de esta hormona. En este caso, las plantas de las líneas que silencian *SNI* presentaron ciertas características de etiolación y se elongaron de manera similar al control NT. Sin embargo,

el fenotipo no fue revertido totalmente ya que estas líneas mostraron hojas verdes similares a las de las plantas crecidas en presencia de luz (Figura 2.15).



**Figura 2.15. Ensayo de crecimiento *in vitro* en condiciones de oscuridad de las líneas que silencian *SNI*.** Ensayo *in vitro* de crecimiento en medio de cultivo MS sólo o con el agregado de  $GA_3$ .

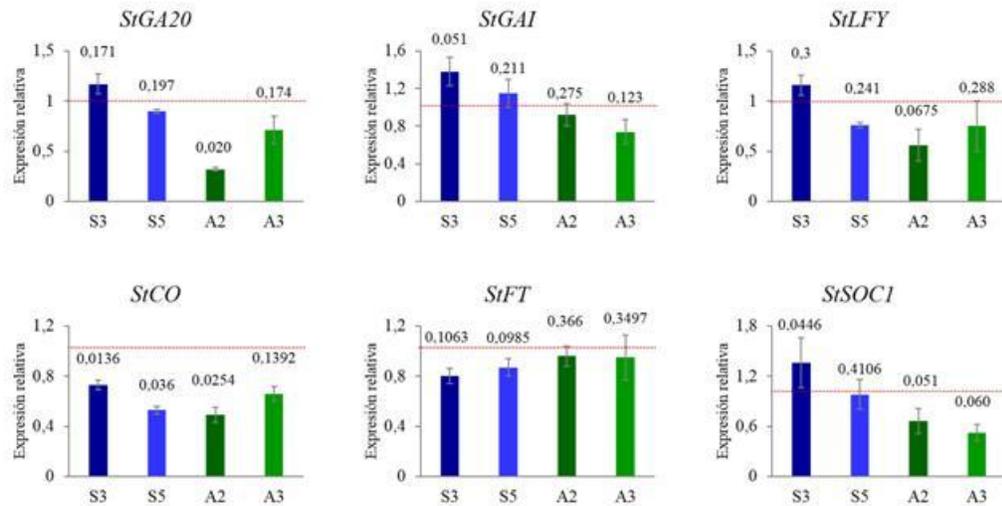
La ruta de biosíntesis de GAs ocurre a través de diferentes pasos catalizados por enzimas de distinta localización celular y se puede dividir en tres partes: 1) la síntesis de entkaureno en los plastidios, 2) la oxidación de ent-kaureno a  $GA_{12}$  en el retículo endoplasmático y 3) la oxidación en el citoplasma de  $GA_{12}$  a GAs activas de 19 átomos de carbono o inactivas de 20 átomos de carbono (Yamaguchi 2008). En papa, la vía predominante implica, en la última etapa, la 13-hidroxilación de  $GA_{12}$  a  $GA_{53}$  seguida de sucesivos pasos de oxidación para dar lugar a las GAs activas 1 y 3 (Jackson y col. 2000). En los últimos años, se han clonado casi todo los genes que codifican para las enzimas involucradas en el metabolismo de GA y se han identificado los mutantes correspondientes en varias especies de plantas (Hedden y Phillips 2000). Las enzimas que participan en los

pasos finales de síntesis constituyen los principales puntos de control de la vía existiendo un mecanismo de regulación por retroalimentación. De esta manera, las GA20-oxidasas y las GA3-oxidasas, que catalizan la síntesis de GAs activas, están sometidas a una retroalimentación negativa, ya que la abundancia del producto final (GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>) reduce sus niveles de ARNm. Por otro lado, las GA2-oxidasas (encargadas de la inactivación de las GAs) están sometidas a una retroalimentación positiva, de forma que el incremento de GAs activas promueve la expresión de los genes que codifican estas enzimas, lo que ayuda a regular su concentración. En papa se clonaron tres GA20-ox (StGA20ox1, StGA20ox2 y StGA20ox3) (Carrera y col. 1999), dos GA-3ox (StGA3ox1 y StGA3ox2) y una GA-2ox (StGA2ox1) (Kloosterman y col. 2007).

La cascada de señales que se desencadena tras la percepción de GAs es menos conocida que la ruta de biosíntesis. Se sabe que tras la percepción de las GAs activas por el receptor (GID), se forma un complejo GA-GID que induce la ubiquitinización de las proteínas DELLA, que actúan como reguladores negativos de la respuesta a GAs. De esta manera son destinadas a la degradación por el proteosoma 26S y se activa la transcripción de genes de respuesta a esta hormona involucrados en diversos procesos del desarrollo de las plantas (Harberd y col. 2009).

Con el fin de determinar si *SNI* participa en la regulación de los componentes de la vía de señalización por GA se evaluaron mediante RT-qPCR los niveles de expresión de los genes involucrados en el metabolismo de esta hormona así como también genes que codifican proteínas centrales en las respuestas mediadas por GA en papa, tales como *StSOC1*, *StFT*, *StLFY* (Rodríguez-Falcón y col. 2006). Los resultados mostraron una reducción significativa del nivel de expresión de *StGA20* en una de las líneas silenciadas

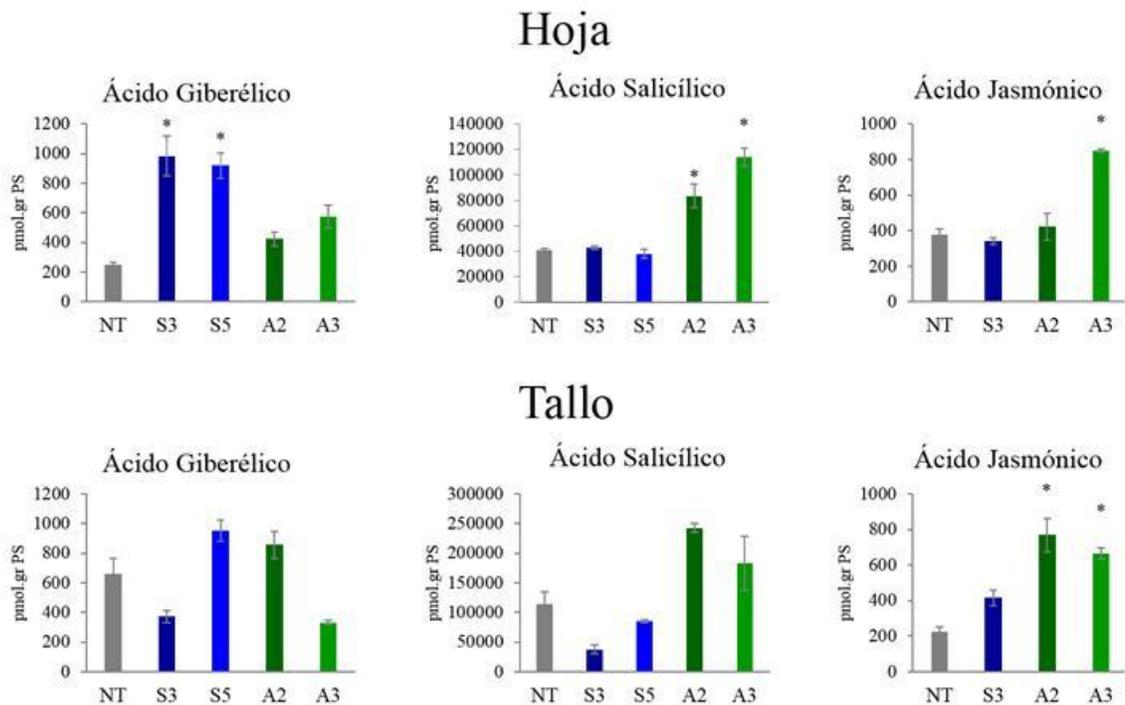
(A2) y de *StCO* en las líneas sobreexpresantes y en A2, mientras que no se encontraron diferencias en los niveles de expresión en los otros genes analizados que forman parte de la vía de señalización de esta hormona en las líneas que sobreexpresan o silencian *SN1*.



**Figura 2.16. Niveles de expresión de genes que codifican enzimas clave del metabolismo de GA y genes que forman parte de la vía de señalización de esta hormona.** Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de expresión de genes involucrados en las vías de señalización de GA en hojas de las líneas sobreexpresantes y silenciadas de *SN1*. Se analizaron 3 réplicas biológicas y 2 réplicas técnicas en cada caso y se utilizó el gen del factor de elongación *Efla* como gen de referencia.

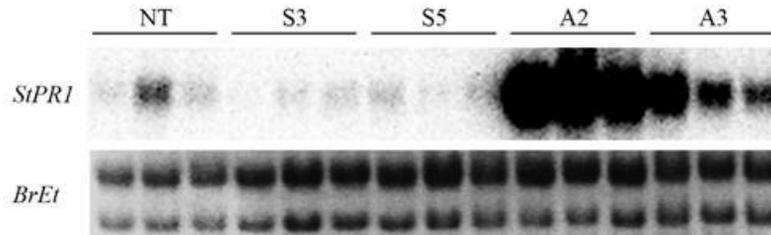
Si bien en un principio se consideraba la relación con GA como una característica que definía a la familia Snakin/GASA, las evidencias posteriores sugieren que estos genes están vinculados también a otras hormonas. En este sentido, se ha demostrado que la expresión de la mayoría de los genes Snakin/GASA está regulada por hormonas y además, que algunos de ellos participan en vías de señalización hormonal modulando tanto las respuestas como los niveles de hormonas en la planta. Con el objetivo de profundizar el estudio de la participación de *SN1* en el balance hormonal, se analizaron los niveles de GA ( $GA_1$ , forma activa predominante en papa), SA, JA y ABA en muestras de tallos y hojas de las líneas transgénicas y del control NT (Figura 2.17). Con respecto a las hojas, los

resultados mostraron un aumento significativo de GA en las líneas sobreexpresantes, de SA en las líneas silenciadas, y de JA en la línea A3. En cuanto a los resultados obtenidos a partir de las muestras de tallo, en las líneas silenciadas se observó un incremento significativo en los niveles de JA y un aumento en el contenido de SA con respecto al control NT, aunque éstos no resultaron estadísticamente significativos. Por otro lado, no se detectaron cambios significativos en los niveles de GA, SA o JA en las líneas sobreexpresantes con respecto al control NT. Es importante destacar que las determinaciones del contenido de JA en la línea S5 así como también de ABA en todas las muestras (líneas transgénicas y control NT) mostraron mucha variabilidad por lo que no fue posible sacar conclusiones al respecto.



**Figura 2.17. Determinación de los niveles hormonales en las líneas que sobreexpresan o silencian *SNI*.** Análisis de los niveles de ácido giberélico ( $GA_1$ ), ácido salicílico y ácido jasmónico en muestras de hoja y de tallo de las líneas transgénicas y el control NT. Se grafica el promedio de 3 o 4 réplicas biológicas y el error estándar. Los \* muestran las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control NT ( $p < 0,05$ ).

Teniendo en cuenta estos resultados se evaluó la expresión del gen *StPRI* (implicado en el mecanismo de acción del SA) en muestras de hojas de las líneas transgénicas. En concordancia con los niveles elevados de SA observados en las líneas que silencian *SNI*, se detectó una fuerte inducción de *StPRI* en A2 y A3 (Figura 2.18).

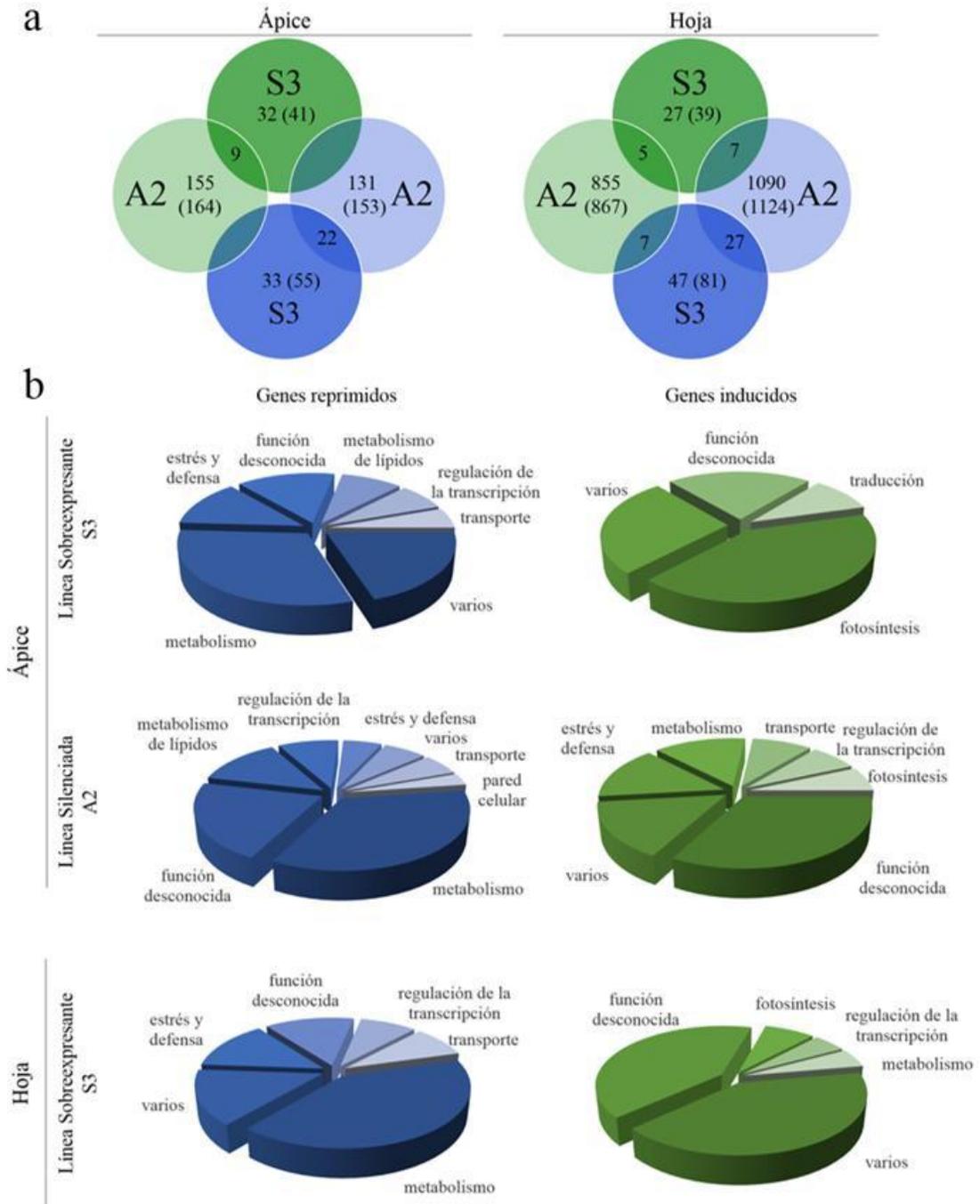


**Figura 2.18. Niveles de expresión del gen *StPRI* en muestras de hoja de las líneas transgénicas.** Análisis mediante *Northern blot* de los niveles de expresión de *StPRI* en muestras de hojas de las líneas sobreexpresantes y silenciadas de *SNI*. Se analizaron 3 réplicas biológicas.

### 2.3.3.3 Análisis de los perfiles transcripcionales en las líneas transgénicas que sobreexpresan o silencian *SNI*

Con el fin de identificar cambios transcripcionales que nos permitan esclarecer el modo de acción de *SNI* se hicieron análisis de RNAseq de las líneas transgénicas y del control NT en dos tejidos: ápice y hoja. Los resultados obtenidos a partir de las muestras de ápice mostraron un total de 96 genes diferencialmente expresados en los ápices de la línea S3 ( $q < 0,005$ , 41 genes inducidos y 55 reprimidos con respecto al control NT) y 317 genes en la línea A2 ( $q < 0,005$ , 164 genes inducidos y 153 reprimidos con respecto al control NT). En el caso de los análisis realizados a partir de las muestras de hojas, los resultados obtenidos mostraron un total de 120 genes diferencialmente expresados en la línea S3 ( $q < 0,005$ , 39 genes inducidos y 81 reprimidos con respecto al control NT) mientras que para la línea A2 el análisis estadístico reveló un número de genes mucho mayor ( $q < 0,005$ , 867 genes inducidos y 1124 reprimidos con respecto al control NT). Cabe destacar que una de las réplicas de la línea A2 (hoja) no pudo ser incluida en el análisis ya que se obtuvieron muy

pocas lecturas (con respecto al resto de las librerías) probablemente debido a un problema en el procesamiento de las muestras (se repitió la secuenciación y se obtuvieron resultados similares). Posteriormente, los transcritos fueron clasificados en diferentes grupos de acuerdo a sus funciones putativas (debido al gran número de genes diferencialmente expresado en las muestras de hoja de la línea A2 la misma no fue incluida en este análisis) (Figura 2.19).



**Figura 2.19. Análisis de los perfiles transcripcionales en las líneas que sobreexpresan o silencian *SNI*.** (a) Número de genes diferencialmente expresados en ápices y hojas de la línea S3 y A2 con respecto al control NT (genes inducidos en verde y reprimidos en azul, entre paréntesis el número total de genes en cada caso). (b) Clasificación de genes diferencialmente expresados según sus funciones putativas. Los genes identificados mediante el análisis de RNAseq en las líneas que

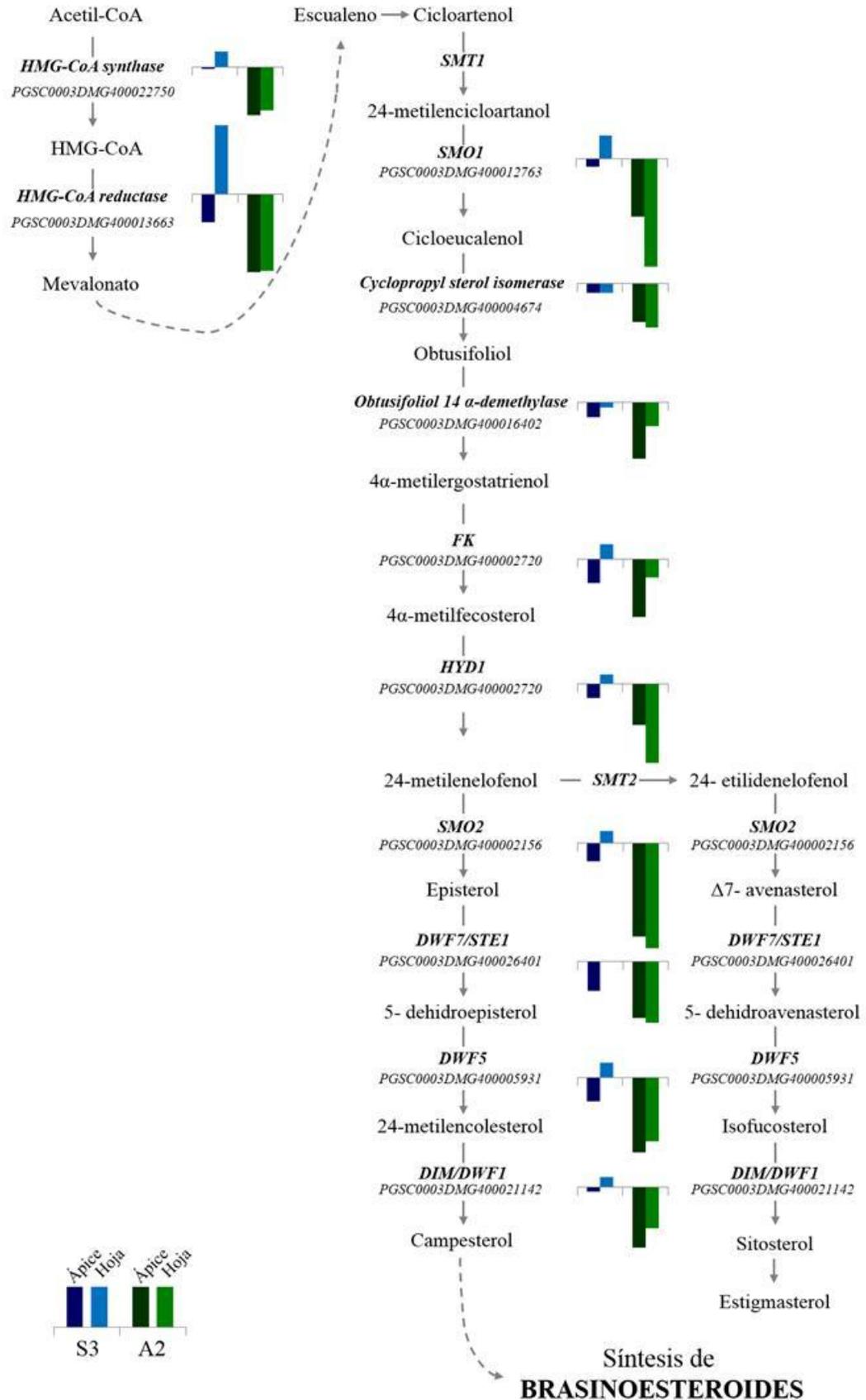
sobreexpresan o silencian *SNI* fueron agrupados en categorías funcionales de acuerdo a la información disponible en bases de datos públicas y mediante el programa *Blast2go*.

### 2.3.3.3.1 Niveles de expresión de genes relacionados a la síntesis de Brasinoesteroides

Entre los genes que mostraron niveles de expresión reducidos en la línea que silencia *SNI* pudimos identificar varios relacionados a la síntesis de esteroides. Estos compuestos son metabolitos entre los que podemos encontrar al colesterol, campesterol y sitosterol, los cuales tienen un rol fundamental como constituyentes de la membrana celular, así como también son el punto de partida para la síntesis de BR. La síntesis de esteroides ocurre a través de 4 grandes etapas: (1) síntesis de ácido mevalónico desde acetato, (2) conversión del ácido mevalónico a escualeno, (3) ciclación del escualeno para formar cicloartenol y (4) conversión de cicloartenol a esteroides como productos finales (Benveniste 2004). En la figura 2.20 se esquematizan los principales pasos de esta vía y los genes que mostraron cambios significativos en la línea A2 en los análisis de RNAseq. En la primera etapa, la acetyl-coenzima A (acetil-CoA), precursor de la síntesis de esteroides, es convertida a acetoacetil-CoA. Posteriormente, una reacción de condensación catalizada por la enzima *HMG-CoA synthase* (*PGSC0003DMG400022750*) entre acetoacetil-CoA y una segunda molécula de acetil-CoA genera el producto 3-hidroxi- 3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). El HMG-CoA constituye un importante precursor de todos los compuestos isoprenoides presentes en las plantas y su reducción a ácido mevalónico es considerado un paso limitante siendo catalizado por la enzima *3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase* (*HMG-CoA reductase*, *PGSC0003DMG400013663*). En pasos subsecuentes, el ácido mevalónico es convertido a escualeno y luego a cicloartenol, el cual es el primer esteroide cíclico y constituye el precursor de todos los esteroides en plantas. La síntesis de fitoesteroides se lleva

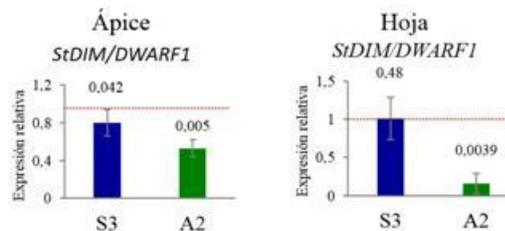
a cabo a través de tres vías paralelas: el colesterol es sintetizado mediante la vía de C8, el campesterol por la de C9, y el isofucosterol, el sitosterol y el estigmasterol mediante la vía de C10. En el paso inicial, la enzima *S-adenosyl-L-methionine-sterol-C- methyltransferase 1* (*SMT1*) agrega un grupo metilo al cicloartenol en la posición 24, dando como resultado 24-metilencicloartanol (Bouvier-Navé y col. 1998). En los pasos subsecuentes, el 24-metilencicloartanol es desmetilado en el C-4 por la acción de la enzima *sterol-4 $\alpha$ -methyl oxidase 1* (*SMO1*, *PGSC0003DMG400012763*) generando cicloeucalenol, el cual es isomerizado a obtusifoliol por la enzima *cyclopropyl sterol isomerase* (*CPI*, *PGSC0003DMG400004674*) (Lovato y col. 2000). La *obtusifoliol 14  $\alpha$ -demethylase* (*PGSC0003DMG400016402*) perteneciente a la familia del citocromo P450 convierte el obtusifoliol a 4  $\alpha$ -metilergostatrienol (Bak y col 1997). Se ha demostrado que el silenciamiento transiente de el gen que codifica para esta enzima en *Nicotiana benthamiana* resulta no sólo en la acumulación de su sustrato obtusifoliol, sino también en un crecimiento reducido, sugiriendo la importancia de los esteroides para el desarrollo normal de la planta (Burger y col. 2003). Una C-14 esteroil reductasa, codificada por el gen *FACKEL* (*FK*, *PGSC0003DMG400002720*), es responsable de convertir 4  $\alpha$ -metilergostatrienol a 4  $\alpha$ -metilfecosterol (Jang y col. 2000). Souter y col. (2002), demostraron que el gen *HYDRA1* (*HYD1*, *PGSC0003DMG400002720*) codifica una  $\Delta 8$ - $\Delta 7$  esteroil isomerasa, que convierte 4  $\alpha$ -metilfecosterol a 24-metilenlofenol. En una segunda reacción de metilación, el 24-metienlofenol es convertido a 24- etilidenlofenol por acción de la enzima *C-24 sterol methyltransferase 2* (*SMT2*). En este punto la vía se bifurca resultando en dos caminos paralelos que llevan a la formación de campesterol o sitosterol. La enzima *sterol-4 $\alpha$ -methyl oxidase 2* (*SMO2*, *PGSC0003DMG400002156*) remueve el

segundo grupo metilo del C-4 del 24- metilfenol y del 24-etilfenol para generar episterol y  $\Delta^7$ -avenasterol (Darnet y col. 2001). En este sentido, se ha demostrado que el silenciamiento de *SMO2* en *Nicotiana benthamiana*, lleva a la acumulación de 24-metilfenol y 24-etilfenol (Darnet y Rahier 2004). La enzima C-5-desaturasa DWF7/STE1 (*PGSC0003DMG400026401*) es responsable de introducir un enlace doble en el C-5 de los compuestos episterol (C9) y  $\Delta^7$ -avenasterol (C10) para obtener 5-dehidroepisterol y 5-dehydroavenasterol (Choe y col. 1999). En el siguiente paso, la enzima  $\Delta^7$ -reductasa DWF5 (*PGSC0003DMG400005931*) cataliza la reducción del doble enlace del 5-dehidroepisterol y del 5-dehydroavenasterol para generar 24-metilcolesterol (C9) e isofucosterol (C10) (Choe y col. 2000). Finalmente, se produce campesterol y sitosterol por medio de la enzima  $\Delta^24$ -reductasa DIM/DWF1 (*PGSC0003DMG400021142*) (Klahre y col. 1998).



**Figura 2.20. Esquema simplificado de la vía de síntesis de esteroides.** Se muestran los pasos principales y los genes que mostraron niveles de expresión significativamente reducidos en la línea que silencia *SNI* (verde) en el análisis de RNAseq (en azul se grafica el nivel de expresión correspondiente observado en la línea sobreexpresante S3).

Posteriormente y con el fin de confirmar estos resultados, se evaluó mediante RT-qPCR el nivel de expresión del gen que codifica la enzima *StDIM/DWF1* involucrada en la síntesis de BR. Los resultados revelaron una reducción significativa en la expresión de *StDIM/DWF1* en las líneas silenciadas en los dos tejidos analizados (como se había observado en los análisis de RNAseq). Si bien mediante el análisis de los perfiles transcripcionales no se detectaron cambios en el nivel de expresión del gen *StDIM/DWF1* en S3, también se incluyó esta línea en los análisis de RT-qPCR donde tampoco se observaron cambios en los niveles de expresión de este gen en los dos tejidos analizados con respecto al control.



**Figura 2.21. Niveles de expresión del gen *StDIM/DWARF1* en muestras de ápice y hoja de las líneas transgénicas.** Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de expresión de *StDIM/DWARF1* (codifica para una enzima que participa en la síntesis de brasinoesteroides) en ápices y hojas de las líneas transgénicas de *SNI*. Se analizaron 3 réplicas biológicas y 2 réplicas técnicas en cada caso y se utilizó el gen del factor de elongación *Eflα* como gen de referencia.

En línea con estos resultados, en ápice la línea A2 mostró niveles reducidos del gen *PGSC0003DMG400007095* que codifica para un factor de transcripción homólogo a BES1/BZR1 caracterizados como reguladores positivos de la señalización por BR (Wang y col. 2002, Yin y col. 2002, Clouse 2011).

## 2.4 Discusión

### 2.4.1 *SNI* está involucrado en el crecimiento y desarrollo de la planta

Previamente al desarrollo de esta tesis, se habían obtenido en nuestro grupo líneas de papa que sobreexpresan o silencian el gen *SNI*. En ensayos de desafío frente a hongos y bacterias, las líneas sobreexpresantes mostraron mayor tolerancia a las infecciones, demostrándose de esta manera el rol en defensa *in vivo* de *SNI* (Almasia y col. 2008).

Con el objetivo de profundizar el estudio funcional de *SNI*, en este trabajo se realizó una caracterización detallada de líneas transgénicas de papa con niveles de expresión alterados del mismo. Se extendió la caracterización molecular realizada con anterioridad a las líneas que sobreexpresan *SNI* (Almasia y col. 2008) (S3 y S5) y se analizaron por primera vez líneas que portan este gen en antisentido (líneas antisentido, A1-A5). Como resultado, se seleccionaron las líneas A2, A3, A4 y A5 para estudios posteriores. Desafortunadamente, nos resultó imposible evaluar el nivel de expresión del péptido en las líneas transgénicas ya que no se dispone de un anticuerpo específico para detectarlo y no fue posible expresarlo en sistemas bacterianos o de levaduras. Esto probablemente se deba a que la actividad intrínseca antimicrobiana/ antifúngica afecta la viabilidad de los sistemas mencionados.

Snakin-1 fue clasificado como miembro de la familia Snakin/GASA basado en la homología de secuencia de aminoácidos con péptidos de la familia GASA (*Gibberellic Acid-Stimulated in Arabidopsis*) de *Arabidopsis* (Berrocal-Lobo y col. 2002). Como se mencionó anteriormente, estos genes han sido identificados en un gran número de especies y codifican pequeñas proteínas que se distinguen por presentar 12 cisteínas en posiciones

muy conservadas. Sus funciones biológicas específicas no están completamente dilucidadas hasta el momento, aunque es probable que estén determinadas por la expresión temporal y espacial durante el desarrollo de la planta, y por la secuencia N-terminal variable (Ben-Nissan y col. 2004). El uso de las plantas transgénicas, ya sea por aumento o disminución de los niveles de expresión de los genes, constituye una potente herramienta que permite estudiar las funciones *in vivo* del gen en cuestión y ha sido utilizada con el fin de comprender el rol biológico de varios genes Snakin/GASA en distintas especies de plantas. Cabe destacar que en ciertos casos la obtención de líneas que silencien alguno de los genes Snakin/GASA ha fracasado o solo se ha conseguido una disminución moderada en los niveles del ARNm en cuestión, indicando la importancia de estos genes para el desarrollo de la planta (Kotilainen y col. 1999, Moyano-Cañete y col. 2012).

Si bien se ha demostrado que *SNI* está involucrado en defensa, se ha propuesto que su participación en otros procesos biológicos no sería incompatible con su función antimicrobiana (Segura y col. 1999). En este sentido, las líneas sobreexpresantes no mostraron diferencias morfológicas evidentes con respecto a las plantas NT; sin embargo, el silenciamiento de *SNI* resultó en notorias alteraciones fenotípicas sugiriendo que este gen también cumpliría un rol en el crecimiento y desarrollo de la planta. Las líneas silenciadas mostraron una menor altura y una reducción en la longitud de los entrenudos a lo largo del tiempo, así como también hojas de menor tamaño y de una forma atípica. Asimismo, el rendimiento y la floración se vieron seriamente afectados: las líneas silenciadas presentaron una producción de tubérculos significativamente menor al NT y un retraso muy marcado o ausencia total del desarrollo floral. Estos datos indican que *SNI*

cumpliría roles fundamentales en el crecimiento y desarrollo de la planta además de su función en defensa previamente asignada.

En concordancia con estos resultados, se ha visto recientemente que ciertos péptidos antimicrobianos presentan una función dual, no solo participan en defensa sino que también están involucrados en el crecimiento y desarrollo de la planta. Por ejemplo, Stotz y col. (2009) demostraron que la sobreexpresión de la defensina de tomate DEF2 aumenta la resistencia foliar al patógeno fúngico *Botrytis cinerea* y además altera el crecimiento de varios órganos. Por otro lado, la sobreexpresión constitutiva o la supresión por antisentido de este gen, reduce la viabilidad del polen y la producción de semillas. Asimismo, semillas de *Arabidopsis* en germinación tratadas exógenamente con defensinas mostraron inhibición del crecimiento radicular (Allen y col. 2008).

#### 2.4.2 *SNI* afecta la división celular

Continuando con la caracterización fenotípica de las líneas transgénicas nos concentramos en el fenotipo de las hojas donde se observan las alteraciones más evidentes de las líneas silenciadas. La cuantificación del tamaño de hojas completamente expandidas, reveló una disminución del 50-60% en el área foliar en las líneas silenciadas con respecto al control NT, mientras que no se observaron diferencias en el caso de las líneas sobreexpresantes. Dado que el tamaño final de la hoja está determinado por la división y la expansión celular (Gonzalez y col. 2010), la reducción en el área foliar observada en las líneas silenciadas podría ser el resultado de un menor número de células debido a la inhibición de la división celular o de células más pequeñas debido a la inhibición en el crecimiento celular. Los análisis del área celular de la epidermis adaxial revelaron que las líneas que silencian *SNI* presentan un incremento significativo en el tamaño celular medio

con respecto a las plantas NT, indicando una disminución en el número total de células por hoja. Estos resultados sugieren que *SNI* está involucrado en el proceso de división celular.

En este sentido, teniendo en cuenta la expresión en tejidos meristemáticos se ha propuesto previamente que *GIP4*, *GIP5* y *GASA4* (genes homólogos a *SNI*) participan en la división celular (Aubert y col. 1998, Ben-Nissan y col. 2004, Roxrud y col. 2007). En plantas transgénicas, la expresión de GUS dirigida por el promotor de *GASA4* fue detectada principalmente en tejidos caracterizados por la ocurrencia de una rápida división celular como lo son las regiones meristemáticas. Así, en el meristema radicular la expresión de GUS está limitada a la zona de división mientras que las regiones de elongación y diferenciación no mostraron actividad de la proteína reportera; por su parte, en el ápice se observó una mayor tinción en el meristema y en el primordio foliar demostrándose que *GASA4* se expresa preferentemente en células en división. Además, no se observó tinción en el hipocótilo en elongación, en el tallo, en los pecíolos o los pedicelos. Por lo tanto, los datos obtenidos sugieren que *GASA4* estaría involucrado en el proceso de división celular y no en la elongación celular (Roxrud y col. 2007). Asimismo, Furukawa y col. (2006) demostraron que la expresión de los genes *OsGASRs* está sincronizada con la proliferación celular en cultivos de células de arroz; y además, que *OsGASR1* y *OsGASR2* se expresan fuertemente en meristemas lo cual sugiere que ambos genes están implicados en división celular (Furukawa y col. 2006). Es interesante destacar que los árboles filogenéticos que reflejan las relaciones evolutivas de los genes de la familia Snakin/GASA y los análisis de sus secuencias de aminoácidos revelan una cercana relación entre *SNI* y *OsGASR1* (Furukawa y col. 2006, Peng y col. 2010).

Recientemente, nuestro grupo aisló y caracterizó la secuencia regulatoria de *SNI*. El estudio temporal y espacial de la expresión dirigida por la región promotora de *SNI* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* determinó que la misma presenta mayor actividad en las zonas de activa división celular (base de la flor, raíces, zonas meristemáticas de las hojas, zona de formación de yemas laterales), en las zonas de tejido vascular (de hojas y tallo), y en órganos reproductivos (flores) y de almacenamiento (semillas). Más aún, dicha expresión mostró ser dependiente de la ontogenia vegetal ya que es más fuerte cuando la planta es joven y disminuye con el tiempo (Almasia y col. 2010). Asimismo, el estudio de la expresión en el sistema homólogo de papa confirmó que la secuencia regulatoria es activa en las mismas zonas y órganos que en *Arabidopsis*, principalmente en los estadios tempranos de desarrollo y decreciendo hacia la senescencia (Almasia 2009). Estos resultados indican que el promotor de *SNI* es tiene mayor actividad en tejidos jóvenes y en activo crecimiento lo cual está de acuerdo con su función en el proceso de división celular.

La organogénesis, es decir, el desarrollo de los órganos, involucra la división de células y su posterior crecimiento y diferenciación. Hay dos procesos principales implicados en el crecimiento: primero, la división celular, que incrementa el número de células en un órgano, y segundo, la expansión de esas células (Meyerowitz 1997). Aunque se conoce muy poco acerca de los mecanismos involucrados, el número de células en el órgano de una planta podría, en teoría, ser regulado en diferentes niveles: la cantidad de células inicialmente reclutadas al primordio, la ventana de tiempo durante la cual ocurre la división celular (comienzo/final de la proliferación) y la tasa de proliferación (Autran y col. 2002). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que *SNI* afecta la división celular aunque sería interesante estudiar de qué manera participa en este proceso. Por otro lado, la

presencia de un menor número de células pero de un tamaño mayor en las hojas de las líneas que silencian *SNI* podría ser una consecuencia de un efecto de compensación. Este fenómeno, que puede ocurrir cuando la proliferación celular es inhibida en hojas en crecimiento o en órganos laterales relacionados, compensa parcialmente la disminución en el área foliar total mediante el aumento en la expansión celular (Tsukaya y Beemster 2006, Tsukaya 2008). Además, se ha visto que los mutantes y plantas transgénicas que exhiben un efecto de compensación usualmente tienen hojas más pequeñas y con una morfología alterada (Ferjani y col. 2007, De Veylder y col. 2001, Wang y col. 2000, Verkest y col. 2005, Horiguchi y col. 2005).

### 2.4.3 *SNI* afecta el metabolismo primario y la composición de la pared celular de las hojas

Teniendo en cuenta las alteraciones fenotípicas en las líneas que silencian *SNI*, se analizaron los niveles de 46 intermediarios del metabolismo primario y de 7 constituyentes de la pared celular en las hojas de las líneas transgénicas usando una combinación de técnicas de GC-MS, FT-IR y espectrofotometría. Se ha evidenciado que líneas transgénicas con alteraciones en el metabolismo de las hojas muestran cambios en la morfología de la planta, sugiriendo que el desarrollo puede ser modulado por el estado metabólico de la hoja. Sin embargo, no se han definido hasta el momento los mecanismos involucrados en determinar esos cambios (Raines y Paul 2006).

En este trabajo, se demostró que las líneas que silencian *SNI* exhiben importantes cambios en su metabolismo primario. Los niveles de ciertos intermediarios del ciclo de Krebs así como de algunos componentes de la vía del ácido ascórbico resultaron alterados

significativamente. Estos metabolitos son los que mejor explican el modelo de componentes principales aplicado que permite separar las líneas transgénicas del control. En este sentido, existen dos estudios interesantes que proponen una íntima relación funcional entre la respiración y el metabolismo del ascorbato. Millar y col. (2003) demostraron que la enzima L-galactono-1,4 lactona-deshidrogenasa (*L-GalDH*), que cataliza los últimos pasos en la biosíntesis del ácido ascórbico, está asociada con el complejo I de la cadena de transporte mitocondrial. Por otro lado, Alhag Dow y col. (2007) describieron que plantas de tomate con niveles reducidos de esta enzima presentan cambios en la función mitocondrial, alteraciones en el estado redox del ascorbato e importantes defectos en el crecimiento de las hojas como consecuencia de una reducción en la expansión celular. Dada la importancia del ascorbato en la fotosíntesis, sería esperable que estas líneas presenten alteraciones en la capacidad fotosintética. Sin embargo, los resultados indican que la disminución en el crecimiento observada en las líneas que silencian *L-GalDH* no se debe a una menor tasa de fotosíntesis ya que ésta no se vio afectada. En este sentido se ha sugerido que una de las consecuencias metabólicas más importantes que podría explicar las alteraciones en el crecimiento celular en las hojas de estas líneas transgénicas es el cambio en la función mitocondrial dado por las alteraciones en el ciclo de Krebs (Alhag Dow y col. 2007). De la misma forma, la disminución en el crecimiento observada en las líneas que silencian *SNI* no puede ser explicada por una reducción en la fotosíntesis, ya que si bien observamos una tendencia hacia una menor tasa de asimilación, estas diferencias no resultaron ser significativas con respecto al control NT. Sin embargo, la caracterización de los perfiles metabólicos reveló importantes cambios en varios intermediarios del ciclo de Krebs que podrían contribuir al fenotipo observado.

El ácido ascórbico es el principal antioxidante de las células vegetales y también actúa como cofactor de enzimas involucradas en la regulación de la fotosíntesis, en la síntesis de hormonas y en la regeneración de otras moléculas antioxidantes (Gallie 2013). Asimismo, esta molécula ha sido implicada en la modulación de procesos claves del desarrollo como la expansión y la división celular. Con respecto a la división celular se ha propuesto que el ascorbato sería necesario para completar la transición G1-S del ciclo celular (Arrigoni 1994, Potters y col 2002). En este sentido, se ha observado que existe una correlación entre altos niveles de ácido ascórbico y células en división: se ha demostrado que el contenido del mismo es incrementado durante la división celular de células *BY-2* de tabaco y en los tejidos meristemáticos de *Pisum sativum*, resultados que son compatibles con el requerimiento de ascorbato para la progresión normal del ciclo celular (Kato y Esaka 1999, de Pinto y De Gara 2004). Asimismo, se ha demostrado que la proliferación celular está restringida en células transgénicas *BY-2* deficientes en ascorbato por la expresión en antisentido del gen *L-GalDH* (Tabata y col. 2001). El hecho de que las líneas que silencian *SNI* muestren alteraciones en la división celular y niveles reducidos de ácido ascórbico, refuerza el rol propuesto para esta molécula en la regulación de este proceso y sugiere que *SNI* podría participar en la división celular mediante la modulación de los niveles de ascorbato.

Los niveles endógenos de ácido ascórbico están determinados tanto por la biosíntesis *de novo* del mismo como por el reciclaje de sus formas oxidadas. El análisis de la expresión de genes implicados en el metabolismo del ácido ascórbico mostró una disminución significativa en los niveles del gen *StGME1* en los ápices de la línea A2, el cual codifica para la GDP-D-manosa 3,5-epimerasa considerada una enzima central de la principal vía de

síntesis de ácido ascórbico en plantas. Asimismo, esta línea también mostró una reducción importante tanto en ápice como en hoja en la expresión del gen *StDHAR* involucrado en el reciclaje del ascorbato. Este gen codifica para la enzima dehidroascorbato reductasa la cual es necesaria para recuperar el ácido ascórbico a partir de ácido dehidroascórbico y evitar su hidrólisis irreversible a ácido 2,3-diketogulónico. Se ha demostrado que el nivel de actividad de la enzima DHAR es un factor determinante en el contenido de ascórbico y/o el estado redox (Gallie 2013). Existen numerosas evidencias que indican que la sobreexpresión de este gen resulta en un aumento del contenido de ácido ascórbico como consecuencia de una mayor recuperación a partir de dehidroascorbato (Chen y col. 2003, Goo y col. 2008, Wang y col. 2010, Yin y col. 2010, Haroldsen y col. 2011, Qin y col. 2011, y Li y col. 2012). Estas observaciones sugieren que este gen se expresa en cantidades limitantes y que contribuye significativamente a los niveles de ácido ascórbico en las células (Chen y Gallie 2006). La importancia del reciclaje del ácido ascórbico en el crecimiento de la planta fue demostrado en líneas de tabaco suprimidas para la expresión del gen *DHAR* las cuales exhiben una tasa de expansión foliar reducida, un crecimiento más lento y un retraso en la floración, entre otras alteraciones (Chen y Gallie, 2006).

Los bajos niveles de expresión de los genes *StGME1* y *StDHAR* observados en la línea A2 están en concordancia con la disminución de los niveles de ácido ascórbico encontrados y sugieren que la reducción en el contenido de ascorbato, podría explicarse por una regulación negativa de su biosíntesis así como también por un reciclaje menos eficiente.

La importancia del ácido ascórbico no sólo se debe a su función como protector frente a estreses sino también a su participación en el crecimiento y el desarrollo de la planta. Si bien esta idea es aceptada ampliamente, el mecanismo por el cual esta molécula está

involucrada en los procesos celulares no está establecido claramente. En este sentido, se ha propuesto que la relación entre el ascorbato y el control del crecimiento de la planta podría estar determinada por la conexión que existe entre la principal vía de síntesis del ascorbato y la biosíntesis de la pared celular. La formación de GDP-manosa constituye uno de los primeros pasos en la síntesis de ácido ascórbico y también actúa como precursor para la síntesis de diversos polímeros de la pared celular. La enzima GME produce GDP-L-galactosa a partir de GDP-D-manosa y representa la intersección entre la biosíntesis de ácido ascórbico y polisacáridos de la pared celular. Recientemente, Gilbert y col. (2009) demostraron que el silenciamiento de *GME* en tomate efectivamente reduce el contenido de ascorbato en la planta, generando una acumulación de EROs y defectos en el desarrollo encontrándose afectadas tanto la división como la expansión celular. Asimismo, observaron que los cambios metabólicos más significativos en estas líneas están asociados al metabolismo central y al metabolismo relacionado a la pared celular y sugirieron una íntima relación entre las vías de síntesis del ácido ascórbico y de los polisacáridos no celulósicos de la pared celular (Gilbert y col. 2009). En este sentido, se ha propuesto que las alteraciones fenotípicas observadas en las líneas transgénicas de tomate que silencian *GME* están relacionadas a defectos en la formación de la pared celular (Voxeur y col. 2011). Por otro lado, el silenciamiento de la enzima GDP-manosa pirofosforilasa, que cataliza la síntesis de GDP-manosa, resultó en una reducción de los niveles de ascorbato así como del contenido de manosa en las paredes celulares en líneas transgénicas de papa, poniendo en evidencia la relación que existe entre las vías de síntesis del ácido ascórbico y de los precursores de la pared celular (Keller y col. 1999). De la misma manera, las líneas

que silencian *SNI* presentan niveles reducidos de ácido ascórbico así como también una disminución en el contenido de manosa en las paredes celulares.

Asimismo, se ha visto que la ruptura de los polímeros de la pared celular aumenta la disponibilidad de precursores para la síntesis de ascorbato a través de la vía del ácido L-galactónico (Di Matteo y col. 2010). Las paredes celulares constituyen mucho más que un simple soporte mecánico ya que los cambios en la morfología de los tejidos y órganos que tienen lugar durante el crecimiento y desarrollo de la planta, están controlados por la división celular junto con las modificaciones y las reorganizaciones de los componentes de la pared y con la síntesis e inserción del nuevo material entre los constituyentes de las paredes ya existentes (Cosgrove 2005). En este trabajo se demostró que el silenciamiento de *SNI* no sólo resulta en importantes alteraciones en la división celular sino también en cambios en la composición de la pared celular de las hojas. El contenido de azúcares neutros no celulósicos, en particular aquellos correspondientes a la fracción de pectinas (galactosa y ramnosa), así como también los niveles de ácidos urónicos, se encontraron significativamente reducidos en las paredes celulares de A2 y A3 sugiriendo una regulación negativa de las estructuras de ramnogalacturonanos-I en las líneas silenciadas.

La pared celular no solo participa en diversos eventos del desarrollo de la planta sino que también está involucrada en la trasmisión de información proveniente de estímulos externos (Hématy y col. 2009). Ciertos cambios en la composición de la pared celular pueden alterar las respuestas de defensa a diferentes tipos de patógenos (Ellis y Turner 2001, Vogel y col. 2002, Vogel y col. 2004, Hernández-Blanco y col. 2007, Sánchez-Rodríguez y col. 2009). Por ejemplo, Hernández-Blanco y col. (2007) demostraron que las deficiencias en las proteínas CESAs requeridas para la síntesis de celulosa en la pared

celular secundaria en los mutantes *ixr* lleva a la activación específica de vías de defensa. Nosotros encontramos que los niveles de celulosa están significativamente reducidos en la pared celular de las líneas transgénicas, siendo estas diferencias más pronunciadas en S3 y S5. Estos cambios en las líneas sobreexpresantes, las cuales se demostró previamente que son más tolerantes frente a infecciones fúngicas y bacterianas (Almasia y col. 2008), podrían estar relacionados de alguna manera a la resistencia mediada por *irx*. En este mismo sentido, el galactinol que fue descrito recientemente como un componente de la vía de señalización del mecanismo de resistencia sistémica inducida en plantas (Kim y col. 2008), mostró una reducción significativa en las líneas silenciadas. Si bien sería interesante evaluar el comportamiento de las líneas que silencian *SNI* frente a infecciones, las alteraciones fenotípicas que presentan estas plantas agregarían variables mecánicas con respecto al control NT y los resultados obtenidos en ensayos de desafío no serían comparables. En este contexto, realizamos ensayos de inhibición de crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* en placa utilizando extractos proteicos de hojas las líneas transgénicas. Los resultados indicaron que los extractos de las líneas que sobreexpresan *SNI* fueron capaces de reducir el crecimiento del hongo mientras que los extractos provenientes de las líneas silenciadas no exhibieron actividad inhibitoria e incluso permitieron un mayor crecimiento del hongo con respecto al control (Figura suplementaria 1). Estas evidencias, aunque de manera indirecta, confirman el rol en defensa de *SNI*.

Adicionalmente, se ha sugerido que tanto el galactinol como la rafinosa, los cuales se encuentran reducidos en A2 y A3, actúan como secuestradores de EROs para proteger a las células vegetales del daño oxidativo causado por el tratamiento con metilviológeno, salinidad o frío (Nishizawa y col. 2008, Van den Ende y Valluru 2009). Por otro lado, se ha

demostrado que la inhibición de la enzima 1D-mio-inositol-3-fosfato sintasa (MIPS) en líneas transgénicas de papa produce alteraciones morfológicas y resulta en niveles fuertemente reducidos de inositol, galactinol y rafinosa (Keller y col. 1998). Las plantas que expresan el gen que codifica para esta enzima en antisentido comparten ciertas alteraciones fenotípicas con las líneas que silencian *SNI* (altura reducida, aumento en el grosor de la hoja, defectos en la tuberización y en la floración), no obstante, la morfología de las hojas sigue siendo compuesta y no muestran una reducción en el tamaño foliar como se describió para A2 y A3. Si bien la regulación negativa de los azúcares de la familia de la rafinosa (galactinol y rafinosa) en las líneas que silencian *SNI* probablemente contribuye al fenotipo observado, es razonable suponer que las alteraciones morfológicas sean el resultado de todos los cambios metabólicos en conjunto causados por el silenciamiento de *SNI*.

#### 2.4.4 *SNI* participa en la homeostasis redox

Se ha propuesto que las proteínas Snakin/GASA participan en la modulación de los niveles de EROs debido a la presencia de cisteínas capaces de formar puentes disulfuro catalíticos en su estructura (Wigoda y col. 2006, Rubinovich y Weiss 2010). Los análisis informáticos sugieren que las cisteínas presentes en estas proteínas podrían crear potencialmente hasta cinco puentes disulfuro (Wigoda y col. 2006). La formación de este tipo de enlace entre dos residuos de cisteínas puede ser solamente estructural y funcionar estabilizando la proteína manteniendo su estructura terciaria (donde ayuda a prevenir la desnaturalización y disminuye la susceptibilidad a la degradación proteolítica) o puede ser reversiblemente oxidado (S-S) y reducido (-SH HS-) y este cambio en el estado redox resultar en un cambio catalítico o regulatorio. Los puentes disulfuros catalíticos se forman

entre dos cisteínas separadas por uno o dos aminoácidos y estos sitios activos redox pueden funcionar como dadores o aceptores de electrones (Buchanan y Balmer 2005).

Cuando sus niveles son elevados, las EROs son perjudiciales para las células; por lo tanto, las plantas tienen varios mecanismos para su detoxificación, incluyendo superóxido dismutasas, ascorbato peroxidasas, catalasas, glutatión peroxidasas, ácido ascórbico, tiorredoxinas, glutatión y peroxirredoxinas (Mittler y col. 2004). Las últimas dos moléculas contienen cisteínas activas redox para reducir el peróxido. Dado que todas las proteínas Snakin/GASA tienen pares de cisteínas separadas por uno o dos aminoácidos que podrían funcionar de la misma manera, se ha especulado que podrían cumplir un rol en la regulación redox.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y la disminución en los niveles de moléculas involucradas en el secuestro de EROs (ácido ascórbico, galactinol y rafinosa) observada en las líneas que silencian *SNI*, evaluamos los niveles de EROs en las líneas transgénicas con el objetivo de determinar si *SNI* está involucrado en el balance redox. Los resultados indicaron que las líneas silenciadas tienen mayores niveles de EROs ( $H_2O_2$  y  $O_2^-$ ) comparado con el NT, sugiriendo que *SNI* podría cumplir su rol participando en la regulación de la homeostasis redox.

En este sentido, Weiss y col. (2006) demostraron que en petunia los genes *GIP* son inducidos por  $H_2O_2$  y que *GIP2* participa en la regulación de los niveles de EROs. Sin embargo, no está claro de qué manera estas proteínas actúan removiendo el  $H_2O_2$  de la célula. Se ha sugerido que podrían funcionar de una forma similar al glutatión, tiorredoxinas o peroxirredoxinas, donde las cisteínas reducidas actuarían como dadoras de electrones para reducir el peróxido directamente, o a través de la reducción de otras

moléculas. Para determinar si el efecto es directo o indirecto, serían necesarios experimentos *in vitro* que prueben si las proteínas Snakin/GASA en estudio pueden eliminar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> directamente. Se ha demostrado que la supresión de la expresión de *GIP2* en líneas transgénicas de petunia inhibe la elongación del tallo en condiciones de bajas temperaturas (Ben-Nissan y col. 2004) mientras que su sobreexpresión promueve la elongación del tallo y la corola (Wigoda y col. 2006). Una cuestión todavía no resuelta es de qué manera la actividad antioxidante de GIP2 afecta el crecimiento celular. Se sabe que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promueve la elongación celular pero que altos niveles de EROs pueden inhibir la expansión de la célula produciendo cambios en la pared celular y causando estrés oxidativo, que impide numerosas funciones celulares (Mittler y col. 2004). Se ha sugerido que la hormona GA induce la elongación celular y la expresión de los genes GIP y que esto último sería necesario para mantener niveles adecuados de EROs para la elongación de las células (Wigoda y col. 2006).

En el año 2010 el grupo de Weiss aportó evidencias que apoyan la hipótesis de la participación de los genes Snakin/GASA en la homeostasis redox. En este sentido, han demostrado que la sobreexpresión de *GASA4* en *Arabidopsis* es capaz de suprimir la acumulación tanto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como de óxido nítrico en hojas heridas y que las semillas de estas líneas transgénicas son resistentes parcialmente al nitroprusiato de sodio, un donante de óxido nítrico. Asimismo, se observó que *E. coli* que expresan *GASA4* son más resistentes a los efectos inhibitorios en el crecimiento producidos por el nitroprusiato de sodio. Los resultados de este trabajo indican que la región C-terminal es responsable de la actividad antioxidante observada ya que al expresar una versión truncada de *GASA4* conteniendo sólo este dominio se obtiene un efecto similar. Además, la expresión de

versiones mutadas de esta proteína (donde se reemplazaron 4 cisteínas por residuos de alanina) en plantas reveló que las cisteínas conservadas de GASA4 son esenciales para su actividad redox y para la promoción de las respuestas asociadas a GA como la floración y la germinación de las semillas. El análisis bioinformático del dominio C-terminal de GASA4 reveló cierta similitud con el dominio rico en cisteínas de la proteína ABCE1 (*ATP-binding cassette 1*). Estas proteínas tienen la capacidad de unir moléculas de hierro y azufre a través de sus cisteínas y de esta manera participar en reacciones redox. A partir de estos resultados, se sugirió que las proteínas Snakin/GASA podrían actuar de una forma similar aunque esta posibilidad no fue evaluada experimentalmente (Rubinovich y col. 2010).

Recientemente, con el objetivo de profundizar el estudio acerca del modo de acción de las proteínas Snakin/GASA se investigó el efecto de las cisteínas en la secuencia Cisteína-Prolina-Cisteína (CPC) sobre la actividad antioxidante de GcGAST. Se construyeron plásmidos recombinantes de la proteína así como también dos versiones mutadas (Serina-Prolina-Cisteína o SPC y Cisteína-Prolina-Serina o CPS) los cuales fueron expresados en *E. coli*. Estos residuos se eligieron teniendo en cuenta estudios previos que indican que el motivo Cisteína-Prolina-Cisteína (CPC) de una oxidoreductasa presente en la mitocondria es sensible al estado redox y sería importante en el plegamiento oxidativo de las proteínas en el espacio de la membrana mitocondrial. La expresión de la versión mutante CPS resultó en una mayor sensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en una menor capacidad de eliminar peróxido indicando que el segundo residuo de cisteína en la CPC de GcGAST es más importante para su actividad antioxidante (Bai y col. 2013).

En frutilla, se ha propuesto que *FaGAST2* está involucrado en la maduración y en la elongación del fruto y se ha especulado que podría participar en la modulación de los niveles de EROs y que esto podría estar asociado a la relajación de la pared celular que ocurre durante el proceso de maduración. En este sentido, se ha demostrado que la sobreexpresión de *FaGAST2* promueve la disminución del tamaño de los frutos y de la planta en general probablemente mediante la reducción del tamaño celular. Asimismo, se observó que se expresa diferencialmente durante el desarrollo del fruto y que sus niveles transcripcionales aumentan con el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Moyano-Cañete y col. 2012).

De la misma manera, se ha propuesto que *GASA14* regula el crecimiento de la planta y la resistencia a estreses abióticos mediante la modulación de las EROs. La sobreexpresión de *GASA14* promueve la expansión foliar mientras que las líneas mutantes *gasal4-1* muestran un área foliar reducida. El análisis de la epidermis en estas líneas reveló que los cambios en el tamaño de las hojas se correlacionan con una diferencia en el área de las células, sugiriendo que *GASA14* está involucrado en el proceso de elongación celular (Sun y col. 2013). Asimismo, se ha demostrado que la sobreexpresión de *GASA14* incrementa la tolerancia a ABA y a estrés salino; y que, cuando son tratadas con ABA o sal, las plantas sobreexpresantes presentan menores niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que en las mutantes *gasal4-1* la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es mayor que en las plantas sin transformar. Teniendo en cuenta que los estreses usualmente causan daño oxidativo como resultado del aumento de las EROs, se ha propuesto que *GASA14* está involucrado en la tolerancia a estrés a través de la detoxificación de EROs. *GASA14* es atípica ya que contiene el dominio GASA característico de las proteínas Snakin/GASA así como también un dominio rico en prolinas (PRP). La sobreexpresión del dominio PRP solamente no modificó la respuesta de las

líneas transgénicas de *Arabidopsis* cuando fueron tratadas con ABA o sal, sugiriendo que el dominio GASA es necesario para la función de esta proteína (Sun y col. 2013).

#### 2.4.5 *SNI* está involucrado en el balance hormonal

Dado que algunas de las características fenotípicas observadas en las líneas que silencian *SNI* son similares a alteraciones descritas para mutantes deficientes en GA y teniendo en cuenta los antecedentes que sustentan la vinculación de los genes de la familia Snakin/GASA con esta hormona, nos planteamos estudiar de la función de *SNI* en el desarrollo en relación a las respuestas mediadas por GA. La modulación de los niveles de GA y la regulación de los componentes de la vía de señalización afectan directamente el crecimiento y desarrollo de las plantas. Si bien el agregado de GA permite que las líneas silenciadas se elonguen a niveles comparables al NT, no es posible recuperar el fenotipo normal de las hojas. La capacidad de responder al tratamiento con GA indica que las líneas que silencian *SNI* son sensibles a esta hormona y que los componentes de la vía de señalización son funcionales. Sin embargo, estos resultados sugieren que su fenotipo no puede ser explicado únicamente por una deficiencia en esta hormona.

Zhang y col (2009) propusieron un modelo para explicar el modo de acción de *GASA5* en el cual este homólogo de *SNI* cumpliría su función como regulador negativo del tiempo de floración y elongación del tallo mediante la modulación de la expresión de *GAI* (una de las 5 DELLAs en *Arabidopsis*). Por otro lado, *GASA5* también afectaría directamente la expresión de genes clave del proceso de floración como *FT* y *LFY*. De la misma forma, también se vio que otros genes Snakin/GASA participan en el crecimiento de la planta y en la tolerancia frente a estrés modulando la transcripción de las DELLAs (Li y col. 2011, Zhang y col., 2011, Moyano-Cañete y col. 2012). En este sentido, el análisis de los niveles

de expresión de los genes involucrados en el metabolismo y en respuestas mediadas por GA en papa no nos permitió confirmar si *SNI* participa de alguna manera en los procesos regulados por esta hormona.

La expresión de la mayoría de los genes Snakin/GASA está regulada por hormonas vegetales y se ha demostrado además, que algunos de ellos son capaces de modular tanto las respuestas como los niveles de hormonas en la planta. Las determinaciones de los niveles hormonales en las líneas transgénicas de *SNI* mostraron un aumento significativo de GA en las hojas de las líneas sobreexpresantes y de SA en las líneas silenciadas, mientras que en las muestras de tallo, en las líneas silenciadas se observó un incremento significativo en los niveles de JA y un aumento en el contenido de SA con respecto al control NT, aunque estos cambios no resultaron estadísticamente significativos.

Las evidencias sugieren que las proteínas Snakin/GASA participan en la interacción de distintas vías de señalización hormonal; y de esta manera, están involucradas en el desarrollo de la planta y sus respuestas frente a estímulos ambientales. En este sentido se ha demostrado que la sobreexpresión de *FsGASA4*, inducible por GA, es capaz de incrementar los niveles endógenos de SA y la expresión de genes implicados en la síntesis y respuestas de esta hormona (Alonso-Ramírez y col. 2009). Asimismo, se encontró que la señalización de SA está limitada en las plantas que sobreexpresan *GASA5* y que este bloqueo puede ser parcialmente revertido por la aplicación exógena de GA (Zhang y col. 2011).

El incremento en el contenido de SA en las líneas que silencian *SNI* podría estar relacionado a los mayores niveles de EROs observados en las mismas. Se ha demostrado que la alteración de la homeostasis redox en plantas transgénicas de tabaco deficientes en catalasa, enzima involucrada en la detoxificación de  $H_2O_2$ , induce la acumulación de SA así

como también de proteínas PRs (Chamnongpol y col. 1998). De la misma manera, las líneas que silencian *SNI* presentaron niveles elevados de SA así como también una fuerte inducción en la expresión de *StPRI*.

Además de participar en las respuestas frente a estreses bióticos y abióticos, el SA cumple un rol fundamental en la regulación de procesos fisiológicos durante el ciclo de vida de la planta. Si bien su función en el crecimiento y en el desarrollo ha sido menos estudiada en relación a otras hormonas, las evidencias indican que el SA también está involucrado en la fotosíntesis, respiración, germinación de semillas, floración y senescencia. Dado que el SA es un regulador de la homeostasis redox ya que es capaz de inhibir la actividad de catalasas y peroxidasas, se ha propuesto que podría participar en estos procesos mediante la modulación de los niveles de EROs. (Rivas-San Vicente y Plasencia 2011). En este sentido, se ha demostrado que mutantes de *Arabidopsis* con niveles elevados de SA presentan un fenotipo enano mientras que aquellas deficientes en esta hormona muestran una mayor tasa de crecimiento (Bowling y col. 1997, Abreu y Munné-Bosch 2009).

Cabe destacar que como resultado del análisis de los perfiles transcripcionales en las líneas transgénicas pudimos identificar varios genes relacionados a la síntesis de esteroides que mostraron niveles de expresión reducidos en la línea que silencia *SNI*. Estos compuestos son metabolitos entre los que podemos encontrar al colesterol, campesterol y sitosterol, los cuales tienen un rol fundamental como componentes de la membrana celular, así como también constituyen el punto de partida para la síntesis de BR. En línea con estos resultados, la línea A2 mostró niveles reducidos del gen *PGSC0003DMG400007095* que codifica para un factor de transcripción homólogo a BES1/BZR1 caracterizados como

reguladores positivos de la señalización por BR (Wang y col. 2002, Yin y col. 2002, Clouse 2011).

Recientemente, se ha demostrado que *OsGSRI* es capaz de regular los niveles de BR como resultado de la interacción directa con una enzima que participa en la biosíntesis de esta hormona (DIM/DWF1), y por otro lado, modular las respuestas de GA mediante la disminución de la expresión de la proteína DELLA, por lo que se ha propuesto que *OsGSRI* participa en la interacción de las vías de señalización de ambas hormonas (Wang y col. 2009). Los BR y las giberelinas son hormonas vegetales que promueven el crecimiento y tienen efectos similares en un amplio rango de procesos de desarrollo. Los mutantes deficientes o insensibles ya sea a GA o BR resultan en fenotipos similares, como enanismo, germinación de semillas reducida, desetiación en la oscuridad y retraso en la floración (Bai y col. 2012).

Los resultados obtenidos mediante los análisis de RNAseq sugieren que *SNI* podría regular la síntesis y los niveles de BR. Los BR son hormonas vegetales que están involucradas en distintas funciones como la elongación y la división celular, la reproducción, respuestas a estrés y el proceso de fotomorfogénesis (Clouse y Sasse 1998). Se han identificado mutantes tanto para la síntesis como para la señalización por BR y se ha demostrado que las deficiencias en esta hormona resultan en severos defectos en el crecimiento (Li y Chory 1999, Noguchi y col. 1999). Las enzimas C5-desaturasa,  $\Delta 7$ -reductasa, y  $\Delta 24$ -reductasa juegan un papel fundamental en el metabolismo de esteroides en plantas ya que funcionan en los últimos pasos de la síntesis de campesterol, precursor directo de los BR. Se ha demostrado que las mutaciones en los genes correspondientes *DWF7/STE1*, *DWF5* y *DWF1/DIM* en *Arabidopsis* bloquea los sucesivos pasos en la

conversión de episterol a campesterol. Estos mutantes tienen un fenotipo característico que incluye enanismo, hojas oscuras y redondeadas, reducida fertilidad, retraso en la senescencia y en la floración y su crecimiento puede ser revertido por aplicación exógena de BR (Clouse 2002, Schaller 2004).

Una de las funciones asignadas a los BR es participar no solo en expansión sino también en el proceso de división celular (Gudesblat y Russinova 2011). En este sentido, Nakaya y col. (2002) han observado que la aplicación exógena de BR puede revertir el tamaño de la hoja en el mutante *deetiolated2* (*det2*), defectuoso en la biosíntesis de BR, mediante el aumento tanto del número como del tamaño de las células; lo cual implica que los BR promueven el crecimiento foliar regulando positivamente ambos procesos: expansión y división celular (Nakaya y col. 2002). Asimismo, se ha demostrado que el tamaño foliar aumentado de las líneas de *Arabidopsis* que sobreexpresan *BRII* resulta del incremento en el número de células (Gonzalez y col. 2010). Por otro lado, se ha observado que los BR son requeridos para la progresión normal del ciclo celular en el meristema radicular y que contribuyen a la regulación del tamaño meristemático y del crecimiento de la raíz (González-García y col. 2011).

## 2.5 Conclusiones

En este trabajo se demostró que el silenciamiento de *SNI* resultó en notorias alteraciones fenotípicas sugiriendo que este gen también cumpliría un rol en el crecimiento y desarrollo de la planta además de su función en defensa previamente asignada. Los análisis posteriores nos permitieron determinar que *SNI* está involucrado en el proceso de división celular. Asimismo, pudimos evidenciar que este gen afecta el metabolismo primario: las líneas que silencian *SNI* exhiben importantes cambios en los niveles de ciertos intermediarios del ciclo de Krebs así como de algunos componentes de la vía del ácido ascórbico. En este sentido, el hecho de que estas líneas muestren alteraciones en la división celular y, en particular, niveles reducidos de ácido ascórbico, refuerza el rol propuesto para esta molécula en la regulación de este proceso y sugiere que *SNI* podría participar en la división celular mediante la modulación de los niveles de ascorbato. El silenciamiento de *SNI* también resultó en alteraciones en la composición de la pared celular de las hojas, que a la vez puede ser la causa de los defectos en el crecimiento y desarrollo observados en las líneas que silencian este gen. Por otro lado, los análisis de acumulación de EROs indicaron que *SNI* participa en la homeostasis redox. Como fue descrito para otros genes de la familia Snakin/GASA, es posible que *SNI* funcione mediante la modulación de las EROs (directa o indirectamente regulando los niveles de ácido ascórbico), y que esto actué como señal en la célula activando a su vez vías de señalización que tenga como resultado final un impacto sobre el crecimiento y desarrollo de la planta. El análisis de los perfiles transcripcionales en las líneas transgénicas nos permitió identificar varios genes relacionados a la síntesis de esteroides, compuestos que tienen un rol fundamental como constituyentes de la membrana celular y son precursores de los BR, que mostraron niveles

de expresión reducidos en la línea que silencia *SNI*. En este sentido, *SNI* estaría involucrado en el establecimiento del balance hormonal al menos, mediante la regulación de la síntesis de BR, como fue descrito previamente para su homólogo en arroz *OsGSRI* (Wang y col. 2009).

Capítulo 3: Identificación de nuevos genes Snakin/GASA en  
*Solanum tuberosum*

### 3.1 Introducción

En los últimos años, se han identificado un gran número de genes Snakin/GASA en distintas especies de plantas, tanto en mono como en dicotiledóneas. Los péptidos Snakin/GASA han sido clasificados dentro del gran grupo de péptidos ricos en cisteínas (Silverstein y col. 2007). Los mismos pueden ser divididos en varias clases según el número y la disposición de los residuos de cisteínas en su secuencia primaria y entre ellos encontramos proteínas como las defensinas, las tioninas y las LTPs (*lipid transfer proteins*). Todos tienen características comunes: (i) tamaño pequeño (menos de 160 aminoácidos), (ii) una región N-terminal correspondiente a un péptido señal, y (iii) un dominio C-terminal rico en cisteínas (Marshall y col. 2011). Aunque el número y la diversidad de péptidos ricos en cisteínas en plantas es grande, se ha sugerido que todavía restan por identificarse muchos más miembros de esta superfamilia (Silverstein y col. 2007). El desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación a gran escala y la disponibilidad de bases de datos de genomas secuenciados constituyen una herramienta muy útil para el descubrimiento de nuevos genes. En este contexto, se han identificado en los genomas de *Arabidopsis thaliana* y *Medicago truncatula* cientos de secuencias correspondientes a genes codificantes para defensinas (Silverstein y col. 2005). Si bien trabajos previos indicaban que estos genes formaban parte de pequeñas familias, estos resultados sugieren que los genes tipo defensinas constituyen grandes grupos y que probablemente su detección sea difícil utilizando métodos experimentales y bioinformáticos clásicos (Silverstein y col. 2005).

En papa se han aislado y caracterizado hasta el momento dos miembros de la familia Snakin/GASA (Snakin-1 y Snakin-2); para ambos péptidos se ha demostrado actividad

antimicrobiana y se los ha involucrado en la defensa de la planta (Segura y col. 1999, Berrocal-Lobo y col. 2002, Almasia y col. 2008, Kovalskaya y Hammond 2009, Kovalskaya y col. 2011). Asimismo, Berrocal-Lobo y col. (2002) mencionaron también la presencia de un tercer miembro de la familia Snakin/GASA en papa aunque éste no fue caracterizado funcionalmente aún.

La reciente publicación del genoma de papa por el Consorcio de Secuenciación del genoma de la papa constituye un gran avance en el conocimiento de este importante cultivo ya que facilitará la tarea del estudio de sus genes y sus productos. La genómica provee posibilidades para entender a nivel molecular los cultivos de interés agronómico y a partir de estos datos comprender mecanismos biológicos de los organismos vegetales en general (<http://www.potatogenome.net/index.php/Introduction>). A pesar de la importancia de esta especie, la genética y la herencia de muchos caracteres cuantitativos y cualitativos de importancia agronómica no se comprenden en su totalidad. Esto se debe principalmente a la naturaleza tetraploide de su genoma, al alto grado de heterocigocidad y a la falta de disponibilidad de mutantes. El genoma de la papa consta de 12 cromosomas y tiene una longitud (haploide) de aproximadamente 840 millones de pares de bases, por lo que es una planta con un genoma de tamaño mediano. Fuera de su rango natural en América del sur, se considera que la papa cultivada tiene una estrecha base genética resultado de la introducción limitada de germoplasma originalmente en Europa. La mayoría de los cultivares son autotetraploides ( $2n=4x=48$ ), son altamente heterocigotas, sufren depresión por endogamia, y son susceptibles a una gran cantidad de patógenos. En el marco del proyecto de secuenciación del genoma de esta especie y con el fin de superar la cuestión de la heterocigocidad y generar un borrador de alta calidad, se utilizó un tipo particular de

homocigota denominado doble monoploide (DM). Los datos generados a partir de este genotipo, *S. tuberosum* grupo Phureja DM1-3 516 R44 (DM) se utilizaron para integrar las secuencias obtenidas a partir de una línea heterocigota diploide *S. tuberosum* grupo Tuberosum RH89-039-16 (RH). Estos dos genotipos representan una muestra de la diversidad genómica de la papa; DM deriva de un cultivar primitivo de América del Sur mientras que RH se parece más a la papa tetraploide cultivada comercialmente. En el mes de julio del 2011 se anunció finalmente que se había concluido el proyecto de la secuenciación del genoma de la papa, hecho que provee una nueva plataforma para el mejoramiento genético de este cultivo (<http://www.nature.com/nature/journal/v475/n7355/full/nature10158.html>).

## 3.2 Materiales y Métodos

### 3.2.1 Identificación de genes de la familia Snakin/GASA en

#### *Solanum tuberosum*

Con el fin de identificar posibles genes Snakin/ GASA no descritos hasta el momento se realizó un análisis en la base de datos del Consorcio de Secuenciación del Genoma de la Papa (PGSC, *Potato Genome Sequencing Consortium*, <http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/>) utilizando como criterio de búsqueda la anotación InterPro del dominio GASA (IPR003854; <http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR003854>).

### 3.2.2 Clonado de los genes Snakin/GASA

A partir de las secuencias genómicas obtenidas se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 3.1) y se amplificaron por PCR las secuencias completas de los genes correspondientes. Las extracciones de ADN y las reacciones de PCR se realizaron como fue descrito en el Capítulo 2 (Materiales y Métodos). Los productos amplificados fueron corridos en un gel de agarosa 1,5% y purificados mediante el kit comercial *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen). Posteriormente, los productos purificados fueron clonados en el vector comercial *pGEM-T* (Promega). La ligación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl con 1 µl de T4 ADN ligasa y 1 µl de buffer de ligasa 10X y la reacción se incubó a 16 °C durante 16 horas.

**Tabla 3.1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes Snakin/GASA en papa y evaluar sus niveles de expresión.**

<b>Gen</b>	<b>Secuencia (5' a 3')</b>
<i>PGSC0003DMG400014441</i> Up	CCAGGCTTGAAGTTTATTCAC
<i>PGSC0003DMG400014441</i> Low	GCACATCAAGGCTTTGAACC
<i>PGSC0003DMG400025759</i> Up	ACTGCGCGGGTCTATAAATG
<i>PGSC0003DMG400025759</i> Low	TGACAGTGGCAGAAAAGAAGA
<i>PGSC0003DMG400025759</i> RT Up	GGGACTTATGGAAACAAGCATC
<i>PGSC0003DMG400018474</i> Up	CTCAATATTGTTTGGAAATTTTGT
<i>PGSC0003DMG400018474</i> Low	TCACACTATCAGGTCACACC
<i>PGSC0003DMG400003642</i> Up	TGCCTTTTTTGTCTGAAAGA
<i>PGSC0003DMG400003642</i> Low	TGCATCACAAGCTTCGTACA
<i>PGSC0003DMG400009244</i> Up	GCACATTAAATGCCTTTGCC
<i>PGSC0003DMG400009244</i> Low	GCACACTTGCATACACTCATGC
<i>PGSC0003DMG400024474</i> Up	TGTTAAAGAGGAGCTGCGGT
<i>PGSC0003DMG400024474</i> Interno Low	TCTTTATGTGCTAAATGGTCTTCT
<i>PGSC0003DMG400024474</i> Interno Up	AATGTTTAGTTTATTTACTTTATG
<i>PGSC0003DMG400024474</i> Low	ACAACAGCAACTTGCACATGG
<i>PGSC0003DMG400024474</i> RT Low	TAATAGAACCCTGTGCCTTA
<i>PGSC0003DMG400029338</i> Up	AAGTTTATTTCAAGAAGTGTAGCC
<i>PGSC0003DMG400029338</i> Low	CGCATGCAATCGAGCATAAG
<i>PGSC0003DMG400015602</i> Up	GTTGGGCACTGACTTTGTTC
<i>PGSC0003DMG400015602</i> Low	CCAGCTACCAAACGACACAAC
<i>PGSC0003DMG400003641</i> Up	TCAGAGTTCTCAGCTTTCCTTCT
<i>PGSC0003DMG400003641</i> Low	TCAAGAGCTGACATAGTACACAACA
<i>PGSC0003DMG400001227</i> Up	ATTTTCTTCTTCATCTTCACAAAT
<i>PGSC0003DMG400001227</i> Interno Low	ATTCTCAATAGAGATGTTACATTG
<i>PGSC0003DMG400001227</i> Interno Up	TCAAGTATTGTTTATGTGATTAG
<i>PGSC0003DMG400001227</i> Low	AACCTCTTTTTCTCCTCGT
<i>PGSC0003DMG400001226</i> Up	AGTGGATTCATAGCAATCAT
<i>PGSC0003DMG400001226</i> Low	TCAAGAAGATCAAATAAAGTAAAT
<i>PGSC0003DMG400033044</i> Up	AATTGTTGCCTTTTTGGCCCT
<i>PGSC0003DMG400033044</i> Low	CCACTTGGGTAGATAAAAGTGCAA
<i>PGSC0003DMG400007621</i> Up	TCATTTCTCTCTTTTGTTC
<i>PGSC0003DMG400007621</i> Low	ACATAAAAATTCTTTTCACCG
<i>PGSC0003DMG400007621</i> RT Low	TTAGGAGGTTGTGGCTGAGG
<i>PGSC0003DMG401019533</i> Up	TTCTGTGAAGCAAATCAGCA
<i>PGSC0003DMG401019533</i> Low	CAGCTCTCATATCGGGCAAT
<i>SN1 5'UTR</i>	CACTTCATCAAATTTTCAGCTTAG
<i>SN1/77</i>	CCAGCCATGGTAGTTTGAATGAG

<i>Eflα</i> Up	ATTGGAAACGGATATGCTCCA
<i>Eflα</i> Low	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA
<i>Actina</i> Up	TGGCATCATACCTTTTACAA
<i>Actina</i> Low	TCCGGGCATCTGAACCTCT
<i>SN2</i> RT Up	GGCATGTGGAAGCTTGTGTG
<i>SN2</i> RT Low	AGGGCATTTACGTTTGTTC
<i>SN3</i> Up	ATGGCAAAGAGTGGTCACAATGC
<i>SN3</i> Low	TTAAGGGCATTTAGGTTTTCC
<i>SN3</i> RT Up	GCAAAGAGTGGTCACAATGC
<i>SN3</i> RT Low	GGGCGGAGCTTGTGTGAA

### 3.2.2.1 Transformación de bacterias *E.coli* competentes

Se mezclaron 3 µl de reacción de ligación con 50 µl de células bacterianas competentes (DH5α) descongeladas en hielo, se homogeneizaron suavemente y se dejaron 30 minutos en hielo. Las bacterias se colocaron en un baño de agua a 42° C durante 1 minuto 30 segundos y luego se mantuvieron en hielo durante 2 minutos. Se agregó 1 ml de medio LB [bactotripton (DIFCO Laboratories) (10 g/l), extracto de levadura (5 g/l), NaCl (10 g/l), pH 7] sin antibióticos y se incubó a 37° C con agitación suave durante 45 minutos. Se centrifugaron 5 minutos a 4000 rpm, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en el medio remanente. Finalmente, alícuotas de 200 µl se sembraron en placas que contenían 15 ml de LB-agar suplementado con ampicilina y en presencia de X-gal e Isopropil-β-tiogalactopiranosido (IPTG). Las placas fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. Los clones recombinantes se seleccionaron por actividad de β-galactosidasa y se picaron colonias blancas en medio LB suplementado con ampicilina. Los cultivos se crecieron a 37°C con agitación durante toda la noche.

### 3.2.2.2 Aislamiento de ADN plasmídico y confirmación de los clones

Para las preparaciones de ADN plasmídico, se centrifugó el cultivo bacteriano a 8000 rpm durante 5 minutos y se resuspendió el precipitado en 100 µl de solución I [TEG: Glucosa (50 mM), EDTA (10 mM), Tris-HCl (25 mM, pH 8)]. Se agregaron 200 µl de solución II [NaOH (0,2 M), SDS 1%] para producir la lisis celular. Se mezcló suavemente por inversión y se dejó 5 minutos en hielo. Luego se agregaron 150 µl de solución III fría (acetato de potasio 3 M), se mezcló por inversión y se dejó en hielo 5 minutos. Se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos a 4° C. Se transfirió el sobrenadante obtenido a un nuevo tubo (aproximadamente 450 µl) y se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol para precipitar el ADN plasmídico. Se centrifugó a 12000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó el precipitado con 300 µl de etanol 70%, se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos. Se secó el precipitado durante 30 minutos y se resuspendió en 50 µl de H<sub>2</sub>O.

El ADN plasmídico obtenido fue analizado por medio de restricciones con la enzima *EcoRI* (Volumen final 20 µl: templado 1,5 µl, buffer (10X) 2 µl, *EcoRI* 1 µl, BSA (10X) 2 µl, ARNasa 0.6 µl; 2 horas a 37°C) para confirmar la presencia del inserto. El ADN de los clones utilizados para la secuenciación se purificó mediante columnas de *Qiaprep Spin Plasmid* (Qiagen) siguiendo las especificaciones de los fabricantes.

### 3.2.2.3 Secuenciación y análisis de las secuencias

Los plásmidos se secuenciaron en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología, INTA Castelar, a partir de los oligonucleótidos específicos T7 y SP6. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el programa *Bioedit* y los alineamientos múltiples fueron realizados por medio del *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Los datos de la

localización cromosómica de los genes Snakin/GASA y las estructuras génicas fueron obtenidas a partir de la información disponible en la base de datos del Consorcio de Secuenciación del Genoma de Papa y por comparación de las secuencias depositadas de los transcriptos y las secuencias genómicas correspondientes amplificadas y secuenciadas en este trabajo.

Los árboles filogenéticos fueron construidos a través del método de *Neighbor-Joining*, con 1000 réplicas *bootstrap*, de acuerdo al programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA)* versión 5.0 (<http://www.megasoftware.net/mega.html>).

### 3.2.3 Análisis de las putativas regiones promotoras de los genes

#### Snakin/GASA

Con el objetivo de identificar elementos regulatorios en las secuencias promotoras de los genes Snakin/GASA, se obtuvieron 2000 pb correspondientes a la secuencia genómica río arriba del codón de iniciación de la traducción a partir de la base de datos del PGSC. En el caso de *Snakin-2* (*PGSC0003DMG400001598*) solo se consideraron en este análisis 1500 pb ante la falta de secuencias de mayor longitud. Se utilizó el sitio *PlantCARE* (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) para la búsqueda e identificación de posibles elementos regulatorios en *cis*.

### 3.2.4 Análisis de la regulación de la expresión génica

Las extracciones de ARN, los ensayos de *Northern blot*, la síntesis de ADNc y las reacciones de RT-qPCR se realizaron como se describió en el Capítulo 2 (Materiales y Métodos).

#### 3.2.4.1 Expresión de genes Snakin/GASA en distintos tejidos

Plantas de *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* cv. Kennebec micropropagadas *in vitro* fueron pasadas a macetas y crecidas en invernáculo bajo condiciones controladas de humedad y temperatura. Luego de 6 semanas se tomaron muestras de los distintos tejidos; en el caso de las muestras de flores y de tubérculos la edad de las plantas fue mayor (aproximadamente de unos 2 meses).

#### 3.2.4.2 Tratamiento con hormonas vegetales en papa

Plantas de *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* cv. Kennebec micropropagadas *in vitro* fueron pasadas a macetas y crecidas en invernáculo bajo condiciones controladas de humedad y temperatura. Las plantas fueron rociadas con una solución de GA (100  $\mu$ M), ABA (100  $\mu$ M) o agua (en el caso de los controles) y dejadas en las mismas condiciones de luz y temperatura en que estaban creciendo y se tomaron muestras a distintos tiempos.

#### 3.2.4.3 Ensayos de infección con patógenos

Las cepas bacterianas de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* fueron cultivadas en medio King's B (peptona g/l, sulfato de magnesio 1,5 g/l, fosfato de potasio 1,5 g/l, agar 15 g/l, pH=7,2) conteniendo 25 mg/l<sup>-1</sup> de rifampicina y 2 mg/l<sup>-1</sup> de tetraciclina, a 28°C y agitación (200 rpm) por 24 horas y posteriormente se centrifugaron 5 minutos a 4000 rpm. Los sedimentos bacterianos se resuspendieron en MgCl<sub>2</sub> 10 mM y se ajustó la concentración a 10<sup>8</sup> cfu/ml<sup>-1</sup>. Para los ensayos, Se inocularon hojas completamente expandidas de plantas de papa de 6 semanas de edad con una solución de bacterias utilizando jeringas hipodérmicas sin aguja. Los controles fueron inoculados con MgCl<sub>2</sub> 10 mM sin bacterias. Se tomaron muestras de las hojas inoculadas luego de 6 y 24 horas de la infiltración.

En el ensayo con *Rhizoctonia solani*, el hongo fue crecido en placas de *Potato Dextrose Agar* (PDA, *Gibco*). Se crecieron plantas *in vitro* en cajas magentas durante 4 semanas (4 plantas por cada caja) y se inoculó en el centro de cada caja con un bloque de PDA conteniendo micelio de *Rhizoctonia*. Se tomaron muestras de planta entera luego de 7, 10 y 12 días de la inoculación. Cada muestra correspondió a un pool de 3 plantas tomadas a partir de una caja magenta diferente.

## 3.3 Resultados

### 3.3.1 Identificación de nuevos genes Snakin/GASA en *Solanum tuberosum*

Teniendo en cuenta la disponibilidad del genoma secuenciado de la papa, nos planteamos como un nuevo objetivo en el marco de esta tesis, la identificación de posibles nuevos genes Snakin/GASA. Para ello se hizo un análisis en la base de datos del Consorcio de Secuenciación del Genoma de la Papa utilizando como criterio de búsqueda la anotación InterPro del dominio GASA característico de estas proteínas (IPR003854). Esto se debe a que la homología entre los genes Snakin/GASA es baja ya que en realidad la familia está definida por la presencia del dominio GASA en sus proteínas.

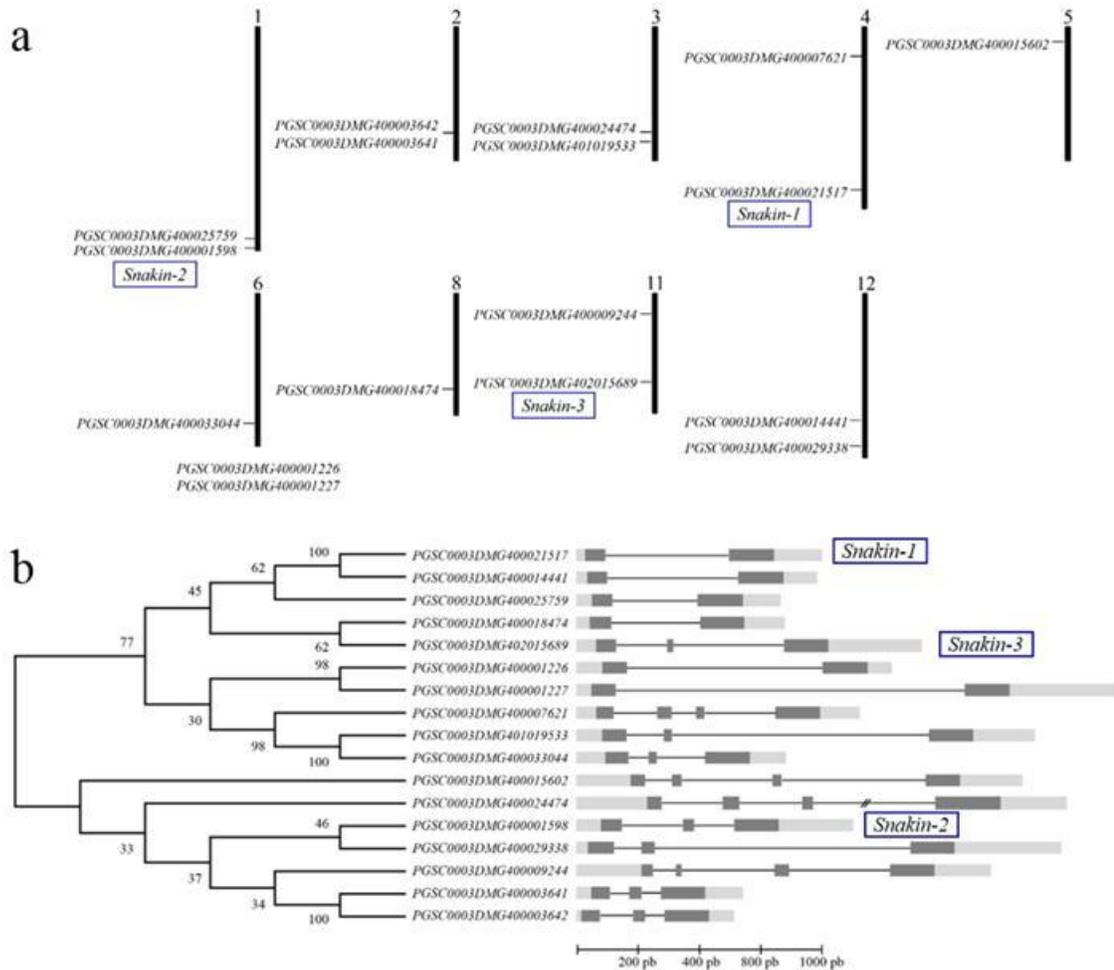
Como resultado de este análisis pudimos identificar 14 nuevos miembros de la familia Snakin/GASA que se suman a los tres genes previamente reportados (*SN1*, *SN2* y *SN3*; Segura y col. 1999, Berrocal-Lobo y col. 2002) sugiriendo que en papa esta familia consiste en al menos 17 miembros. Estos genes fueron enumerados siguiendo la nomenclatura establecida en la base de datos del genoma de papa. Las siglas de este código corresponden a: *Potato Genome Sequencing Consortium (PGSC)*, el 0003 porque es la tercera versión de ensamblado del genoma, DM es la variedad del cultivo doble monoploide utilizada y G, T o P corresponde a gen, transcripto o proteína, respectivamente.

El estudio de la localización cromosómica de los genes Snakin/GASA reveló que todos ellos corresponden a diferentes *loci* en el genoma y se encuentran distribuidos en 9 de los 12 cromosomas de papa (Tabla 3.2, Figura 3.1 a). Con la información de las secuencias y

utilizando el método de *Neighbor-Joining*, se elaboró un árbol con el fin de visualizar las relaciones de similitud existentes entre estos genes. La longitud de la secuencia codificante de los genes Snakin/GASA se encuentra entre 472 pb (*PGSC0003DMG400003641*) y 2584 pb (*PGSC0003DMG400024474*). La comparación de la secuencia depositada de los transcritos con su correspondiente secuencia genómica mostró que las secuencias codificantes de los genes Snakin/GASA se encuentran interrumpidas por 1 a 3 intrones (Figura 3.1 b), siendo el patrón estructural (exones-intrones) diferente aún dentro de un mismo subgrupo filogenético.

**Tabla 3.2. Miembros de la familia de genes Snakin/GASA en papa.**

Nombre (Potato Genome Sequencing Consortium)	Gen Transcripto Proteína	Posición	Cromosoma	Proteína (aa)	Péptido señal (aa)
<b>Snakin-1</b>	<i>Snakin-1</i> PGSC0003DMG400021517 PGSC0003DMT400055426 PGSC0003DMP400037307	chr04:59491029..59492034	4	88	25
<b>GAST1 protein</b>	PGSC0003DMG400014441 PGSC0003DMT400037423 PGSC0003DMP400025440	chr12:46969002..46969986	12	88	25
<b>GAST1 protein</b>	PGSC0003DMG400025759 PGSC0003DMT400066182 PGSC0003DMP400044609	chr01:76746849..76747684	1	89	26
<b>GAST1 protein</b>	PGSC0003DMG400018474 PGSC0003DMT400047535 PGSC0003DMP400032186	chr08:3467061..3467910	8	89	18
<b>Snakin-2</b>	<i>Snakin-2</i> PGSC0003DMG400001598 PGSC0003DMT400004046 PGSC0003DMP400002893	chr01:80055736..80056866	1	104	23
<b>Gast1</b>	PGSC0003DMG400003642 PGSC0003DMT400009368 PGSC0003DMP400006510	chr02:38622526..38623218	2	102	23
<b>Gibberellin-regulated protein 1</b>	PGSC0003DMG400009244 PGSC0003DMT400023914 PGSC0003DMP400016314	chr11:8267776..8269476	11	103	22
<b>Gonadotropin beta chain</b>	PGSC0003DMG400024474 PGSC0003DMT400062877 PGSC0003DMP400042322	chr03:39532682..39535828	3	143	18
<b>GAST</b>	PGSC0003DMG400029338 PGSC0003DMT400075426 PGSC0003DMP400051082	chr12:55030963..55032946	12	113	24
<b>Gibberellin-regulated protein 3</b>	PGSC0003DMG400015602 PGSC0003DMT400040298 PGSC0003DMP400027335	chr05:6793163..6794986	5	90	22
<b>Gast1</b>	PGSC0003DMG400003641 PGSC0003DMT400009367 PGSC0003DMP400006509	chr02:38628014..38628701	2	103	23
<b>Protein RSI-1</b>	<i>Snakin-3</i> PGSC0003DMG402015689 PGSC0003DMT400040585 PGSC0003DMP400027523	chr11:3324145..3325559	11	96	29
<b>Gibberellin regulated protein</b>	PGSC0003DMG400001227 PGSC0003DMT400003089 PGSC0003DMP400002225	PGSC0003DMB000000967: 24516..26736	6	94	19
<b>Gibberellin-regulated family protein</b>	PGSC0003DMG400001226 PGSC0003DMT400003087 PGSC0003DMP400002223	PGSC0003DMB000000967: 17046..18340	6	94	19
<b>Gip1</b>	PGSC0003DMG400033044 PGSC0003DMT400083077 PGSC0003DMP400055795	chr06:46584532..46585393	6	103	24
<b>GASA2</b>	PGSC0003DMG400007621 PGSC0003DMT400019726 PGSC0003DMP400013485	chr04:14299743..14300907	4	114	24
<b>Gip1</b>	PGSC0003DMG401019533 PGSC0003DMT400050285 PGSC0003DMP400033943	chr03:41635257..41637138	3	104	24



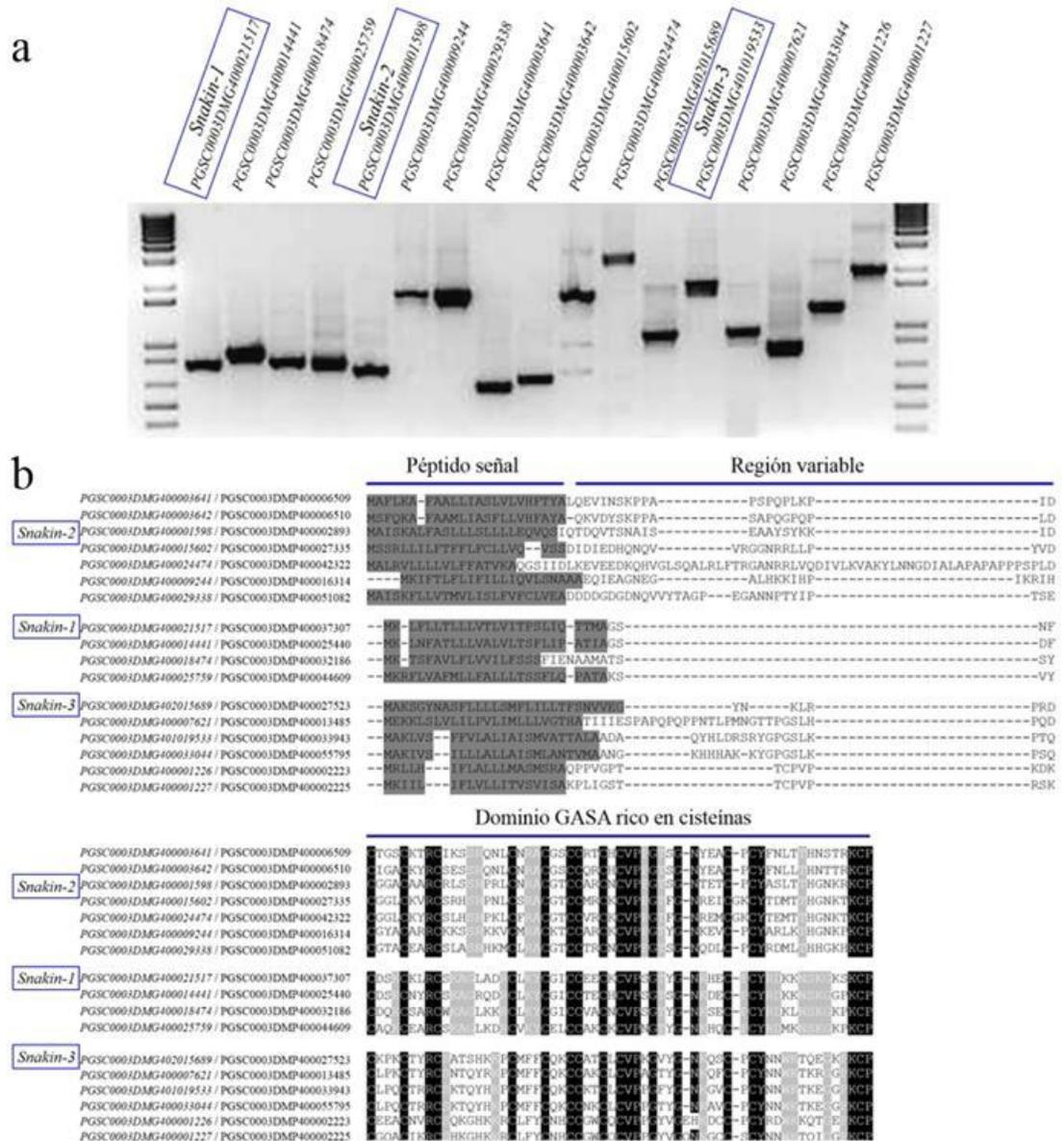
**Figura 3.1. Genes Snakin/GASA en papa.** (a) Localización cromosómica de los genes Snakin/GASA. (b) Árbol filogenético de los genes Snakin/GASA de papa construido mediante el método de *Neighbor-Joining* luego de alinear las secuencias con el programa *ClustalW*. La parte de la derecha ilustra la estructura exón-intrón de cada gen. Los exones e intrones están representados por barras y líneas en color gris oscuro, respectivamente.

Con el objetivo de confirmar la presencia de los genes identificados en la variedad comercial de papa *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* cv. Kennebec las secuencias genómicas de cada uno de los genes fueron utilizadas para diseñar oligonucleótidos específicos. Así, las secuencias completas de cada gen fueron amplificadas por PCR obteniéndose para cada uno de ellos un producto de amplificación utilizando como templado ADN de la variedad Kennebec (Figura 3.2 a). Estos productos fueron clonados en vectores comerciales y

secuenciados. Este análisis reveló que las secuencias genómicas de tres genes estaban incorrectamente anotadas (*PGSC0003DMG400003641*, *PGSC0003DMG400003642* y *PGSC0003DMG400015602*). En el caso de *PGSC0003DMG400003641* y *PGSC0003DMG400003642* las secuencias depositadas no se correspondían con el transcritto en cuestión. Con respecto a *PGSC0003DMG400015602*, la proteína predicha a partir de la secuencia depositada correspondía a un producto génico de 90 aminoácidos; sin embargo, la secuenciación de este gen mostró que un cambio de base en la secuencia anotada generaba un codón de terminación prematuro y que en realidad la proteína predicha sería de 106 aminoácidos.

El análisis de las secuencias de las 17 proteínas Snakin/GASA de papa permitió identificar en todas ellas, los tres dominios característicos de esta familia: (1) un péptido señal putativo (de 24 a 43 aminoácidos en el extremo amino-terminal, que de acuerdo al programa *SignalP.v4.0*, consiste en una secuencia señal clivable característica de proteínas secretadas a la matriz extracelular); (2) una región variable tanto en composición como en número de aminoácidos (oscila entre 62 residuos en *PGSC0003DMG400024474* / *PGSC0003DMP400042322* a sólo 4 en el caso de *PGSC0003DMG400021517* / *PGSC0003DMP400037307*, *PGSC0003DMG400014441*/ *PGSC0003DMP400025440* y *PGSC0003DMG400025759* / *PGSC0003DMP400044609*); y (3) una región de aproximadamente 60 aminoácidos en el extremo carboxi-terminal dentro del cual hay unos 20 aminoácidos, incluyendo las 12 cisteínas, en posiciones perfectamente conservadas. El alineamiento múltiple de estas secuencias ilustra la conservación de este dominio (Figura 3.2 b). El tamaño de las proteínas varía desde 88 (*PGSC0003DMG400021517*

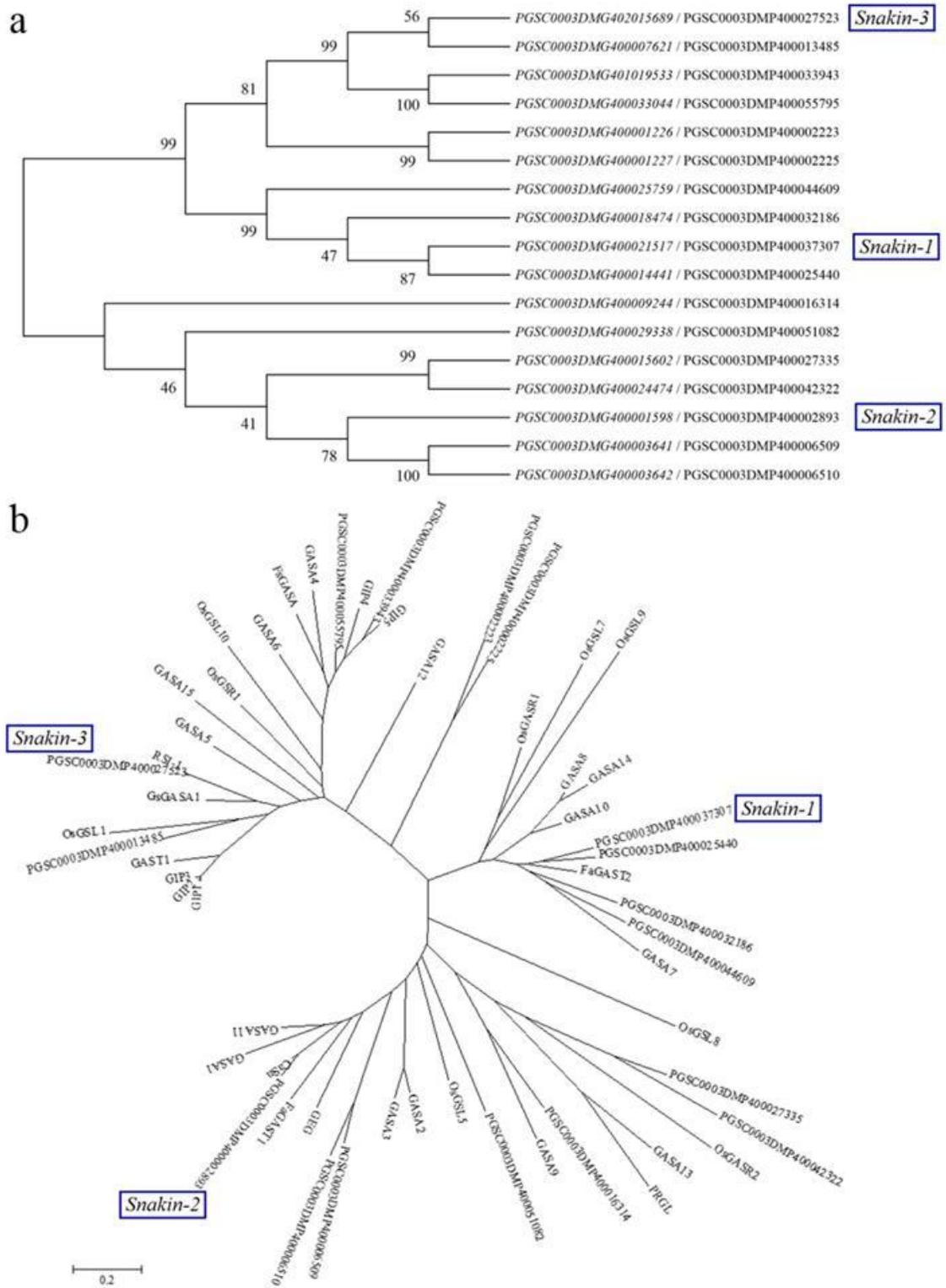
/PGSC0003DMG400037307 y PGSC0003DMG400014441/PGSC0003DMP400025440) a 143 aminoácidos (PGSC0003DMG400024474 / PGSC0003DMP400042322).



**Figura 3.2. Familia Snakin/GASA en papa.** (a) Amplificación por PCR de los 17 genes Snakin/GASA a partir de ADN genómico de *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* cv. Kennebec. (b) Alineamiento múltiple de las secuencias de las proteínas Snakin/GASA mediante el programa *ClustalW*. Los aminoácidos conservados en todos los miembros de la familia están resaltados en negro y los residuos altamente conservados que son relevantes para la clasificación de las subfamilias están marcados en gris claro. El péptido señal putativo de acuerdo al programa *SignalP.v4.0* se encuentra resaltado en gris oscuro.

### 3.3.2 Análisis filogenético de las proteínas Snakin/GASA

Con el objetivo de estudiar las relaciones evolutivas existentes entre las proteínas Snakin/GASA de papa, las secuencias completas de aminoácidos fueron utilizadas para construir un árbol filogenético. Las 17 proteínas se agruparon en tres subfamilias (I–III) como fue propuesto previamente por Berrocal-Lobo y col. (2002) (Figura 3.3 a). El alineamiento de las secuencias aminoacídicas y la construcción de un árbol filogenético incluyendo proteínas Snakin/GASA identificadas en otras especies también resultó en tres grandes grupos, consistente con estudios previos (Zimmerman y col. 2010) (Figura 3.3 b).



**Figura 3.3. Análisis filogenético de las proteínas Snakin/GASA.** (a) Árbol filogenético de las proteínas Snakin/GASA de papa construido mediante el método de *Neighbor-joining* luego de

alinearse las secuencias con el programa *ClustalW*. (b). Árbol filogenético construido a partir del alineamiento múltiple de secuencias de las proteínas Snakin/GASA identificadas en diferentes especies de plantas. SN1 (ABQ42622, Segura y col. 1999); SN2 (Q93X17, Berrocal Lobo y col. 2002); GEG (CAB45241, Kotilainen y col. 1999); GAST1 (XP\_004232126, Shi y col. 1992); RSI-1 (NP\_001234666, Taylor y Scheuring 1994); GIP1 (CAA60677), GIP2 (AAG43509), GIP3 (CAD10104), GIP4 (CAD10105), GIP5 (CAD10106) (Ben Nissan y Weiss 1996, Ben Nissan y col. 2004); FaGAST1 (AAB97006, de la Fuente y col. 2006); FaGAST2 (XP\_004290947, Moyano-Cañete 2013); FsGASA (CAJ77893, Alonso Ramirez y col. 2009); GsGASA1 (ADX36135, Li y col. 2011); CaSn (ACC91329, Mao y col. 2011); OsGSR1 (AAT42201, Wang y col. 2009); OsGASR1 (NP\_001051348), OsGASR2 (NP\_001053024) (Furukawa y col. 2006) ; OsGSL1 (NP\_001055385), OsGSL5 (NP\_001055630), OsGSL7 (NP\_001050637), OsGSL8 (NP\_001058649), OsGSL9 (EAZ40506), OsGSL10 (NP\_001063170) (Zimmerman y col. 2010); GASA1 (AAM96972), GASA2 (NP\_192699), GASA3 (NP\_192698), GASA4 (NP\_197027) (Herzog y col. 1995); GASA5 (NP\_566186), GASA6 (NP\_177605), GASA7 (NP\_179096), GASA8 (NP\_181486), GASA9 (NP\_173683), GASA10 (NP\_568914), GASA11 (NP\_179433), GASA12 (NP\_180639), GASA13 (NP\_196996), GASA14 (NP\_001077504), GASA15 (NP\_001078130) (Zhang y col. 2008), PRGL (AAS48461, Peng y col. 2008).

### 3.3.3 Análisis de las regiones promotoras de los genes Snakin/GASA

Con el objetivo de identificar la presencia de elementos regulatorios en *cis*, se obtuvieron las putativas secuencias promotoras (2-kb río arriba del codón de iniciación de la traducción, ATG) de cada uno de los genes Snakin/GASA a partir de la información disponible en la base de datos del consorcio de secuenciación del genoma de la papa y se analizaron mediante la base *Plant cis-acting Regulatory DNA Elements (PlantCARE*; Lescot y col. 2002). Se ha demostrado que la expresión de la mayoría de estos genes Snakin/GASA está regulada por hormonas y factores externos. En concordancia con esto, los estudios *in silico* de las putativas secuencias promotoras de estos genes en papa permitieron identificar numerosos elementos regulatorios, siendo los de mayor interés aquellos relacionados de respuesta a estrés y a distintas hormonas (Tabla 3.3).

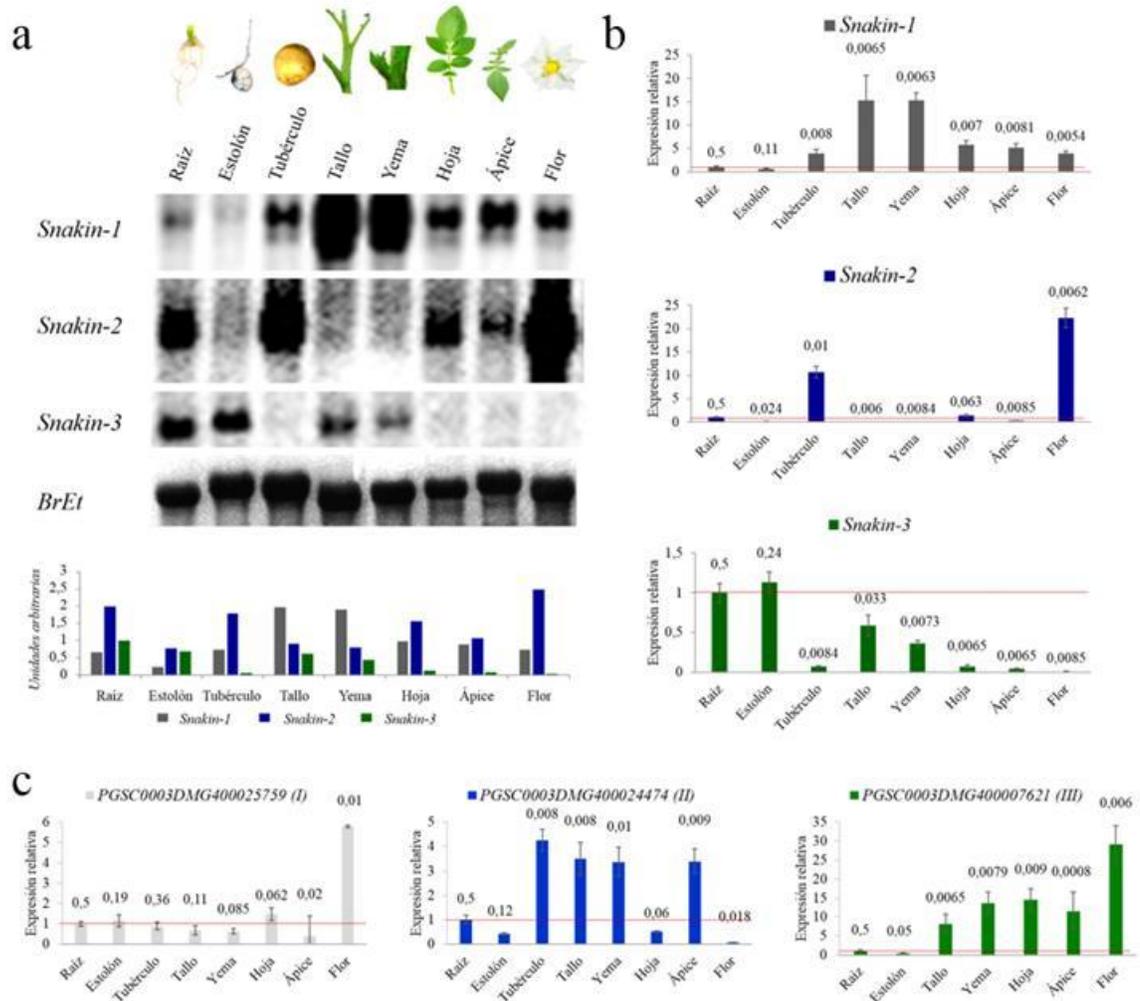


### 3.3.4 Regulación de la expresión de los genes Snakin/GASA

Dado que el rol que desempeñan los genes Snakin/GASA en la planta no se conoce completamente, el estudio de los patrones de expresión temporal y espacial puede aportar evidencias acerca de sus funciones. En estudios previos se ha demostrado que su expresión es altamente específica y que en algunos casos hay solapamiento, sugiriendo que estos genes podrían cumplir funciones diversas y redundantes en el desarrollo.

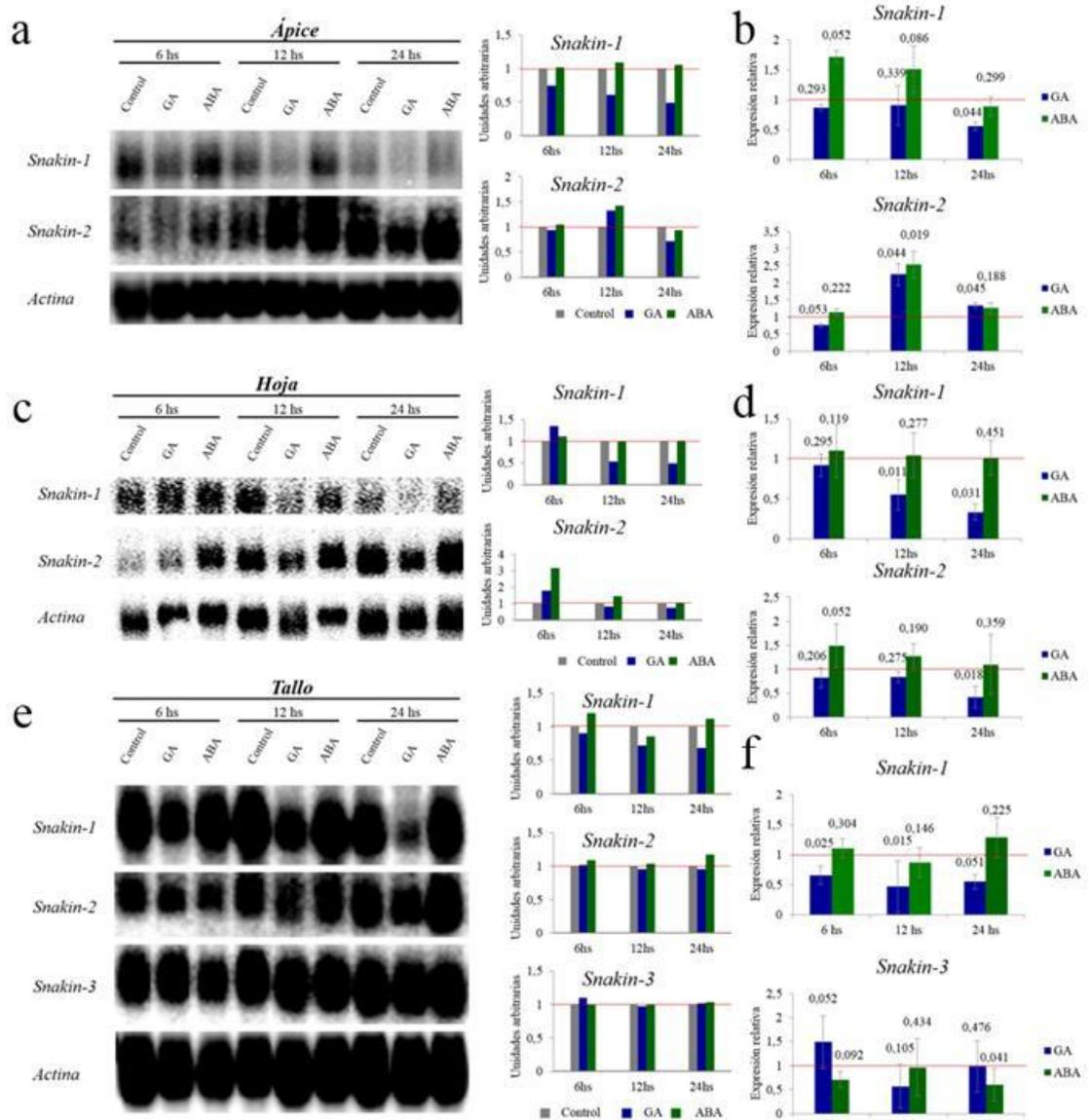
Con el fin de profundizar el estudio de los genes Snakin/GASA en papa, analizamos la expresión en diferentes órganos de la planta de un miembro de cada subfamilia (*SN1*, *SN2* y *SN3*) mediante *Northern blot*. Si bien en trabajos previos se había demostrado que *SN1* y *SN2* tienen distintos patrones de expresión (Segura y col. 1999, Berrocal-Lobo y col. 2002), estos análisis fueron realizados con genotipos de papa diferentes al que nosotros estudiamos (*Solanum tuberosum* cv. Desiree para *SN1* y *Solanum tuberosum* cv Jaerl para *SN2*) por lo que decidimos confirmar sus niveles de expresión en nuestro sistema y ampliar el análisis a *SN3* (no caracterizado hasta el momento). Estos análisis revelaron un patrón de expresión específico de tejido para cada gen y también ciertas discrepancias con respecto a los datos publicados previamente para *SN1* y *SN2*. Se encontró que la expresión de *SN1* es particularmente alta en yemas axilares y tallos y no se detectó expresión en estolones; en contraste con Segura y col (1999) los análisis de *Northern blot* y RT-qPCR mostraron que *SN1* también se expresa en hojas. A diferencia de *SN1*, la expresión de *SN2* es alta en tubérculos y flores, así como también en raíces y hojas (aunque en menor medida). Finalmente, se observó que *SN3* se expresa en raíces, estolones, tallos y yemas axilares mientras que no se detectó expresión en los otros tejidos analizados (Figura 3.4 a). Los resultados obtenidos fueron confirmados mediante RT-qPCR (Figura 3.4 b). En este caso,

como se trata de un análisis relativo, los datos de expresión de cada gen en cada tejido fueron relativizados a los de raíz, una vez que fueron normalizados utilizando el *Ef1 $\alpha$*  como gen de referencia. Asimismo, se evaluó la expresión espacial mediante RT-qPCR de otro miembro de cada subfamilia (elegidos al azar) *PGSC0003DMG400025759* (I), *PGSC0003DMG400024474* (II) y *PGSC0003DMG400007621* (III). Los resultados indican que *PGSC0003DMG400025759* (I) se expresa preferentemente en flor, *PGSC0003DMG400024474* (II) en tubérculo, tallo, yema y ápice; mientras que *PGSC0003DMG400007621* (III) fue detectado principalmente en flor, ápice, hoja, yema y tallo (Figura 3.4 c).



**Figura 3.4. Análisis de expresión de genes Snakin/GASA en distintos tejidos.** (a) *Northern blot* realizado a partir 12 µg de ARN extraído de distintos tejidos de plantas de papa (*S. tuberosum* subsp. *tuberosum* cv. Kennebec) de 8 semanas de edad crecidas en invernáculo en condiciones controladas de humedad y temperatura. Como control de siembra se muestra el ARN total teñido con bromuro de etidio (BrEt). En la parte inferior se muestran las cuantificaciones *SN1*, *SN2* y *SN3* realizadas con las imágenes de las membranas adquiridas con el *Thyphoon* y analizadas con el programa *ImageJ*. Los valores fueron relativizados a la carga de RNA total en cada calle (BrEt). (b) Análisis de la expresión relativa de *SN1*, *SN2* y *SN3* en distintos tejidos mediante RT-qPCR. Se utilizó el factor de elongación *Eflα* como gen de referencia. Los valores de expresión de cada tejido fueron relativizados a los de raíz. (c) Análisis de la expresión relativa de los genes *PGSC0003DMG400025759* (I), *PGSC0003DMG400024474* (II) y *PGSC0003DMG400007621* (III) en distintos tejidos mediante RT-qPCR. Entre paréntesis se indica la subfamilia correspondiente. Se utilizó el factor de elongación *Eflα* como gen de referencia. Los valores de expresión de cada tejido fueron relativizados a los de raíz.

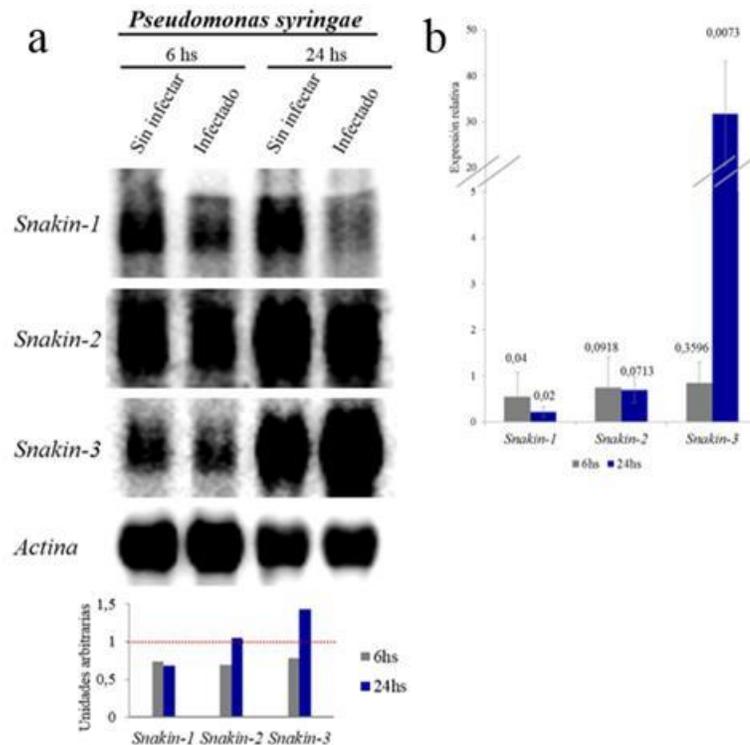
Se ha demostrado que la mayoría de los genes Snakin/GASA están regulados por hormonas. Con el objetivo de profundizar el estudio de los mismos, analizamos el efecto del tratamiento con GA o ABA en la expresión de algunos genes Snakin/GASA. Como resultado encontramos que la expresión de *SN1* es regulada negativamente por GA y no se vería afectada por ABA en los tejidos analizados. Por otro lado, vimos que la expresión de *SN2* en ápice es incrementada a las 12 horas luego del tratamiento con ABA; en hoja disminuye con GA a las 24 horas y no cambiaría con ABA; asimismo, en tallo es inducida por ABA luego de 24 horas mientras que disminuye con GA. Finalmente, la expresión *SN3* no se vio afectada por estos tratamientos al menos en los tejidos y en las condiciones ensayadas (Figura 3.5).



**Figura 3.5. Regulación de la expresión de genes Snakin/GASA por GA y ABA.** (a, c y e) *Northern blot* realizado a partir 10  $\mu$ g de ARN extraído de muestras de (a) ápice, (c) hoja y (e) tallo de plantas de papa (*S. tuberosum* subsp. *tuberosum* cv. Kennebec) de 8 semanas de edad crecidas en invernáculo. Como control se hibridó con una sonda correspondiente al gen de *Actina*. En la parte de la derecha de cada figura se muestran las cuantificaciones de *SN1*, *SN2* y *SN3* realizadas con las imágenes de las membranas adquiridas con el *Thyphoon* y analizadas con el programa *ImageJ*. Los valores de cada calle fueron relativizados a la banda del gen de referencia y al control correspondiente para cada tiempo (al cual se le asignó un valor arbitrario de 1 luego de relativizarlo a la *Actina*). (b, d y f) Análisis de la expresión relativa de *SN1*, *SN2* y *SN3* en muestras de (a) ápice,

(c) hoja y (e) tallo ápice mediante RT-qPCR. Se utilizó el factor de elongación *Efla* como gen de referencia.

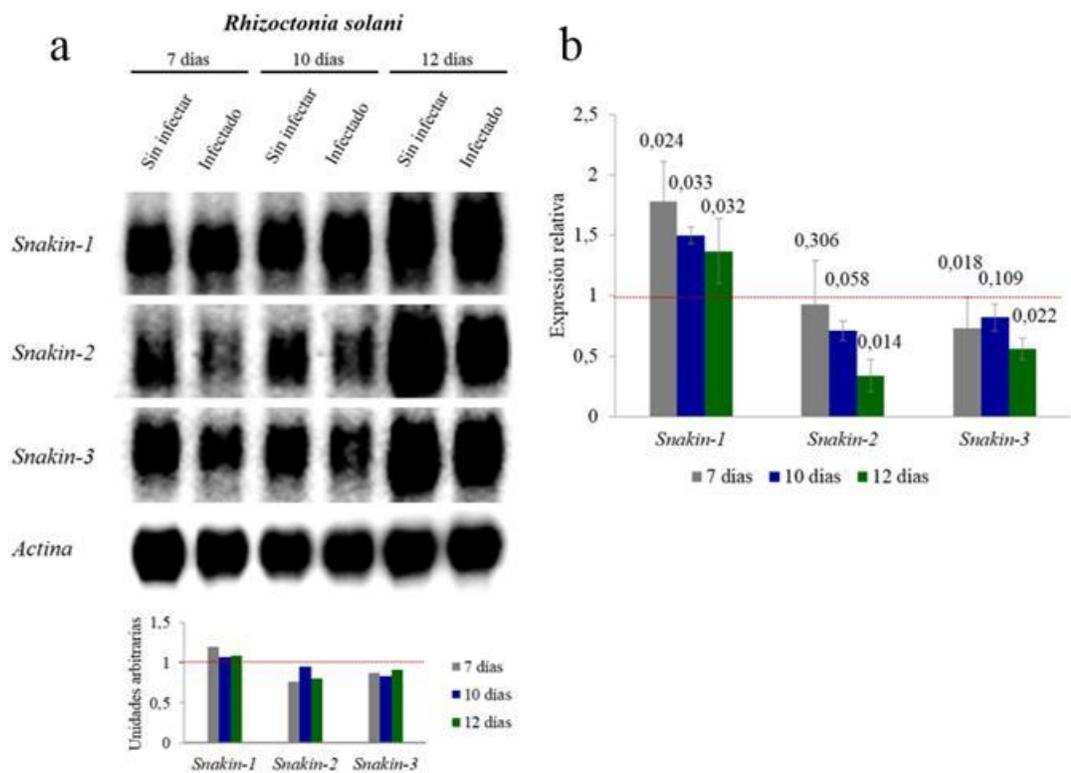
Teniendo en cuenta que los dos miembros de la familia Snakin/GASA en papa caracterizados hasta el momento fueron involucrados en la defensa de la planta y las observaciones que indican que la expresión de algunos de estos genes está modulada por factores bióticos, también una infección con patógenos bacterianos o fúngicos es capaz de regular la expresión de *SN1*, *SN2* y *SN3*. Los análisis de *Northern blot* mostraron que la expresión de *SN1* es regulada negativamente y la de *SN2* no se ve afectada por la inoculación con la bacteria *P. syringae* pv. *tabaci*, mientras que *SN3* es inducido 24 horas post-infección (Figura 3.6 a). Los resultados obtenidos fueron confirmados mediante RT-qPCR (Figura 3.6 b).



**Figura 3.6. Regulación de la expresión de genes Snakin/GASA por la bacteria *P. syringae*.** (a) *Northern blot* realizado a partir 10 µg de ARN extraído de hojas de plantas de papa (*S. tuberosum* subsp. *tuberosum* cv. Kennebec) de 5 semanas de edad crecidas en invernáculo en condiciones

controladas de humedad y temperatura e inoculadas con la bacteria *P. syringae* pv. *tabaci*. Como control se hibridó con una sonda correspondiente al gen de *Actina*. En la parte inferior se muestran las cuantificaciones de *SN1*, *SN2* y *SN3* realizadas con las imágenes de las membranas adquiridas con el *Thyphoon* y analizadas con el programa *ImageJ*. Los valores de cada calle fueron relativizados a la banda del gen de referencia y al control correspondiente para cada tiempo (al cual se le asignó un valor arbitrario de 1 luego de relativizarlo a la *Actina*). (b) Análisis de la expresión relativa de *SN1*, *SN2* y *SN3* en hojas infectadas con *P. syringae* mediante RT-qPCR. Se utilizó el factor de elongación *Efla* como gen de referencia.

Por otro lado, la infección con *Rhizoctonia solani* incrementó los niveles de expresión de *SN1* mientras que para *SN2* y *SN3* el efecto fue opuesto (Figura 3.7 a). Los resultados obtenidos fueron confirmados mediante RT-qPCR (Figura 3.7 b).



**Figura 3.7. Regulación de la expresión de genes Snakin/GASA por el hongo *Rhizoctonia solani*.** (a) *Northern blot* realizado a partir de 10 µg de ARN extraído a partir de plantas de papa (*S. tuberosum* subsp. *tuberosum* cv. Kennebec) crecidas *in vitro* e inoculadas con el hongo *Rhizoctonia solani*. Como control se hibridó con una sonda correspondiente al gen de *Actina*. En la parte inferior se muestran las cuantificaciones de *SN1*, *SN2* y *SN3* realizadas con las imágenes de las membranas

adquiridas con el *Thyphoon* y analizadas con el programa *ImageJ*. Los valores de cada calle fueron relativizados a la banda del gen de referencia y al control correspondiente para cada tiempo (al cual se le asignó un valor arbitrario de 1 luego de relativizarlo a la *Actina*). (b) Análisis de la expresión relativa de *SN1*, *SN2* y *SN3* en plantas infectadas con *R. solani* mediante RT-qPCR. Se utilizó el factor de elongación *Efl $\alpha$*  como gen de referencia.

### 3.4 Discusión

La reciente publicación del genoma de papa por el Consorcio de Secuenciación del genoma de la papa constituye una herramienta muy importante en el estudio de esta especie. En este contexto, la información disponible nos permitió identificar 14 nuevos miembros Snakin/GASA indicando que en papa existen al menos 17 genes de esta familia. El primer gen Snakin/GASA descrito fue *GAST1* en tomate (Shi y col. 1992) y a partir de ese momento, se han caracterizado varios miembros de esta familia en un amplio rango de especies, tanto mono como dicotiledóneas. Si bien para la mayoría de las especies estudiadas se han reportado pocos genes Snakin/GASA, últimamente se ha demostrado en algunos casos que en realidad este número es mayor. En este sentido, entre las especies donde se han identificado la mayor cantidad de genes Snakin/GASA hasta el momento se encuentran *Arabidopsis*, maíz y arroz con 15, 9 y 10 genes respectivamente (Zhang y col. 2008, Zimmermann y col. 2010). La identificación de genes Snakin/GASA en especies poco relacionadas refleja la importancia de estas proteínas y sugiere que sus funciones serían esenciales en la planta.

El estudio de la localización cromosómica de los genes Snakin/GASA reveló que todos ellos corresponden a diferentes *loci* en el genoma y se encuentran distribuidos en 9 de los 12 cromosomas de papa. La longitud de los genes es bastante variable y las secuencias codificantes se encuentran interrumpidas por 1 a 3 intrones. El análisis comparativo de las mismas reveló porcentajes de similitud a nivel nucleotídico que oscilaron entre el 60 y 80%.

En este trabajo pudimos confirmar la presencia de los genes identificados *in silico* en la variedad comercial de papa *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* cv. Kennebec. Con respecto a

las secuencias depositadas provenientes del genotipo *S. tuberosum* grupo Phureja DM1-3 516 R44, observamos algunas diferencias que se encontraron principalmente en las regiones correspondientes a intrones. En cada uno de los péptidos predichos codificados por estos genes se pueden reconocer los tres dominios característicos de las proteínas Snakin/GASA: una región N-terminal de 21-27 aminoácidos que actuaría como un péptido señal clivable; una región intermedia variable en cuanto a la longitud y la composición de aminoácidos; y una región C-terminal que incluye los 12 residuos de cisteínas perfectamente conservados.

Las relaciones evolutivas dentro de la familia Snakin/GASA se estudiaron mediante la construcción de un árbol filogenético basado en el alineamiento múltiple de las secuencias proteicas. Como resultado pudimos ver que los péptidos de la familia Snakin/GASA en papa forman tres grupos consistente con estudios previos (Berrocal-Lobo y col. 2002). Con respecto a la homología observada a nivel de secuencia aminoacídica, dentro de cada grupo los porcentajes de similitud más altos corresponden a valores cercanos al 75% y en general están entre 50-60%, mientras que entre subfamilias las diferencias son mayores y los porcentajes se encuentran entre 30-45%. Sin embargo, cuando consideramos sólo el dominio C-terminal los porcentajes son mayores. Cuando incorporamos en este análisis las proteínas Snakin/GASA identificadas en otras especies también obtuvimos un patrón similar con tres grandes grupos, como fue descripto previamente (Zimmerman y col. 2010). Si bien el primer péptido de la familia Snakin/GASA se describió en el año 1992, hasta el momento se conoce relativamente poco y no existe un consenso acerca del rol que estas proteínas desempeñan en la planta. Esto hace que sea muy difícil especular sobre las posibles funciones de los nuevos miembros identificados en papa teniendo en cuenta sus

homologías y la información disponible en la bibliografía. Además, los análisis filogenéticos no necesariamente resultan en la formación de subgrupos que reflejen relaciones funcionales. En frutilla, por ejemplo, tanto las diferencias encontradas entre las secuencias de aminoácidos de FaGAST1 y FaGAST2 como las diferencias observadas en sus patrones de expresión indican cierta divergencia de ambas proteínas que no necesariamente implican una función fisiológica distinta sino más bien una complementariedad espaciotemporal (Moyano-Cañete y col. 2012).

Las proteínas Snakin/GASA han sido involucradas en diferentes aspectos del desarrollo de la planta y la tolerancia a estreses. En este sentido, se ha demostrado que la expresión de la mayoría de estos genes está regulada por hormonas y factores externos. Con el objetivo de profundizar el estudio de los genes Snakin/GASA en papa, se analizaron las putativas secuencias promotoras a fin de identificar la presencia de elementos regulatorios en *cis*. Si bien es necesario realizar una validación experimental de los resultados obtenidos, los estudios *in silico* permitieron identificar varios elementos de respuesta a estrés y a distintas hormonas, entre otros. Cabe destacar que para el gen *PGSC0003DMG400014441* no se encontraron sitios de respuesta a hormonas y en el caso de *PGSC0003DMG401019533* elementos relacionados con estrés.

Los análisis de expresión de los genes Snakin/GASA en papa indican que la regulación espacial es altamente específica como fue descrito previamente en otras especies. Si bien en trabajos previos se había demostrado que *SN1* y *SN2* tienen distintos patrones de expresión (Segura y col. 1999, Berrocal-Lobo y col. 2002), estos análisis fueron realizados con genotipos de papa diferentes al que nosotros estudiamos (cv. Desireé para *SN1* y cv. Jaerl para *SN2*) por lo que decidimos confirmar sus niveles de expresión en nuestro sistema

y además ampliar el análisis a otros genes de la familia. Estos análisis revelaron un patrón de expresión específico de tejido para cada gen y también ciertas discrepancias con respecto a los datos publicados previamente para *SN1* y *SN2*. Es posible que estas diferencias se deban a las distintas variedades analizadas y/o a la edad de las plantas en el momento que fueron tomadas las muestras. En este sentido, analizando otra variedad de papa Berrocal-Lobo y col. (2002) encontraron algunas diferencias en la expresión espacial de *SN1* con respecto a los resultados obtenidos previamente por el grupo de García-Olmedo (Segura y col. 1999). De la misma manera, se ha demostrado que el gen *GIP1* se expresa diferencialmente en dos variedades distintas de petunia (Ben Nissan y col. 2004). En el presente trabajo y en concordancia con los datos previos, se encontró que la expresión de *SN1* es particularmente alta en yemas axilares y tallos y que no se expresa en estolones; sin embargo, en contraste con Segura y col (1999) se detectó expresión de *SN1* en hojas. A diferencia de *SN1*, la expresión de *SN2* es alta en tubérculos y flores, así como también en raíces, hojas y ápice (aunque en menor medida). Previamente, Berrocal y col. (2002) no habían detectado expresión de *SN2* en raíces ni ápices. Finalmente, se observó que *SN3* se expresa en raíces, estolones, tallos y yemas axilares y no se detectó su expresión en otros tejidos analizados. El análisis mediante RT-qPCR de otros miembros de la familia Snakin/GASA reveló que si bien existe cierto solapamiento, cada gen presenta un patrón de expresión particular y que no puede relacionarse con la subfamilia a la cual pertenece. Los resultados indicaron que el gen *PGSC0003DMG400025759* (I) se expresa preferentemente en flor, *PGSC0003DMG400024474* (II) en tubérculo, tallo, yema y ápice; mientras que *PGSC0003DMG400007621* (III) fue detectado principalmente en flor, ápice, hoja, yema y tallo.

Los genes Snakin/GASA han sido implicados en múltiples vías de señalización, como ser respuesta a estrés o procesos de desarrollo y se ha demostrado que la mayoría de ellos están regulados por hormonas. Estudiar los niveles de expresión de los genes proporciona en determinados casos, datos acerca de su funcionalidad o de sus mecanismos de activación. En este contexto, analizamos el efecto del tratamiento con GA o ABA en la expresión de algunos genes Snakin/GASA en ápices, hojas y tallos de papa. Como resultado encontramos que la expresión de *SN1* es regulada negativamente por GA y no se vería afectada por ABA. Previamente, Segura y col. (1999) no habían observado respuesta de *SN1* frente al tratamiento con ciertas hormonas, incluyendo GA; sin embargo, en ese trabajo ellos analizaron hojas jóvenes de papa, en las cuales tampoco habían detectado expresión. Por otro lado, vimos que la expresión de *SN2* en ápice es incrementada a las 12 horas luego del tratamiento con ABA; en hoja disminuye con GA a las 24 horas y no cambiaría con ABA; asimismo, en tallo es inducida por ABA luego de 24 horas mientras que disminuye con GA. Berrocal y col. (2002) habían demostrado que *SN2* era fuertemente inducido por ABA en hojas de papa y en menor medida en tallos mientras que los niveles de expresión disminuían con GA en ambos tejidos, a las 17 y 48 horas luego del tratamiento. Si bien nosotros detectamos un patrón similar en la regulación de *SN2* frente al tratamiento con ABA o GA las diferencias de expresión con respecto a los controles son menores (particularmente en el tratamiento con ABA). Esto puede deberse al diseño del experimento, ya que en nuestro caso se rociaron las plantas en las macetas mientras que en el trabajo de Berrocal y col. (en el cual también se demuestra que *SN2* es inducido por daño mecánico) las mismas fueron cortadas y sumergidas en una solución con la hormona correspondiente. Finalmente, la expresión *SN3* no se vio afectada por estas hormonas al

menos en los tejidos y en las condiciones ensayadas. Cabe destacar que se observó el mismo patrón de regulación en los tres tejidos analizados. Se ha demostrado en algunos casos que la regulación de la expresión por GA es específica de tejido: *GASA4* es inducido en regiones meristemáticas y reprimido en cotiledones y hojas (Aubert y col. 1998). Asimismo, se ha observado que, bajo la influencia de GA, el patrón de expresión de *GsGAS1* en hojas y raíces es más complejo aún y depende no sólo del órgano en cuestión sino también de la duración del tratamiento (Li y col. 2011).

Teniendo en cuenta que los dos miembros de la familia Snakin/GASA en papa caracterizados hasta el momento fueron involucrados en la defensa de la planta, también analizamos si la expresión de estos genes está regulada por la infección con patógenos bacterianos y fúngicos. Estos análisis mostraron que luego de inocular con la bacteria *P. syringae* pv. *tabaci* la expresión de *SN1* es reprimida y la de *SN2* no se ve afectada, mientras que la de *SN3* es inducida 24 horas post-infección. Por otro lado, la infección de plantas crecidas *in vitro* con el hongo *Rhizoctonia solani* incrementó los niveles de expresión de *SN1* mientras que para *SN2* y *SN3* se observó el efecto opuesto.

Previamente, el grupo de García Olmedo no había detectado cambios en la expresión de *SN1* frente a la inoculación con *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 o con el hongo *B. cinerea* (Segura y col. 1999). Con respecto a *SN2*, así como *SN1*, fue aislado a partir de tubérculos de papa y caracterizado como un péptido antimicrobiano al demostrarse su actividad *in vitro* frente a varios patógenos fúngicos y bacterianos. Asimismo, se ha demostrado que su expresión es inducida en tubérculos infectados con el hongo *B. cinerea* y es reprimida luego de la inoculación con patógenos bacterianos como *Ralstonia solanacearum* y *Erwinia chrysanthemi* (Berrocal-Lobo y col. 2002). Una observación similar fue documentada por

Balaji y col (2008) donde el homólogo de *SN2* en tomate fue regulado negativamente por la infección con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Balaji y col. 2008). Por otro lado, se ha demostrado que los niveles de expresión de *CaSn* son inducidos frente a la infección con nematodos y los de *FaGAST2* por el hongo *Colletotrichum acutatum* (Mao y col. 2011, Moyano-Cañete y col. 2013).

Las diferencias observadas en este trabajo pueden deberse a los distintos patógenos y a las condiciones experimentales ensayadas, así como también a los diferentes genotipos de papa analizados en cada caso. Por otro lado, la inducción por patógenos fúngicos y la represión por bacterias fueron descritas para otros genes que codifican péptidos antimicrobianos, como la *lipid transfer protein* HvLTP4.3 de cebada y la defensina StPTH1 de papa (Moreno y col. 1994, Molina y col. 1996). En el caso de StPTH1, se ha demostrado que el péptido purificado presenta actividad frente a los patógenos *Clavibacter michiganensis*, *Fusarium solani* y *Pseudomonas solanacearum*. Sin embargo, contrariamente a lo que se podría esperar teniendo en cuenta su rol en defensa, la inoculación de hojas de papa con *P. syringae* causa una marcada disminución en los niveles de expresión de esta defensina (Moreno y col. 1994). Si bien la actividad antimicrobiana de SN1 ha sido demostrada tanto *in vitro* como *in vivo* frente a varios patógenos fúngicos y bacterianos (Segura y col. 1999, Almasia y col. 2008, Kovalskaya y Hammond 2009, Kovalskaya y col. 2011, Rong y col. 2013), de la misma manera que para *StPTH1*, la expresión de *SN1* es regulada negativamente por la infección causada por *P. syringae* pv. *tabaci*. Se ha sugerido que esto podría representar un mecanismo por el cual al menos algunos patógenos intentan superar las defensas de la planta (Jakobek y col. 1993, Wada y col. 1995).

### 3.5 Conclusiones

El desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación a gran escala y la disponibilidad de bases de datos de genomas secuenciados constituyen una herramienta muy útil para el descubrimiento de nuevos genes. La reciente publicación del genoma de papa por el Consorcio de Secuenciación del genoma de la papa constituye un gran avance en el conocimiento de este importante cultivo ya que facilita la tarea del estudio de sus genes y sus productos. En este contexto, pudimos identificar 14 nuevos miembros de la familia Snakin/GASA que se suman a los tres genes previamente reportados (*SN1*, *SN2* y *SN3*; Segura y col. 1999, Berrocal-Lobo y col. 2002) sugiriendo que en papa esta familia consiste en al menos 17 miembros. Asimismo, pudimos confirmar la presencia de los genes identificados *in silico* en la variedad comercial de papa *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* cv. Kennebec. El análisis filogenético reveló que estas proteínas se agrupan en tres subfamilias mientras que los análisis de expresión de los genes Snakin/GASA en papa indican que la regulación es específica para cada gen como fue descrito previamente para los homólogos en otras especies.

## Capítulo 4: Conclusiones generales

## 4.1 Conclusiones generales

La identificación de genes Snakin/GASA en especies poco emparentadas denota la importancia de estas proteínas y sugiere que sus funciones son esenciales en las plantas por lo que han sido conservadas a lo largo de la evolución. Teniendo en cuenta la información disponible a partir de la secuenciación del genoma de la papa, y la cantidad de miembros de la familia descritos para *Arabidopsis* y otras especies, nos planteamos como hipótesis de trabajo que en papa podrían existir más genes Snakin/GASA no descritos aún. Luego del análisis bioinformático realizado, fue posible identificar 14 nuevos genes Snakin/GASA que se suman a los tres genes previamente reportados (*SN1*, *SN2* y *SN3*; Segura y col. 1999, Berrocal-Lobo y col. 2002). Posteriormente, mediante amplificación por PCR y secuenciación se confirmó la presencia de los genes identificados *in silico* en la variedad comercial de papa *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* cv. Kennebec indicando que en esta especie existen al menos 17 miembros en esta familia.

El análisis de las secuencias de aminoácidos de estas proteínas permitió identificar en todas ellas, los tres dominios característicos de la familia Snakin/GASA: (1) un péptido señal putativo; (2) una región variable en composición como en número de aminoácidos, y (3) una región de aproximadamente 60 aminoácidos en el extremo carboxi-terminal dentro del cual hay unos 20 aminoácidos, incluyendo 12 cisteínas, en posiciones perfectamente conservadas. Asimismo, la construcción de un árbol filogenético resultó en tres subfamilias (I–III) como fue propuesto previamente por Berrocal-Lobo y col. (2002).

A pesar de que se ha demostrado su participación en diversos procesos del crecimiento y del desarrollo de la planta, el rol exacto que cumplen estas proteínas no se conoce hasta el momento. Es posible que la función biológica específica de cada uno de los genes esté

determinada por la expresión espacial y temporal durante el desarrollo de la planta. Los antecedentes indican que la regulación temporal y espacial de los genes Snakin/GASA es altamente específica. Si bien se ha observado que los distintos miembros de la familia pueden tener localizaciones iguales, este solapamiento siempre es parcial. De la misma manera, los análisis de expresión en distintos tejidos de algunos miembros de la familia Snakin/GASA en papa mostraron que cada uno de ellos presenta un patrón de expresión particular. Asimismo, se analizó la regulación de la expresión por hormonas (GA y ABA) y por infecciones con patógenos donde también se observó una expresión diferencial entre distintos genes Snakin/GASA. También se ha sugerido que la especificidad de cada proteína puede depender de la secuencia N-terminal variable en cada una de ellas aunque esto no ha sido probado experimentalmente. Es importante destacar que diferentes miembros de la familia pueden cumplir la misma función o justamente la opuesta. Además, si bien una función específica pudo haber sido asignada a un gen Snakin/GASA particular, evidencias posteriores indican que un determinado gen Snakin/GASA puede cumplir diferentes roles y podría participar en más de un proceso de desarrollo de la planta.

Si bien se ha demostrado que *SNI* está involucrado en defensa, su participación en otros procesos biológicos no sería incompatible con su función antimicrobiana. En este contexto, nos planteamos como hipótesis de trabajo que *SNI* presenta un rol dual en defensa y en desarrollo. Homólogos de este gen en otras especies han sido implicados en diversas funciones relacionadas al crecimiento y al desarrollo de la planta como la regulación de la elongación celular o de la división celular, estimulación o inhibición de la elongación del tallo y de la corola. El uso de las plantas transgénicas, ya sea por aumento o disminución de los niveles de expresión de los genes, constituye una potente herramienta que permite

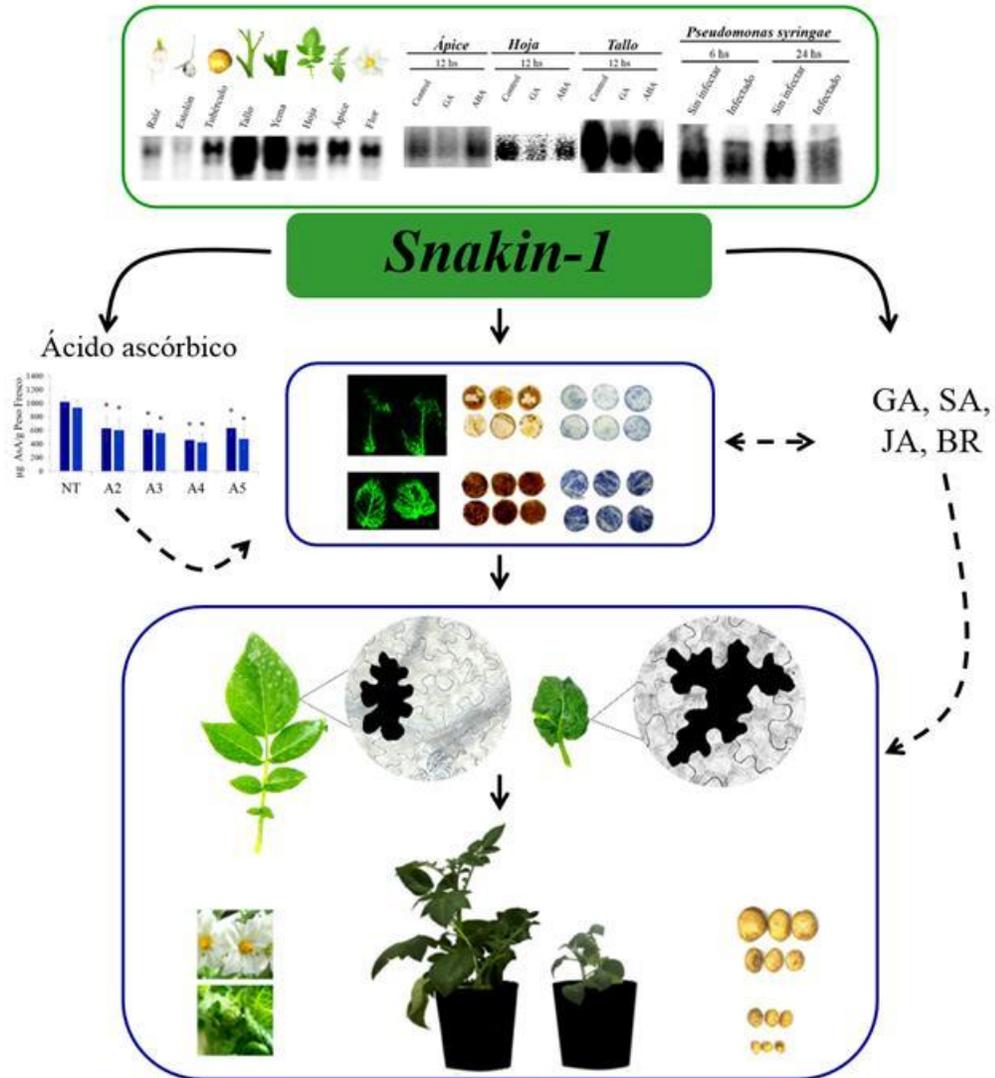
estudiar las funciones *in vivo* de un gen de interés y ha sido utilizada con el fin de comprender el rol biológico de varios genes Snakin/GASA en distintas especies de plantas. En este contexto, las líneas que sobreexpresan *SNI* no mostraron diferencias morfológicas evidentes con respecto a las plantas NT; sin embargo, el silenciamiento de *SNI* resultó en notorias alteraciones fenotípicas sugiriendo que este gen también cumple un rol en el crecimiento y el desarrollo de la planta.

La caracterización fenotípica detallada de las líneas transgénicas reveló que las líneas que silencian *SNI* presentan una altura reducida, hojas de una forma atípica y de menor tamaño, e importantes defectos en los procesos de floración y de tuberización. El área foliar en las líneas silenciadas presenta una disminución del 50-60% como resultado de un menor número de células por hoja. Aún más estas células mostraron un incremento significativo en el tamaño medio que podría explicarse por un efecto de compensación. En conjunto, estos resultados sugieren que *SNI* está involucrado en el proceso de división celular.

Por otra parte, en este trabajo se demostró que las líneas que silencian *SNI* exhiben importantes cambios en su metabolismo primario. Los niveles de ciertos intermediarios del ciclo de Krebs así como de algunos componentes de la vía del ácido ascórbico resultaron alterados significativamente. El hecho de que las líneas que silencian *SNI* muestren alteraciones en la división celular y niveles reducidos de ácido ascórbico, sugiere que *SNI* podría participar en la división celular mediante la modulación de los niveles de ascorbato. Asimismo, el silenciamiento de *SNI* también resultó en alteraciones en la composición de la pared celular de las hojas, lo cual es posible que explique los defectos en el crecimiento y el desarrollo observados en las líneas que silencian este gen.

Los análisis de acumulación de EROs indicaron que *SNI* participa en la homeostasis redox. Como fue descrito para otros genes de la familia Snakin/GASA, es posible que *SNI* funcione mediante la modulación de las EROs (directa o indirectamente regulando los niveles de ácido ascórbico), y que esto actúe como señal en la célula activando a su vez vías de señalización que tenga como resultado final un impacto sobre el crecimiento y desarrollo de la planta.

Asimismo, las evidencias indican la participación de los genes Snakin/GASA en la compleja red de interacción de las distintas hormonas, tanto a nivel de síntesis como de acción. El análisis de los perfiles transcripcionales en las líneas transgénicas nos permitió identificar varios genes relacionados a la síntesis de esteroides, compuestos que tienen un rol fundamental como constituyentes de la membrana celular y son precursores de los BR, mostraron niveles de expresión reducidos en la línea que silencia *SNI*. En este sentido, y de la misma forma que fue descrito previamente para su homólogo en arroz *OsGSRI* (Wang y col. 2009), *SNI* estaría involucrado en el balance hormonal, mediante la regulación de la síntesis de BR. La Figura 4.1 constituye un esquema simplificado de la participación de *SNI* en el crecimiento y el desarrollo de la planta teniendo en cuenta los resultados más relevantes del presente trabajo de tesis.



**Figura 4.1.** *Snakin-1* y su participación en el crecimiento y el desarrollo de la planta.

En conjunto, resultados de este trabajo y antecedentes publicados hasta el momento sugieren que las proteínas Snakin/GASA pueden actuar como integradores de señales internas o ambientales participando en el establecimiento de la homeostasis hormonal y el balance redox para modular el desarrollo de la planta y las respuestas frente a estreses mediante el ajuste del balance entre la promoción y la inhibición del crecimiento celular (Figura 4.2).

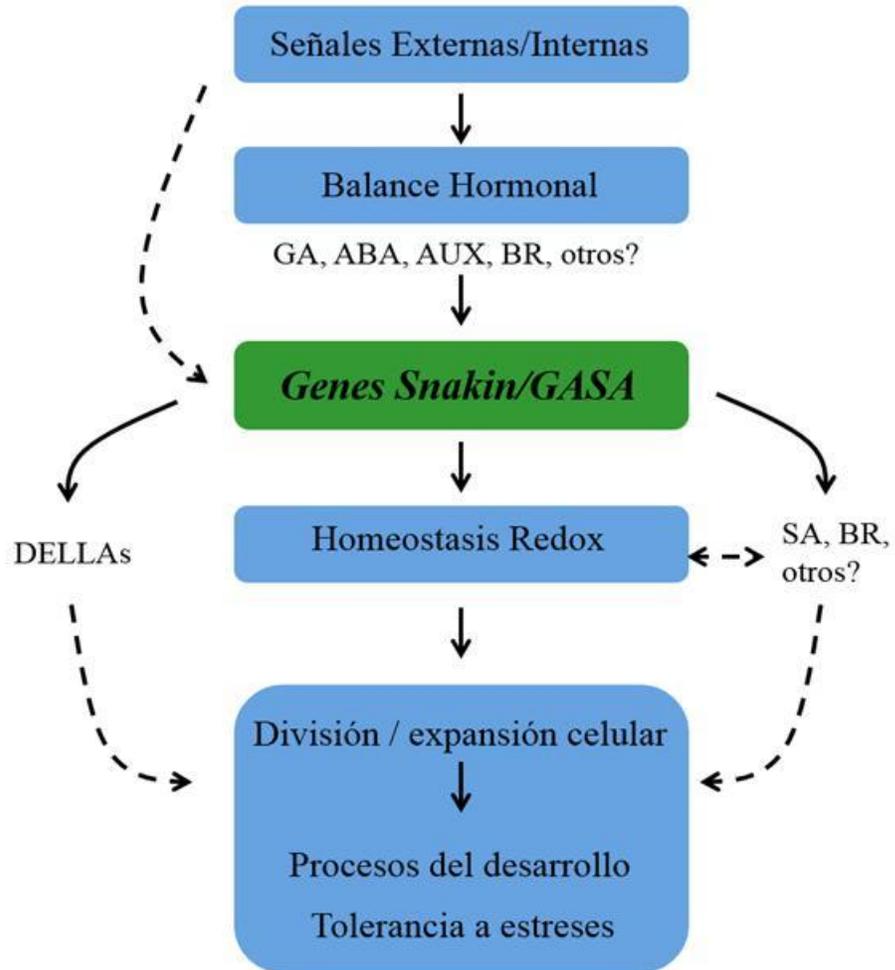


Figura 4.2. Modelo simplificado de la función de las proteínas Snakin/GASA.

## Referencias bibliográficas

- Abreu ME, Munne-Bosch S (2009) Salicylic acid deficiency in NahG transgenic lines and sid2 mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany* 60: 1261-1271
- Achard P, Renou JP, Berthome R, Harberd NP, Genschik P (2008) Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Current biology* : CB 18: 656-660
- Agius F, Gonzalez-Lamothe R, Caballero JL, Munoz-Blanco J, Botella MA, Valpuesta V (2003) Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature biotechnology* 21: 177-181
- Alabadi D, Gil J, Blazquez MA, Garcia-Martinez JL (2004) Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol* 134: 1050-1057
- Alhaghdow M, Mounet F, Gilbert L, Nunes-Nesi A, Garcia V, Just D, Petit J, Beauvoit B, Fernie AR, Rothan C, Baldet P (2007) Silencing of the mitochondrial ascorbate synthesizing enzyme L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase affects plant and fruit development in tomato. *Plant Physiol* 145: 1408-1422
- Almasia NI (2009) Estudio genómico y funcional del péptido antimicrobiano Snakin-1. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
- Almasia NI, Bazzini AA, Hopp HE, Vazquez-Rovere C (2008) Overexpression of snakin-1 gene enhances resistance to *Rhizoctonia solani* and *Erwinia carotovora* in transgenic potato plants. *Mol Plant Pathol* 9: 329-338
- Almasia NI, Narhirñak V, Hopp HE, Vazquez-Rovere C (2010) Isolation and characterization of the tissue and development-specific potato snakin-1 promoter inducible by temperature and wounding. *Electronic Journal of Biotechnology*
- Alonso-Ramírez A, Rodríguez D, Reyes D, Jimenez JA, Nicolas G, Lopez-Climent M, Gomez-Cadenas A, Nicolas C (2009a) Cross-talk between gibberellins and salicylic acid in early stress responses in *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant signaling & behavior* 4: 750-751
- Alonso-Ramírez A, Rodríguez D, Reyes D, Jimenez JA, Nicolas G, Lopez-Climent M, Gomez-Cadenas A, Nicolas C (2009b) Evidence for a role of gibberellins in salicylic acid-modulated early plant responses to abiotic stress in *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiol* 150: 1335-1344
- Allen A, Snyder AK, Preuss M, Nielsen EE, Shah DM, Smith TJ (2008) Plant defensins and virally encoded fungal toxin KP4 inhibit plant root growth. *Planta* 227: 331-339
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of plant biology* 55: 373-399
- Arrigoni O (1994) Ascorbate system in plant development. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 26: 407-419
- Aubert D, Chevillard M, Dorne AM, Arlaud G, Herzog M (1998) Expression patterns of GASA genes in *Arabidopsis thaliana*: the GASA4 gene is up-regulated by gibberellins in meristematic regions. *Plant molecular biology* 36: 871-883
- Autran D, Jonak C, Belcram K, Beemster GT, Kronenberger J, Grandjean O, Inze D, Traas J (2002) Cell numbers and leaf development in *Arabidopsis*: a functional analysis of the STRUWWELPETER gene. *The EMBO journal* 21: 6036-6049
- Bai MY, Shang JX, Oh E, Fan M, Bai Y, Zentella R, Sun TP, Wang ZY (2012) Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in *Arabidopsis*. *Nature cell biology* 14: 810-817
- Bai YN, Feng J, Ma HJ, Lin JY, Han SB, Tang LX (2013) Role of the CPC sequence in the antioxidant activity of GcGAST protein in *E.coli*. *The protein journal* 32: 48-57
- Bak S, Kahn RA, Olsen CE, Halkier BA (1997) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the obtusifoliol 14 alpha-demethylase of *Sorghum bicolor* (L.) Moench, a cytochrome P450 orthologous to the sterol 14 alpha-demethylases (CYP51) from fungi and mammals. *Plant J* 11: 191-201

- Balaji V, Mayrose M, Sherf O, Jacob-Hirsch J, Eichenlaub R, Iraki N, Manulis-Sasson S, Rechavi G, Barash I, Sessa G (2008) Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant Physiol* 146: 1797-1809
- Balaji V, Smart CD (2012) Over-expression of snakin-2 and extensin-like protein genes restricts pathogen invasiveness and enhances tolerance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*). *Transgenic Res* 21:23-37
- Balaji V, Sessa G, Smart CD (2011) Silencing of host basal defense response-related gene expression increases susceptibility of *Nicotiana benthamiana* to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 101: 349-357
- Barth C, De Tullio M, Conklin PL (2006) The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. *Journal of experimental botany* 57: 1657-1665
- Ben-Nissan G, Lee JY, Borohov A, Weiss D (2004) GIP, a *Petunia hybrida* GA-induced cysteine-rich protein: a possible role in shoot elongation and transition to flowering. *Plant J* 37: 229-238
- Ben-Nissan G, Weiss D (1996) The petunia homologue of tomato *gast1*: transcript accumulation coincides with gibberellin-induced corolla cell elongation. *Plant molecular biology* 32: 1067-1074
- Benveniste P (2004) Biosynthesis and accumulation of sterols. *Annual review of plant biology* 55: 429-457
- Berrocal-Lobo M, Segura A, Moreno M, Lopez G, Garcia-Olmedo F, Molina A (2002) Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiol* 128: 951-961
- Bindschedler LV, Whitelegge JP, Millar DJ, Bolwell GP (2006) A two component chitin-binding protein from French bean -- association of a proline-rich protein with a cysteine-rich polypeptide. *FEBS letters* 580: 1541-1546
- Bouquin T, Meier C, Foster R, Nielsen ME, Mundy J (2001) Control of specific gene expression by gibberellin and brassinosteroid. *Plant Physiol* 127: 450-458
- Bouvier-Nave P, Husselstein T, Benveniste P (1998) Two families of sterol methyltransferases are involved in the first and the second methylation steps of plant sterol biosynthesis. *European journal of biochemistry / FEBS* 256: 88-96
- Bowling SA, Clarke JD, Liu Y, Klessig DF, Dong X (1997) The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell* 9: 1573-1584
- Buchanan BB, Balmer Y (2005) Redox regulation: a broadening horizon. *Annual review of plant biology* 56: 187-220
- Burger C, Rondet S, Benveniste P, Schaller H (2003) Virus-induced silencing of sterol biosynthetic genes: identification of a *Nicotiana tabacum* L. *obtusifolius*-14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) by genetic manipulation of the sterol biosynthetic pathway in *Nicotiana benthamiana* L. *Journal of experimental botany* 54: 1675-1683
- Busov VB, Brunner AM, Strauss SH (2008) Genes for control of plant stature and form. *The New phytologist* 177: 589-607
- Carrera E, Jackson SD, Prat S (1999) Feedback control and diurnal regulation of gibberellin 20-oxidase transcript levels in potato. *Plant Physiol* 119: 765-774
- Clouse SD (2002) *Arabidopsis* mutants reveal multiple roles for sterols in plant development. *Plant Cell* 14: 1995-2000
- Clouse SD (2011) Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *Plant Cell* 23: 1219-1230
- Clouse SD, Sasse JM (1998) BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 49: 427-451
- Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, Robles M (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21: 3674-3676
- Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 850-861
- Chamnongpol S, Willekens H, Moeder W, Langebartels C, Sandermann H, Jr., Van Montagu M, Inze D, Van Camp W (1998) Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5818-5823
- Chen IC, Lee SC, Pan SM, Hsieh HL (2007) GASA4, a GA-stimulated gene, participates in light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Science* 172: 1062-1071
- Chen L, Carpita NC, Reiter WD, Wilson RH, Jeffries C, McCann MC (1998) A rapid method to screen for cell-wall mutants using discriminant analysis of Fourier transform infrared spectra. *Plant J* 16: 385-392

- Chen Z, Gallie DR (2006) Dehydroascorbate reductase affects leaf growth, development, and function. *Plant Physiol* 142: 775-787
- Chen Z, Young TE, Ling J, Chang SC, Gallie DR (2003) Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3525-3530
- Choe S, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Tissier CP, Gregory BD, Ross AS, Tanaka A, Yoshida S, Tax FE, Feldmann KA (1999) The Arabidopsis *dwf7/ste1* mutant is defective in the  $\Delta 7$  sterol C-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* 11: 207-221
- Choe S, Tanaka A, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Ross AS, Tax FE, Yoshida S, Feldmann KA (2000) Lesions in the sterol  $\Delta 7$  reductase gene of Arabidopsis cause dwarfism due to a block in brassinosteroid biosynthesis. *Plant J* 21: 431-443
- Darnet S, Bard M, Rahier A (2001) Functional identification of sterol-4 $\alpha$ -methyl oxidase cDNAs from Arabidopsis thaliana by complementation of a yeast *erg25* mutant lacking sterol-4 $\alpha$ -methyl oxidation. *FEBS letters* 508: 39-43
- Darnet S, Rahier A (2004) Plant sterol biosynthesis: identification of two distinct families of sterol 4 $\alpha$ -methyl oxidases. *The Biochemical journal* 378: 889-898
- de la Fuente JI, Amaya I, Castillejo C, Sanchez-Sevilla JF, Quesada MA, Botella MA, Valpuesta V (2006) The strawberry gene *FaGAST* affects plant growth through inhibition of cell elongation. *Journal of experimental botany* 57: 2401-2411
- de Pinto MC, De Gara L (2004) Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *Journal of experimental botany* 55: 2559-2569
- De Veylder L, Beeckman T, Beemster GT, Krols L, Terras F, Landrieu I, van der Schueren E, Maes S, Naudts M, Inze D (2001) Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis. *Plant Cell* 13: 1653-1668
- Depuydt S, Hardtke CS (2011) Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Current biology : CB* 21: R365-373
- Di Matteo A, Sacco A, Anacleria M, Pezzotti M, Delledonne M, Ferrarini A, Frusciante L, Barone A (2010) The ascorbic acid content of tomato fruits is associated with the expression of genes involved in pectin degradation. *BMC Plant Biol* 10: 163
- Diliberto EJ, Jr., Heckman GD, Daniels AJ (1983) Characterization of ascorbic acid transport by adrenomedullary chromaffin cells. Evidence for Na<sup>+</sup>-dependent co-transport. *The Journal of biological chemistry* 258: 12886-12894
- Dubois M, Gilles DA, Hamilton JK, A. RP, Smith F (1956) Colorimetric method of determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356
- Durgbanshi A, Arbona V, Pozo O, Miersch O, Sancho JV, Gomez-Cadenas A (2005) Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* 53: 8437-8442
- Ellis C, Turner JG (2001) The Arabidopsis mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell* 13: 1025-1033
- Faccio P, Vazquez-Rovere C, Hopp E, Gonzalez G, Decima-Oneto C, Favret E, Diaz Paleo A, Franzone P (2011) Increased Tolerance to Wheat Powdery Mildew by Heterologous Constitutive Expression of the *Solanum chacoense* *snakin-1* Gene. *Czech J. Genet. Plant Breed* 47: 135-141
- Ferjani A, Horiguchi G, Yano S, Tsukaya H (2007) Analysis of leaf development in *fugu* mutants of Arabidopsis reveals three compensation modes that modulate cell expansion in determinate organs. *Plant Physiol* 144: 988-999
- Fernie AR, Roessner U, Trethewey RN, Willmitzer L (2001) The contribution of plastidial phosphoglucomutase to the control of starch synthesis within the potato tuber. *Planta* 213: 418-426
- Filissetti-Cozzi TM, Carpita NC (1991) Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal Biochem* 197: 157-162
- Foyer CH, Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866-1875
- Foyer CH, Noctor G (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & redox signaling* 11: 861-905
- Furukawa T, Sakaguchi N, Shimada H (2006) Two *OsGASR* genes, rice *GAST* homologue genes that are abundant in proliferating tissues, show different expression patterns in developing panicles. *Genes Genet Syst* 81: 171-180

- Gallie DR (2013a) L-Ascorbic Acid: A Multifunctional Molecule Supporting Plant Growth and Development. Scientifica 2013
- Gallie DR (2013b) The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *Journal of experimental botany* 64: 433-443
- Gapper C, Dolan L (2006) Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiol* 141: 341-345
- Gelhaye E, Rouhier N, Navrot N, Jacquot JP (2005) The plant thioredoxin system. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62: 24-35
- Gibeaut DM, Carpita NC (1991) Tracing cell wall biogenesis in intact cells and plants : selective turnover and alteration of soluble and cell wall polysaccharides in grasses. *Plant Physiol* 97: 551-561
- Gilbert L, Alhagdow M, Nunes-Nesi A, Quemener B, Guillon F, Bouchet B, Faurobert M, Gouble B, Page D, Garcia V, Petit J, Stevens R, Causse M, Fernie AR, Lahaye M, Rothan C, Baldet P (2009) GDP-D-mannose 3,5-epimerase (GME) plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato. *Plant J* 60: 499-508
- Gonzalez-Garcia MP, Vilarrasa-Blasi J, Zhiponova M, Divol F, Mora-Garcia S, Russinova E, Cano-Delgado AI (2011) Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots. *Development* 138: 849-859
- Gonzalez N, De Bodt S, Sulpice R, Jikumaru Y, Chae E, Dhondt S, Van Daele T, De Milde L, Weigel D, Kamiya Y, Stitt M, Beemster GT, Inze D (2010) Increased leaf size: different means to an end. *Plant Physiol* 153: 1261-1279
- Goo Y-M, Chun, H. J., Kim, T-W., Lee, C-H., Ahn, M-J., Bae, S-C., Cho, K-J., Chun, J-A., Chung, C-H., Lee, S-W. (2008) Expressional characterization of dehydroascorbate reductase cDNA in transgenic potato plants. *Journal of Plant Biology* 51: 35-41
- Gray WM (2004) Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biol* 2: E311
- Gudesblat GE, Russinova E (2011) Plants grow on brassinosteroids. *Curr Opin Plant Biol* 14: 530-537
- Guzmán-Rodríguez JJ, Ibarra-Laclette E, Herrera-Estrella L, Ochoa-Zarzosa A, Suárez-Rodríguez LM, Rodríguez-Zapata LC, Salgado-Garciglia R, Jimenez-Moraila B, López-Meza JE, López-Gómez R (2013) Analysis of expressed sequence tags (ESTs) from avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) reveals abundant expression of the gene encoding the antimicrobial peptide snakin. *Plant Physiol Biochem.*: 318-324
- Harberd NP, Belfield E, Yasumura Y (2009) The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: how an "inhibitor of an inhibitor" enables flexible response to fluctuating environments. *Plant Cell* 21: 1328-1339
- Haroldsen VM, Chi-Ham CL, Kulkarni S, Lorence A, Bennett AB (2011) Constitutively expressed DHAR and MDHAR influence fruit, but not foliar ascorbate levels in tomato. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* 49: 1244-1249
- Hedden P, Phillips AL (2000) Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* 5: 523-530
- Hematy K, Cherk C, Somerville S (2009) Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol* 12: 406-413
- Hernandez-Blanco C, Feng DX, Hu J, Sanchez-Vallet A, Deslandes L, Llorente F, Berrocal-Lobo M, Keller H, Barlet X, Sanchez-Rodriguez C, Anderson LK, Somerville S, Marco Y, Molina A (2007) Impairment of cellulose synthases required for Arabidopsis secondary cell wall formation enhances disease resistance. *Plant Cell* 19: 890-903
- Herzog M, Dorne AM, Grellet F (1995) GASA, a gibberellin-regulated gene family from Arabidopsis thaliana related to the tomato GAST1 gene. *Plant molecular biology* 27: 743-752
- Hirsch S, Oldroyd GE (2009) GRAS-domain transcription factors that regulate plant development. *Plant signaling & behavior* 4: 698-700
- Horiguchi G, Kim GT, Tsukaya H (2005) The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of Arabidopsis thaliana. *Plant J* 43: 68-78
- Houston NL, Fan C, Xiang JQ, Schulze JM, Jung R, Boston RS (2005) Phylogenetic analyses identify 10 classes of the protein disulfide isomerase family in plants, including single-domain protein disulfide isomerase-related proteins. *Plant Physiol* 137: 762-778
- Humphrey TV, Bonetta DT, Goring DR (2007) Sentinels at the wall: cell wall receptors and sensors. *The New phytologist* 176: 7-21
- Jackson SD, James PE, Carrera E, Prat S, Thomas B (2000) Regulation of transcript levels of a potato gibberellin 20-oxidase gene by light and phytochrome B. *Plant Physiol* 124: 423-430

- Jakobek JL, Smith JA, Lindgren PB (1993) Suppression of Bean Defense Responses by *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* 5: 57-63
- Jang JC, Fujioka S, Tasaka M, Seto H, Takatsuto S, Ishii A, Aida M, Yoshida S, Sheen J (2000) A critical role of sterols in embryonic patterning and meristem programming revealed by the fackel mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genes & development* 14: 1485-1497
- Kato N, Esaka, M. (1999) Changes in ascorbate oxidase gene expression and ascorbate levels in cell division and cell elongation in tobacco cells. *Physiologia plantarum* 105: 321-329
- Keller R, Brearley C.A., Trethewey R.N., Muller Rober, B. (1998) Reduced inositol content and altered morphology in transgenic potato plants inhibited for 1Dmyoinositol 3 phosphate synthase. *Plant Journal* 16: 403-410
- Keller R, Renz FS, Kossmann J (1999) Antisense inhibition of the GDP-mannose pyrophosphorylase reduces the ascorbate content in transgenic plants leading to developmental changes during senescence. *Plant J* 19: 131-141
- Kemsley EK (1996) Discriminant analysis of high-dimensional data: A comparison of principal components analysis and partial least squares data reduction methods. *Chemometrics Intelligent Lab. Syst.* 33: 47-61
- Kim MS, Cho SM, Kang EY, J. IY, Hwangbo H, Kim YC, Ryu C, Yang KY, Chung GC, Cho BH (2008) Galactinol Is a Signaling Component of the Induced Systemic Resistance Caused by *Pseudomonas chlororaphis* O6 Root Colonization. *MPMI* 21: 1643-1653
- Klahre U, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Yokota T, Nomura T, Yoshida S, Chua NH (1998) The *Arabidopsis* DIMINUTO/DWARF1 gene encodes a protein involved in steroid synthesis. *Plant Cell* 10: 1677-1690
- Kloosterman B, Navarro C, Bijsterbosch G, Lange T, Prat S, Visser RG, Bachem CW (2007) StGA2ox1 is induced prior to stolon swelling and controls GA levels during potato tuber development. *Plant J* 52: 362-373
- Ko CB, Woo YM, Lee DJ, Lee MC, Kim CS (2007) Enhanced tolerance to heat stress in transgenic plants expressing the GASA4 gene. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* 45: 722-728
- Kotchoni SO, Larrimore KE, Mukherjee M, Kempinski CF, Barth C (2009) Alterations in the endogenous ascorbic acid content affect flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 149: 803-815
- Kotilainen M, Helariutta Y, Mehto M, Pollanen E, Albert VA, Elomaa P, Teeri TH (1999) GEG participates in the regulation of cell and organ shape during corolla and carpel development in *gerbera hybrida*. *Plant Cell* 11: 1093-1104
- Kovalskaya N, Hammond RW (2009) Expression and functional characterization of the plant antimicrobial snak-in-1 and defensin recombinant proteins. *Protein expression and purification* 63: 12-17
- Kovalskaya YM, Aniskin VM, Bogomolov PL, Surov AV, Tikhonov IA, Tikhonova GN, Robinson TJ, Volobouev VT (2011) Karyotype reorganisation in the subtilis group of birch mice (Rodentia, Dipodidae, Sicista): unexpected taxonomic diversity within a limited distribution. *Cytogenetic and genome research* 132: 271-288
- Krugel U, He HX, Gier K, Reins J, Chincinska I, Grimm B, Schulze WX, Kuhn C (2012) The potato sucrose transporter StSUT1 interacts with a DRM-associated protein disulfide isomerase. *Molecular plant* 5: 43-62
- Kwak JM, Nguyen V, Schroeder JI (2006) The role of reactive oxygen species in hormonal responses. *Plant Physiol* 141: 323-329
- Lescot M, Dehais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouze P, Rombauts S (2002) PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 30: 325-327
- Li J, Chory J (1999) Brassinosteroid actions in plants. *Journal of experimental botany* 50: 275-282
- Li KL, Bai X, Li Y, Cai H, Ji W, Tang LL, Wen YD, Zhu YM (2011) GsGASA1 mediated root growth inhibition in response to chronic cold stress is marked by the accumulation of DELLAs. *Journal of plant physiology* 168: 2153-2160
- Li Q, Li, Y., Li., C., Yu, X. (2012) Enhanced Ascorbic Acid Accumulation through Overexpression of Dehydroascorbate Reductase Confers Tolerance to Methyl Viologen and Salt Stresses in Tomato. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 48: 74-86
- Lopez-Solanilla E, Gonzalez-Zorn B, Novella S, Vazquez-Boland JA, Rodriguez-Palenzuela P (2003) Susceptibility of *Listeria monocytogenes* to antimicrobial peptides. *FEMS microbiology letters* 226: 101-105

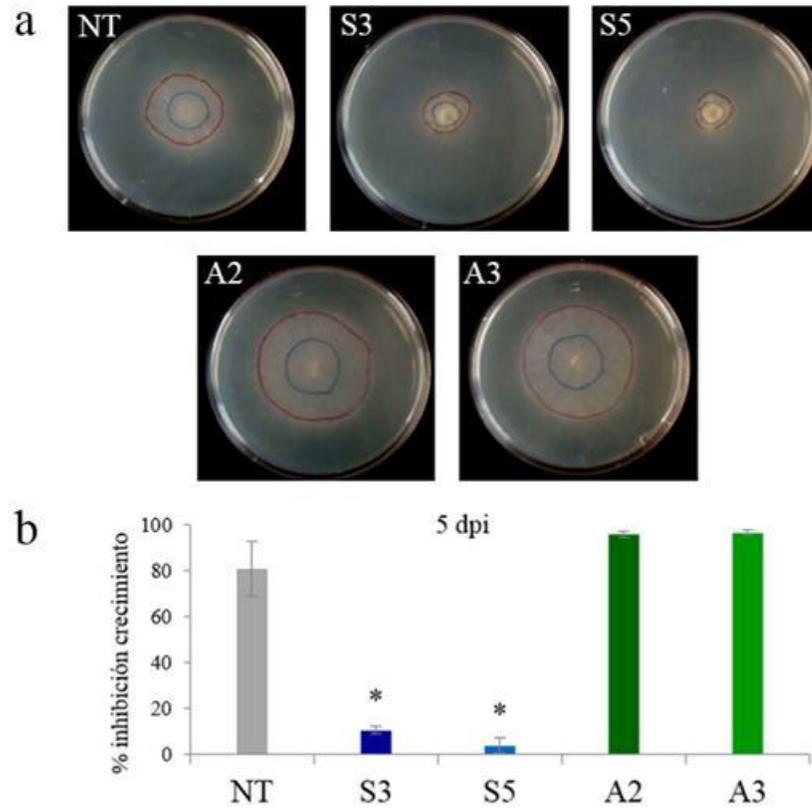
- Lorence A, Chevone BI, Mendes P, Nessler CL (2004) myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiol* 134: 1200-1205
- Lovato MA, Hart EA, Segura MJ, Giner JL, Matsuda SP (2000) Functional cloning of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding cycloeucaleanol cycloisomerase. *The Journal of biological chemistry* 275: 13394-13397
- Luedemann A, Strassburg K, Erban A, Kopka J (2008) TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography--mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics* 24: 732-737
- Mao Z, Zheng J, Wang Y, Chen G, Yang Y, Feng D, Xie B (2011) The new CaSn gene belonging to the snakin family induces resistance against root-knot nematode infection in pepper. *Phytoparasitica*
- Marshall E, Costa LM, Gutierrez-Marcos J (2011) Cysteine-rich peptides (CRPs) mediate diverse aspects of cell-cell communication in plant reproduction and development. *Journal of experimental botany* 62: 1677-1686
- Meyerowitz EM (1997) Genetic control of cell division patterns in developing plants. *Cell* 88: 299-308
- Millar AH, Mittova V, Kiddle G, Heazlewood JL, Bartoli CG, Theodoulou FL, Foyer CH (2003) Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiol* 133: 443-447
- Miller G, Shulaev V, Mittler R (2008) Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia plantarum* 133: 481-489
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405-410
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9: 490-498
- Mizukami Y, Fischer RL (2000) Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 942-947
- Molina A, Diaz I, Vasil IK, Carbonero P, Garcia-Olmedo F (1996) Two cold-inducible genes encoding lipid transfer protein LTP4 from barley show differential responses to bacterial pathogens. *Molecular & general genetics* : MGG 252: 162-168
- Moreno M, Segura A, Garcia-Olmedo F (1994) Pseudothionin-St1, a potato peptide active against potato pathogens. *European journal of biochemistry / FEBS* 223: 135-139
- Morrison IM (1988) Hydrolysis of plant cell walls with trifluoroacetic acid *Phytochemistry* 27: 1097-1100
- Moyano-Canete E, Bellido ML, Garcia-Caparros N, Medina-Puche L, Amil-Ruiz F, Gonzalez-Reyes JA, Caballero JL, Munoz-Blanco J, Blanco-Portales R (2013) FaGAST2, a strawberry ripening-related gene, acts together with FaGAST1 to determine cell size of the fruit receptacle. *Plant & cell physiology* 54: 218-236
- Nakaya M, Tsukaya H, Murakami N, Kato M (2002) Brassinosteroids control the proliferation of leaf cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant & cell physiology* 43: 239-244
- Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of experimental botany* 56: 2907-2914
- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol* 147: 1251-1263
- Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, Yoshida S, Li J, Chory J (1999) *Arabidopsis det2* is defective in the conversion of (24R)-24-methylcholest-4-En-3-one to (24R)-24-methyl-5alpha-cholestan-3-one in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol* 120: 833-840
- Olmos E, Kiddle G, Pellny T, Kumar S, Foyer C (2006) Modulation of plant morphology, root architecture, and cell structure by low vitamin C in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany* 57: 1645-1655
- Pastori GM, Kiddle G, Antoniw J, Bernard S, Veljovic-Jovanovic S, Verrier PJ, Noctor G, Foyer CH (2003) Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell* 15: 939-951
- Peng J, Lai L, Wang X (2010) Temporal and spatial expression analysis of PRGL in *Gerbera hybrida*. *Molecular biology reports* 37: 3311-3317
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45
- Pitzschke A, Forzani C, Hirt H (2006) Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxidants & redox signaling* 8: 1757-1764
- Potters G, De Gara, L.,Asard, H., Horemans N. (2002) Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 537-548

- Qin A, Shi Q, Yu X (2011) Ascorbic acid contents in transgenic potato plants overexpressing two dehydroascorbate reductase genes. *Molecular biology reports* 38: 1557-1566
- Raines CA, Paul MJ (2006) Products of leaf primary carbon metabolism modulate the developmental programme determining plant morphology. *Journal of experimental botany* 57: 1857-1862
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience letters* 339: 62-66
- Reiter WD, Chapple CC, Somerville CR (1993) Altered growth and cell walls in a fucose-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Science* 261: 1032-1035
- Rivas-San Vicente M, Plasencia J (2011) Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of experimental botany* 62: 3321-3338
- Rocha-Sosa M, Sonnewald U, Frommer W, Stratmann M, Schell J, Willmitzer L (1989) Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *The EMBO journal* 8: 23-29
- Rodriguez-Falcon M, Bou J, Prat S (2006) Seasonal control of tuberization in potato: conserved elements with the flowering response. *Annual review of plant biology* 57: 151-180
- Roessner U, Luedemann A, Brust D, Fiehn O, Linke T, Willmitzer L, Fernie A (2001) Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *Plant Cell* 13: 11-29
- Rong W, Qi L, Wang J, Du L, Xu H, Wang A, Zhang Z (2013) Expression of a potato antimicrobial peptide SN1 increases resistance to take-all pathogen *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in transgenic wheat. *Functional & integrative genomics* 13: 403-409
- Roxrud I, Lid SE, Fletcher JC, Schmidt ED, Opsahl-Sorteberg HG (2007) GASA4, one of the 14-member *Arabidopsis* GASA family of small polypeptides, regulates flowering and seed development. *Plant & cell physiology* 48: 471-483
- Rubinovich L, Weiss D (2010) The *Arabidopsis* cysteine-rich protein GASA4 promotes GA responses and exhibits redox activity in bacteria and in planta. *Plant J* 64: 1018-1027
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular cloning, A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2nd Edition
- Sánchez-Rodríguez C, Estévez JM, Llorente F, Hernández-Blanco C, Jordá L, Pagán I, Berrocal M, Marco Y, Somerville S, Molina A (2009) The ERECTA Receptor-Like Kinase Regulates Cell Wall-Mediated Resistance to Pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *MPMI* 22: 953-963
- Schaller H (2004) New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* 42: 465-476
- Segura A, Moreno M, Madueno F, Molina A, Garcia-Olmedo F (1999) Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 12: 16-23
- Shi L, Gast RT, Gopalraj M, Olszewski NE (1992) Characterization of a shoot-specific, GA3- and ABA-regulated gene from tomato. *Plant J* 2: 153-159
- Shi L, Olszewski, N. E. (1998) Gibberellin and abscisic acid regulate GAST1 expression at the level of transcription. *Plant molecular biology* 38: 1053-1060
- Shleizer-Burko S, Burko Y, Ben-Herzel O, Ori N (2011) Dynamic growth program regulated by LANCEOLATE enables flexible leaf patterning. *Development* 138: 695-704
- Silverstein KA, Graham MA, Paape TD, VandenBosch KA (2005) Genome organization of more than 300 defensin-like genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138: 600-610
- Silverstein KA, Moskal WA, Jr., Wu HC, Underwood BA, Graham MA, Town CD, VandenBosch KA (2007) Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *Plant J* 51: 262-280
- Smirnoff N, Conklin PL, Loewus FA (2001) BIOSYNTHESIS OF ASCORBIC ACID IN PLANTS: A Renaissance. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 52: 437-467
- Smirnoff N, Wheeler GL (2000) Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 35: 291-314
- Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, Osborne E, Paredez A, Persson S, Raab T, Vorwerk S, Youngs H (2004) Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* 306: 2206-2211
- Souter M, Topping J, Pullen M, Friml J, Palme K, Hackett R, Grierson D, Lindsey K (2002) *hydra* Mutants of *Arabidopsis* are defective in sterol profiles and auxin and ethylene signaling. *Plant Cell* 14: 1017-1031

- Stevenson TT, Furneaux RH (1991) Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. *Carbohydr Res* 210: 277-298
- Stitt M (1989) Product inhibition of potato tuber pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase by phosphate and pyrophosphate. *Plant Physiol* 89: 628-633
- Stotz HU, Spence B, Wang Y (2009) A defensin from tomato with dual function in defense and development. *Plant molecular biology* 71: 131-143
- Sun S, Wang H, Yu H, Zhong C, Zhang X, Peng J, Wang X (2013) GASA14 regulates leaf expansion and abiotic stress resistance by modulating reactive oxygen species accumulation. *Journal of experimental botany* 64: 1637-1647
- Tabata K, Oba K, Suzuki K, Esaka M (2001) Generation and properties of ascorbic acid-deficient transgenic tobacco cells expressing antisense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *The Plant Journal* 27: 139-148
- Taylor BH, Scheuring CF (1994) A molecular marker for lateral root initiation: the RSI-1 gene of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) is activated in early lateral root primordia. *Molecular & general genetics* : MGG 243: 148-157
- Thordal-Christensen H, Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, D. B. (1997) Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal* 11: 1187-1194
- Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols* 7: 562-578
- Tsukaya H (2008) Controlling size in multicellular organs: focus on the leaf. *PLoS Biol* 6: e174
- Tsukaya H, Beecher GT (2006) Genetics, cell cycle and cell expansion in organogenesis in plants. *J Plant Res* 119: 1-4
- Valpuesta V, Botella MA (2004) Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends Plant Sci* 9: 573-577
- Van Breusegem F, Dat JF (2006) Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol* 141: 384-390
- Van Breusegem F, Vranova, F. E., James F. Dat, J. F., Inze, D. (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* 161: 405-414
- Van den Ende W, Valluru R (2009) Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? *Journal of experimental botany* 60: 9-18
- Vanstraelen M, Benkova E (2012) Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annual review of cell and developmental biology* 28: 463-487
- Verkest A, Manes CL, Vercruyse S, Maes S, Van Der Schueren E, Beeckman T, Genschik P, Kuiper M, Inze D, De Veylder L (2005) The cyclin-dependent kinase inhibitor KRP2 controls the onset of the endoreduplication cycle during Arabidopsis leaf development through inhibition of mitotic CDKA<sub>1</sub> kinase complexes. *Plant Cell* 17: 1723-1736
- Vogel JP, Raab TK, Schiff C, Somerville SC (2002) PMR6, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in Arabidopsis. *Plant Cell* 14: 2095-2106
- Vogel JP, Raab TK, Somerville CR, Somerville SC (2004) Mutations in PMR5 result in powdery mildew resistance and altered cell wall composition. *Plant J* 40: 968-978
- Voxeur A, Gilbert L, Rihouey C, Driouich A, Rothan C, Baldet P, Lerouge P (2011) Silencing of the GDP-D-mannose 3,5-epimerase affects the structure and cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II and plant growth in tomato. *The Journal of biological chemistry* 286: 8014-8020
- Vranova E, Inze D, Van Breusegem F (2002) Signal transduction during oxidative stress. *Journal of experimental botany* 53: 1227-1236
- Wada M, Kato H, Malik K, Sriprasertsak P, Ichinose Y, Shiraishi T, Yamada T (1995) A suppressin from a phytopathogenic fungus deactivates transcription of a plant defense gene encoding phenylalanine ammonia-lyase. *Journal of molecular biology* 249: 513-519
- Wang H, Zhou Y, Gilmer S, Whitwill S, Fowke LC (2000) Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J* 24: 613-623
- Wang L, Wang Z, Xu Y, Joo SH, Kim SK, Xue Z, Xu Z, Chong K (2009) OsGSR1 is involved in crosstalk between gibberellins and brassinosteroids in rice. *Plant J* 57: 498-510
- Wang Z, Xiao Y, Chen W, Tang K, Zhang L (2010) Increased vitamin C content accompanied by an enhanced recycling pathway confers oxidative stress tolerance in Arabidopsis. *Journal of integrative plant biology* 52: 400-409

- Wang ZY, Nakano T, Gendron J, He J, Chen M, Vafeados D, Yang Y, Fujioka S, Yoshida S, Asami T, Chory J (2002) Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Developmental cell* 2: 505-513
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnov N (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393: 365-369
- Wigoda N, Ben-Nissan G, Granot D, Schwartz A, Weiss D (2006) The gibberellin-induced, cysteine-rich protein GIP2 from *Petunia hybrida* exhibits in planta antioxidant activity. *Plant J* 48: 796-805
- Wohlgemuth H, Mittelstrass K, Kschieschan S., Bender J., Weigel H.-J., Overmeyer K, Kangasjarvi J., Sandermann H., Langebartels G. (2002) Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant, Cell and Environment* 25: 717-726
- Yamaguchi S (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual review of plant biology* 59: 225-251
- Yin L, Wang S, Eltayeb AE, Uddin MI, Yamamoto Y, Tsuji W, Takeuchi Y, Tanaka K (2010) Overexpression of dehydroascorbate reductase, but not monodehydroascorbate reductase, confers tolerance to aluminum stress in transgenic tobacco. *Planta* 231: 609-621
- Yin Y, Wang ZY, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, Asami T, Chory J (2002) BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* 109: 181-191
- Zhang S, Wang X (2008) Expression pattern of GASA, downstream genes of DELLA, in *Arabidopsis*. *Chinese Science Bulletin* 53: 3839-3846
- Zhang S, Wang X (2011) Overexpression of GASA5 increases the sensitivity of *Arabidopsis* to heat stress. *Journal of plant physiology* 168: 2093-2101
- Zhang S, Yang C, Peng J, Sun S, Wang X (2009) GASA5, a regulator of flowering time and stem growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology* 69: 745-759
- Zimmermann R, Sakai H, Hochholdinger F (2010) The Gibberellic Acid Stimulated-Like gene family in maize and its role in lateral root development. *Plant Physiol* 152: 356-365

## Anexo



**Figura suplementaria 1. Inhibición del crecimiento del hongo en placa.** Se obtuvieron extractos crudos de planta a partir de 2 gramos de hojas de las líneas transgénicas y el control homogeneizado en 5 ml de buffer fosfato. Se inocularon placas conteniendo medio PDA y el extracto (concentración final 3,75 v/v) con *Sclerotinia sclerotiorum* y se incubaron a 28°C por 5 días en oscuridad. Se realizaron dos experimentos independientes con 4 réplicas por tratamiento. (a) Efecto de los extractos proteicos crudos de hoja sobre el crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* a 3dpi. (b) Se midió el crecimiento del hongo fue (diámetro) y se calculó el porcentaje de inhibición a 5 dpi (el diámetro total de la placa se consideró como 100%).