

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Instituto de Biotecnología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

Análisis funcional del factor de transcripción ASR1 desde
una perspectiva metabólica, fisiológica y molecular en
plantas de tabaco y tomate

Bioq. Pía Guadalupe Domínguez

Director: Dr. Fernando Carrari

Consejera de estudios: Dra. Susana Gallego

2014

A Silvia, Jorge, Florencia y Nahuel

Agradecimientos

A la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICET)

A la directora del Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas del INTA Castelar, Dra. Elisa Carrillo, y a la directora del Instituto de Biotecnología, Dra. Ruth Heinz

Al Dr. Fernando Carrari

A la Dra. Susana Gallego

A los integrantes de la comisión de seguimiento de tesis del Instituto

A todos mis amigos y compañeros del Instituto

Índice

Índice	1
Abreviaturas	6
Capítulo 1: Introducción general	7
1.1. El metabolismo primario en plantas	8
1.2. La familia de proteínas ASR: una revisión histórica y funcional	11
1.2.1. Características generales	11
1.2.2. Organización de la familia de genes <i>Asr</i> en distintas especies y evolución	11
1.2.3. El rol de ASR1 y otros parálogos en estrés	12
1.2.4. El rol de ASR1 y otros parálogos en el metabolismo	16
1.3. <i>Solanaceae</i>	17
1.3.1. Breve reseña sobre las familias de <i>Solanaceae</i>	17
1.3.2. Características generales de tomate y tabaco	18
1.3.3. Herramientas aplicadas a estudios funcionales en <i>Solanaceae</i>	20
1.4. Definición del problema, hipótesis y objetivos	21
Capítulo 2: Análisis funcional de ASR1 en plantas de tabaco	23
2.1. Introducción	24
2.2. Resultados	28
2.2.1. Obtención de líneas transgénicas homocigotas y análisis de los niveles de expresión de <i>Asr1</i>	28
2.2.2. Las plantas silenciadas muestran dramáticos cambios en su fenotipo	29
2.2.3. Las plantas silenciadas poseen los parámetros fotosintéticos alterados	30
2.2.4. Las plantas silenciadas poseen alteraciones en los niveles de glucosa en sus hojas	32
2.2.5. Las plantas transgénicas poseen alteraciones en los niveles de ABA y giberelinas en las hojas	33
2.2.6. Las plantas silenciadas mantienen la sensibilidad a GA3 en sus tallos	36
2.2.7. Las plantas silenciadas tienen niveles de expresión alterados de transportadores y sensores de azúcares	37
2.3. Discusión	39
2.3.1. Los niveles de glucosa se encuentran afectados por los niveles del transportador <i>Ht1</i> en las hojas de las líneas silenciadas	39
2.3.2. Los niveles hormonales en las hojas de las líneas silenciadas están afectados por los niveles de glucosa	40
2.3.3. Las líneas silenciadas presentan síntomas de senescencia acelerada	41
2.3.4. Otras alteraciones fenotípicas en las líneas silenciadas pueden estar dadas por alteraciones en el metabolismo de la glucosa y hormonales	42
2.4. Conclusiones	45
Capítulo 3: Análisis funcional de ASR1 en plantas de tomate	46
3.1. Introducción	47
3.2. Resultados	50
3.2.1. Obtención y selección de plantas transgénicas de tomate con niveles alterados de <i>Asr1</i>	50
3.2.2. Análisis fenotípico de las plantas transgénicas de tomate	57
3.2.3. Análisis de los niveles de hidratos de carbono solubles en las líneas transgénicas de tomate	59
3.2.4. Análisis de los perfiles metabólicos de frutos y hojas de las líneas transgénicas de tomate	59

3.2.5. Análisis de los perfiles transcriptómicos de los frutos de las líneas transgénicas AS 35S:: <i>Asr1</i>	66
3.2.6. Identificación de motivos sobrerrepresentados en las secuencias regulatorias de los genes analizados en los microarreglos	73
3.2.7. Análisis integrado de metabolitos y transcriptos	81
3.3. Discusión	87
3.3.1. Niveles de expresión de <i>Asr1</i> en los clones de tomate cultivados en los distintos experimentos	87
3.3.2. Interacciones genotipo x ambiente se evidencian en las líneas transgénicas <i>Asr1</i>	88
3.3.2.1. Análisis fenotípicos	88
3.3.2.2. Las líneas transgénicas no muestran alteraciones en los niveles de azúcares solubles	89
3.3.2.3. Las líneas transgénicas muestran alteraciones en el metabolismo de aminoácidos en los frutos	90
3.3.3. <i>Asr1</i> media la regulación de genes de respuesta a estreses en los frutos de tomate	93
3.3.4. ASR1 estaría involucrado en la vía de las citoquininas mediada por LRR1 y en la vía del metabolismo de la pared celular mediada por KAP-2 en los frutos de las líneas silenciadas	95
3.3.5. ASR1 media la regulación del metabolismo de nucleótidos	98
3.4. Conclusiones	101
Capítulo 4: Consideraciones finales	102
4.1. Antecedentes de estudios funcionales de ASR1 en plantas transgénicas	103
4.2. ASR1 está involucrado en el metabolismo de azúcares de manera diferencial de acuerdo a la especie y al tejido	103
4.3. ASR1 está involucrado en el metabolismo de aminoácidos en distintas especies y tejidos	104
4.4. ASR1 está involucrado en las vías de las hormonas ABA, giberelinas y citoquininas	104
4.5. ASR1 media vías de estreses generales y de maduración de los frutos	105
4.6. Conclusiones finales	106
Capítulo 5: Materiales y métodos	107
5.1. Condiciones de cultivo y crecimiento de las plantas de tabaco	108
5.2. Selección de las plantas transgénicas de tabaco	108
5.3. Extracción del ARN total	108
5.4. Síntesis del ADN copia	109
5.5. PCR a tiempo final	110
5.6. PCR cuantitativas o en tiempo real (<i>qPCR</i>)	110
5.7. Diseño de oligonucleótidos	111
5.8. Caracterización fenotípica de las plantas de tabaco	111
5.9. Medición de H ₂ O ₂ en hojas de tabaco	112
5.10. Medición de la asimilación de CO ₂ , transpiración y conductancia estomática en plantas de tabaco	112
5.11. Análisis de proteínas totales en hojas de tabaco	112
5.12. Medición de azúcares en hojas de tabaco	113
5.13. Obtención y análisis del exudado floemático de hojas de tabaco	114
5.14. Medición de ABA y de giberelinas en hojas de tabacos	115
5.15. Ensayo de sensibilidad a ácido giberélico (GA3) de las plantas de tabaco	115
5.16. Detección de ASR1 a través de <i>Western blot</i>	116
5.17. Medición de la expresión de genes de transportadores y sensores de azúcares a través de <i>PCR</i> cuantitativas en hojas de tabaco transgénicas	116
5.18. Generación de plantas transgénicas de tomate con <i>Asr1</i> en sentido y en antisentido	117

5.18.1. Clonado de <i>Asr1</i>	117
5.18.2. Transformación de plantas de tomate	117
5.18.3. Selección de las plantas transgénicas	118
5.18.3.1. <i>Northern blot</i> de <i>Asr1</i> en hojas de líneas 35S:: <i>Asr1-sense</i> y 35S:: <i>Asr1-antisense</i>	119
5.18.3.2. Evaluación de los niveles de expresión del transgén en las líneas 35S:: <i>Asr1-sense</i> y 35S:: <i>Asr1-antisense</i>	120
5.18.3.3. Evaluación de los niveles de expresión del transgén en las líneas B33:: <i>Asr1-sense</i> y B33:: <i>Asr1-antisense</i>	120
5.19. Elección del gen de referencia en plantas de tomate	120
5.20. Condiciones de medición de las plantas de tomate y niveles de <i>Asr1</i> durante los experimentos realizados	121
5.21. Caracterización fenotípica de las plantas de tomate	122
5.22. Medición de la conductancia estomática en plantas de tomate	122
5.23. Medición de azúcares solubles en hojas y frutos de tomate	123
5.24. Medición de metabolitos en hojas y frutos de tomate por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS)	123
5.25. Análisis de perfiles transcripcionales de frutos maduros de tomates de líneas silenciadas	125
5.25.1. Extracción del ARNm	125
5.25.2. Síntesis del ARN copia marcado e hibridación de los microarreglos	125
5.25.3. Análisis de datos de los microarreglos	125
5.25.3.1. Control de calidad de las hibridaciones de los microarreglos	125
5.25.3.2. Normalización de los datos de microarreglos	128
5.25.4. Clasificación de los genes estadísticamente significativos	131
5.26. Medición de los niveles de expresión de los genes de los microarreglos por <i>qPCR</i>	131
5.27. Identificación de motivos sobrerrepresentados en las secuencias regulatorias en <i>cis</i> de los genes medidos a través de los microarreglos	132
5.28. Estudio de la textura de frutos de tomate	132
5.29. Análisis integrados de los datos de metabolómica y transcriptómica	133
5.30. Análisis estadísticos	134
Anexo	135
Tabla 1. Análisis fenotípico de las líneas transgénicas de tomate para <i>Asr1</i> bajo los promotores 35S y B33	136
Tabla 2. Mediciones de conductancia estomática en hojas de plantas de tomate transgénicas para <i>Asr1</i> bajo el control del promotor 35S	138
Tabla 3. Contenidos de glucosa, sacarosa y/o fructosa en frutos con los niveles de <i>Asr1</i> alterados bajo el promotor 35S y B33	139
Tabla 4. Contenidos de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) en hojas de plantas con los niveles de <i>Asr1</i> alterados bajo el promotor 35S y bajo el promotor B33	140
Tabla 5. Metabolitos de hojas fuentes de plantas de tomate con <i>Asr1</i> en sentido (S) y en antisentido (AS) bajo el promotor 35S en el Experimento I	141
Tabla 6. Metabolitos de hojas fuentes de plantas de tomate con <i>Asr1</i> en sentido (S) y en antisentido (AS) bajo el promotor 35S en el experimento II	143
Tabla 7. Metabolitos de hojas fuentes de plantas de tomate con <i>Asr1</i> en sentido (S) y en antisentido(AS) bajo el promotor B33 en el experimento II	145

Tabla 8. Metabolitos de hojas fuentes de plantas de tomate con <i>Asr1</i> en sentido (S) y antisentido (AS) bajo el promotor 35S en el experimento	147
Tabla 9. Metabolitos de hojas fuentes de plantas de tomate con <i>Asr1</i> en sentido (S) y antisentido (AS) bajo el promotor B33 en el experimento III	149
Tabla 10. Metabolitos de frutos maduros de plantas de tomate con <i>Asr1</i> en sentido (S) y en antisentido (AS) bajo el promotor 35S en el experimento I	151
Tabla 11. Metabolitos de frutos maduros de plantas de tomate con <i>Asr1</i> en sentido (S) y en antisentido (AS) bajo el promotor 35S en el experimento II	152
Tabla 12. Metabolitos de frutos maduros de plantas de tomate con <i>Asr1</i> en sentido (S) y en antisentido (AS) bajo el promotor B33 en el experimento II	154
Tabla 13. Metabolitos de frutos maduros de plantas de tomate con <i>Asr1</i> en sentido (S) y antisentido (AS) bajo el promotor 35S en el experimento III	156
Tabla 14. Metabolitos de frutos maduros de plantas de tomate con <i>Asr1</i> en sentido (S) y antisentido (AS) bajo el promotor B33 en el experimento III	158
Tabla 15. Identificación de las sondas cuyos niveles de expresión resultaron significativamente disminuidos en comparación con las plantas controles ($p < 0,05$) en al menos una de las líneas silenciadas AS5 o AS17 para <i>Asr1</i> bajo el promotor 35S	160
Tabla 16. Identificación de las sondas cuyos niveles de expresión resultaron significativamente aumentados ($p < 0,05$) en comparación con las plantas controles en al menos una de las líneas silenciadas AS5 o AS17 para <i>Asr1</i> bajo el promotor 35S	165
Tabla 17. Validación técnica de los niveles del ARNm de algunos genes estadísticamente significativos en los microarreglos (tablas 15 y 16 del anexo) en frutos maduros de plantas de tomate que silencian <i>Asr1</i> bajo el promotor 35S en el experimento I medidos por <i>qPCR</i>	173
Tabla 18. Validación biológica de los niveles del ARNm de genes estadísticamente significativos en los microarreglos (tablas 15 y 16 del anexo) en frutos maduros de plantas que silencian <i>Asr1</i> bajo el promotor 35S medidos por <i>qPCR</i> en un experimento independiente (experimento III)	174
Tabla 19. Lista de genes con el motivo <i>H-box</i> (Lindsay <i>et al.</i> , 2002; Yu <i>et al.</i> , 1993) en 1500 pares de bases antes del codón ATG	176
Tabla 20. Lista de genes con el motivo GAAATCA (Sakai <i>et al.</i> , 2000; Ross <i>et al.</i> , 2004) en 1500 pares de bases antes del codón ATG	177
Tabla 21. Listado de transcritos y metabolitos agrupados en cada neurona, obtenidos con el programa *omeSOM	179
Tabla 22. Tabla de oligonucleótidos empleados	187
Referencias bibliográficas	190
Resumen	214

Abreviaturas

[6-D]ABA: ácido abscísico marcado en la posición 6 con deuterio

ABA: ácido abscísico

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia generado por retrotranscripción a partir de ARNm

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

AS: plantas *antisense*

B33: promotor del gen patatina de *Solanum tuberosum*

ChIP: inmunoprecipitación de cromatina (de sus siglas en inglés: *chromatin immunoprecipitation*)

CRE: elemento(s) regulatorio(s) en *cis* (de sus siglas en inglés: *cis-Regulatory Elements*)

Ct: ciclo umbral de una *PCR* en tiempo real (de sus siglas en inglés: *threshold cycle*)

Cv: cultivar

dNTP: desoxirribonucleótidos-trifosfato (de sus siglas en inglés: *deoxynucleotide triphosphates*)

EE: error estándar

EST: marcador de secuencia expresada (de sus siglas en inglés: *expressed sequence tag*)

Et al.: y otros (de sus siglas en latín: *et alia*)

GA: giberelina(s)

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

HPLC-MS/MS: cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masa en tándem (de sus siglas en inglés: *high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*).

Hr: humedad relativa

MS: medio Murashige y Skoog

NB: *Northern blot*

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NptII: gen de la neomicina fosfotransferasa (*neomycin phosphotransferase II*), que confiere resistencia a la kanamicina en plantas de tabaco y tomate

OCS: terminador del gen octopina sintasa (*octopine synthase*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (de sus siglas del inglés: *polymerase chain reaction*)

PFD: densidad de flujo de fotones (de sus siglas en inglés: *photon flux density*)

PTGS: silenciamiento génico postranscripcional (de sus siglas del inglés: *post-transcriptional gene silencing*)

QTL: *loci* de carácter cuantitativo (de sus siglas del inglés: *quantitative trait loci*)

ROS: especie reactiva del oxígeno (de sus siglas en inglés: *reactive oxygen species*)

RT-qPCR o qPCR: *PCR* cuantitativa a partir de ADNc (de sus siglas en inglés: *quantitative reverse transcription PCR* o *quantitative PCR*)

S: plantas *sense*

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (de sus siglas en inglés: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SGN: *Sol Genomics Network* (base de datos de Solanáceas)

TAE: *buffer* que contiene Tris base, ácido acético y EDTA

VIGS: silenciamiento génico inducido por virus (de sus siglas en inglés: *virus-induced gene silencing*)

WB: *Western blot*

WT: plantas *wild-type* o controles

Capítulo 1

Introducción general

1.1. El metabolismo primario en plantas

El metabolismo primario de las plantas comprende aquellas vías metabólicas esenciales para su crecimiento y desarrollo, en oposición al metabolismo secundario, que en términos generales provee ventajas adaptativas (Staniek *et al.*, 2013). Las vías metabólicas primarias incluyen el metabolismo de los azúcares y fotosíntesis, de los aminoácidos, de los nucleótidos, entre otros (figura 1). Su importancia radica en que están directamente ligadas a todos los procesos básicos de la vida de una planta: la fotosíntesis, la respiración, el transporte de solutos, la asimilación de nutrientes, la síntesis de proteínas, la diferenciación, etcétera. Las vías metabólicas primarias son ubicuas en el reino *Plantae*, a diferencia de las vías metabólicas secundarias que son específicas de ciertas especies.

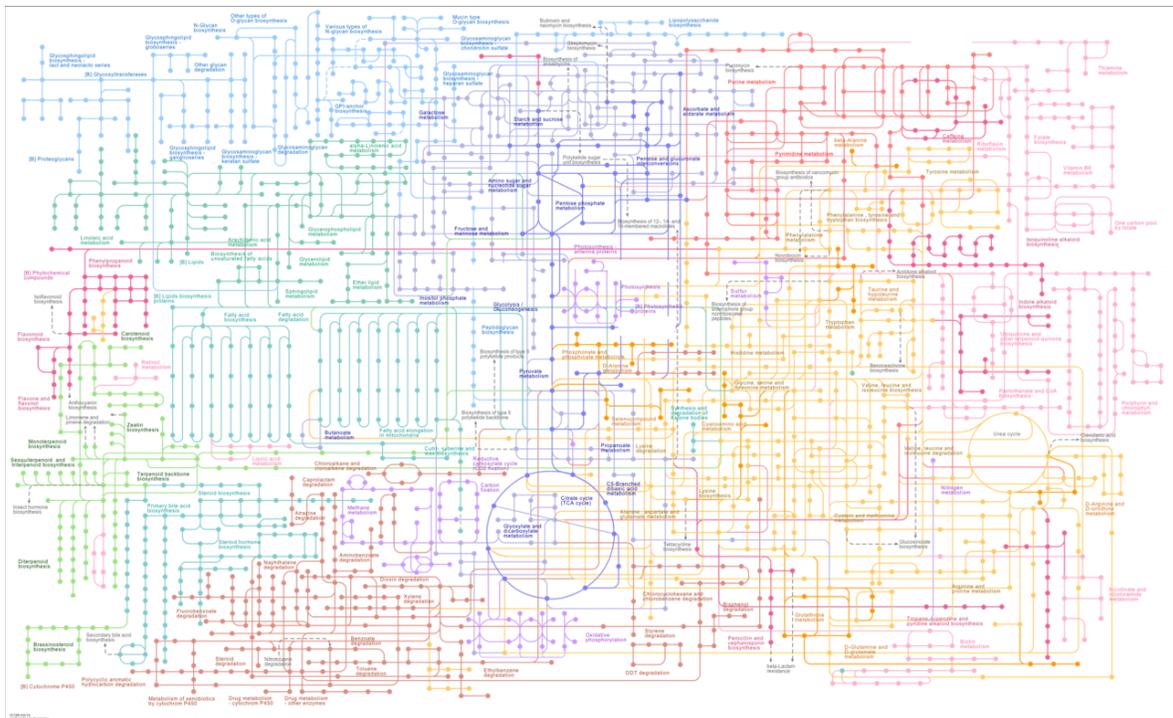


Figura 1. Esquema global del metabolismo primario obtenido de la base de datos Kegg (Ogata *et al.*, 1999). Cada punto representa un metabolito y cada color una vía (celeste: glicanos; verde oscuro: lípidos; azul: azúcares; violeta: metabolismo energético; naranja aminoácidos; rojo: nucleótidos; rosa: cofactores y vitaminas; el resto no pertenecen al metabolismo primario pero se encuentran en estrecha relación).

La fotosíntesis es el proceso básico del metabolismo vegetal [recientemente revisada por Evans (2013) y Minagawa (2013)]. Durante la misma, la energía lumínica se convierte en energía electroquímica a través de numerosos supercomplejos de membrana. Esa energía es empleada eventualmente para asimilar el CO_2 . La eficiencia de la fotosíntesis depende de numerosos factores ambientales tales como la calidad y la cantidad de luz,

temperatura, agua y concentraciones de CO₂, entre otros. Si bien es una visión simplista considerar que la tasa de crecimiento de las plantas depende exclusivamente de la tasa fotosintética, existe una íntima asociación entre esta y las vías metabólicas asociadas a la producción de energía como el ciclo de las pentosas fosfato, el ciclo de Krebs, el transporte de electrones mitocondrial, la síntesis de ATP y la biosíntesis de algunos aminoácidos como la lisina y la metionina, cuyo catabolismo lleva a la producción energética, así como la biosíntesis de ácido glutámico, arginina, serina y glicina están asociados a la fotorrespiración (Less *et al.*, 2011). La síntesis y degradación de sacarosa y almidón comparten intermediarios con estas vías y dan origen al *pool* de hexosas de la célula (Ciereszko *et al.*, 2001; Sturm y Tang, 1999). A nivel fisiológico, los azúcares proveen el carbono y la energía necesarios para los procesos metabólicos vegetales. Además, actúan como moléculas de señalización en un gran número de procesos tales como el crecimiento, el desarrollo y la senescencia (Rolland *et al.*, 2006; Baena-González y Sheen, 2008; Hanson y Smeekens, 2009; Eveland y Jackson, 2012). Las vías de señalización de los azúcares interactúan extensamente con las vías de señalización hormonales y estas interacciones son parcialmente responsables del control de los procesos fisiológicos (Rolland *et al.*, 2006; Eveland y Jackson, 2012).

Como se mencionó, todos los compuestos orgánicos de las células vegetales tienen su origen en el carbono provisto por los azúcares. Los aminoácidos no sólo son vitales porque constituyen las proteínas sino porque sirven también de precursores de una enorme cantidad de metabolitos con múltiples funciones en el crecimiento y en la respuesta de la planta a varios tipos de estreses. Por ejemplo, los aminoácidos aromáticos triptófano, fenilalanina y tirosina son usados como precursores en numerosos productos naturales como pigmentos, alcaloides, hormonas y componentes de la pared celular (Maeda y Dudareva, 2012). Los lípidos constituyen un grupo amplio de moléculas que tienen diversas funciones biológicas. Proveen componentes estructurales de la pared celular y de la membrana celular, y a su vez proveen energía para el metabolismo (Welti *et al.*, 2007). También median numerosos procesos celulares como la transducción de señales, los rearrreglos del citoesqueleto y el tráfico de membrana (Wang, 2004).

El control de las vías metabólicas es ejercido sobre las enzimas y los transportadores que componen una vía a distintos niveles de regulación (transcripcional, traduccional y postraduccional). Cada nivel de regulación posee a su vez una enorme complejidad y a través de la integración fina de todos esos niveles se logra la homeóstasis metabólica, necesaria para la correcta interacción de la planta con el medio. Un nivel de control muy importante sobre la regulación génica es el inicio de la transcripción, y esto se refleja en el alto porcentaje del genoma dedicado a factores de transcripción en plantas (Singh, 1998).

Se han descrito factores de transcripción que participan en la regulación de las vías de los aminoácidos (Tzin y Galili, 2010), azúcares (Cakir *et al.*, 2003) y fotosíntesis (Saibo *et al.*, 2009). Sin embargo, sólo en los últimos años se ha profundizado en el conocimiento de sus genes blancos y en la descripción de las redes génicas en las cuales participan, con una clara preponderancia de los estudios sobre factores de transcripción relacionados con respuestas a estrés (Golldack *et al.*, 2014; Ambawat *et al.*, 2013; Nuruzzaman *et al.*, 2013).

Asimismo, la regulación del metabolismo primario tiene importantes consecuencias en las especies de interés agronómico a través del efecto sobre la fisiología de las plantas en cultivo. En ese sentido, los factores de transcripción proveen una solución atractiva para alterar características complejas aunque en algunos casos se observan efectos pleiotrópicos indeseados (Shen *et al.*, 2010). El incremento de la producción de las especies de interés agronómico está focalizado en aumentar la eficiencia de la fotosíntesis y también en la optimización de la translocación de asimilados (Stitt, 2013; Melis, 2013). Tanto el contenido de hidratos de carbono como la relación con otras moléculas intermediarias del metabolismo primario, por ejemplo el ácido cítrico y el ácido glutámico, afectan la calidad de los frutos comestibles. En el caso del fruto de tomate no sólo afecta su sabor sino también su calidad para el procesamiento en la industria del enlatado (Klee y Giovannoni, 2011; Barrett *et al.*, 2007; Fridman *et al.*, 2004). Por ejemplo, la sobreexpresión de un factor de transcripción AREB (*ABA-response element binding factor*) en tomate aumentó los niveles de metabolitos que favorecen la calidad del fruto como ácido glutámico, glucosa y fructosa (Bastías *et al.*, 2011). La ingeniería metabólica de la vía de los aminoácidos tiene como objetivo mejorar la calidad nutricional de los cultivos pero también aumentar su tolerancia a condiciones de estrés y favorecer su crecimiento (Galili y Höfgen, 2002). Por ejemplo, *Atp5CS2* codifica para una enzima que cataliza un precursor del aminoácido prolina y está regulado por el factor de transcripción CO (*Constans*), cuya sobreexpresión aumenta los niveles de prolina, un aminoácido involucrado en las respuestas frente a estrés (Samach *et al.*, 2000). La mejora del contenido de aceites en semillas de oleaginosas se da a través del conocimiento de las vías metabólicas de los lípidos (Thelen y Ohlrogge, 2002). La sobreexpresión del factor de transcripción WRI1 (*Wrinkled1*) en maíz aumentó la producción de aceite en un 48% mientras que la del factor de transcripción LEC1 (*Leafy cotyledon1*) incrementó la producción en niveles similares aunque produjo efectos fenotípicos no deseados (Shen *et al.*, 2010).

En resumen, la caracterización de las vías metabólicas primarias y su regulación es absolutamente necesaria para conocer la fisiología vegetal y mejorar cultivos agronómicamente importantes.

1.2. La familia de proteínas ASR: una revisión histórica y funcional

1.2.1. Características generales

Los genes de la familia *Asr* (por ABA, stress, ripening) han sido inicialmente caracterizados por su abundante expresión en condiciones de estrés y durante la maduración de los frutos de tomate (Iusem *et al.*, 1993; Maskin *et al.*, 2001). Sus miembros poseen como común denominador el dominio ABA/WDS (base de datos Pfam -PF02496-; Finn *et al.*, 2014). Esta familia de proteínas está ampliamente distribuida en el reino *Plantae*, tanto en angiospermas como en gimnospermas, aunque no está presente en todas las especies. En la actualidad se conocen 393 secuencias que forman parte de la familia (base de datos Pfam; Finn *et al.*, 2014). Se han encontrado miembros de ASR en Solanáceas, uva, maíz y coníferas aunque llamativamente no se encuentra ningún homólogo estructural en *Arabidopsis thaliana* (Carrari *et al.*, 2004). Las proteínas ASR son generalmente pequeñas (la masa molecular de ASR1 de tomate es 13 KDa), con una estructura exón-intrón-exón en tomate, banana y arroz (González *et al.*, 2011; Henry *et al.* 2011; Philippe *et al.*, 2010). El análisis funcional de estas proteínas, que ha resultado particularmente elusivo, históricamente se ha centrado en el primer miembro descrito: ASR1. Sin embargo, en los últimos años han surgido evidencias experimentales sobre la función de otros parálogos en varias especies distintas. Algunos autores consideran que la familia ASR pertenece al grupo de las proteínas LEA (por late embryogenesis abundant proteins) debido a su pequeño tamaño, sus propiedades fisicoquímicas y a su participación en vías de estrés (Battaglia *et al.*, 2008).

1.2.2. Organización de la familia de genes *Asr* en distintas especies y evolución

La organización de la familia de genes *Asr* varía entre las especies. Mientras que en tomate hay 5 parálogos descritos (Frankel *et al.*, 2006; Fischer *et al.*, 2011), en maíz hay 9 (Virilouvet *et al.*, 2011), en papa 3 (Dóczy *et al.*, 2005), en arroz 6 (Philippe *et al.* 2010), en banana 4 (Henry *et al.* 2011) y en melón 1 (Hong *et al.*, 2002). El número y organización de los parálogos en cada especie está en relación con la historia evolutiva. En tomate y papa, los ortólogos son más similares entre sí que entre los parálogos de una misma especie, lo cual sugiere que el origen de la familia *Asr* es antiguo (estimado en 300 millones de años) y que derivan de duplicaciones génicas anteriores a la divergencia del tomate y la papa (Frankel *et al.*, 2006). Por el contrario, en el caso de la banana y el plátano se observó que todos los parálogos se agrupan juntos en vez de agruparse con los ortólogos de otras especies, lo cual sugiere que son producto de eventos de duplicaciones recientes (Henry *et al.*, 2011). En arroz los 6 parálogos se ubican en 4 cromosomas distintos y por su localización y similitud de secuencia se cree que surgieron en tándem y de duplicaciones completas del genoma (Philippe *et al.*, 2010). Un origen similar se ha sugerido para la

familia en los *Poaceae* (Virilouvet *et al.*, 2011). Estos datos apoyan la idea de que hubo más de un gen *Asr* ancestral y el análisis de los patrones de expresión de los genes en estos trabajos sugieren que hubo un proceso de subfuncionalización, es decir, que cada parólogo habría retenido parte de la función del gen del cual se originó. La secuencia codificante de *Asr1* está altamente conservada en distintas especies de *Solanum*, a diferencia de su respuesta frente a condiciones de estrés por sequía, lo que sugiere que sus regiones regulatorias y/o sus proteínas regulatorias no están conservadas (Frankel *et al.*, 2006).

En este trabajo de Tesis se utilizan dos especies de *Solanaceae* como modelos de estudio: tomate y tabaco. En tomate, la familia *Asr* posee 5 parálogos (*Asr1* a *5*) ubicados en *cluster* en el cromosoma 4 (Fischer *et al.*, 2011; Frankel *et al.*, 2006; Frankel *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 1996; Amitai-Zeigerson *et al.*, 1994; Iusem *et al.*, 1993). La homología entre los ARNm de los parálogos es alta: *Asr1* es 84% similar a *Asr2*, 80% similar a *Asr3*, 80% similar a *Asr4* (*Asr4* tiene una inserción de 544 pares de bases antes del codón de inicio de *Asr1*) y 81% similar a *Asr5* (que a su vez es 96% similar a *Asr3*). *Asr1* se expresa en semillas, hojas, tallos, raíces y frutos de tomate (Maskin *et al.*, 2007; Maskin *et al.*, 2001). En los frutos no se detectaron variaciones en los niveles del ARNm de *Asr1* en las distintas etapas de la maduración (Maskin *et al.*, 2001). Por su parte, *Asr2* es inducido por ABA y por estrés (Maskin *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 1998). Existen evidencias recientes acerca de la regulación de la expresión de *Asr1* y *Asr2* en distintos tejidos mediada por alteraciones de la cromatina bajo condiciones de estrés (González *et al.*, 2011; González *et al.*, 2013). Además, resultados de hibridación *in situ* sugieren que *Asr2* se expresa en células acompañantes del floema y en condiciones de estrés se expresa además en las células del mesófilo mientras que la expresión de *Asr1* en hojas pareciera ser específica del tejido vascular (Maskin *et al.*, 2007).

La información respecto de esta familia de genes en tabaco es mucho más acotada. Por búsqueda por homología en bases de datos se sabe que en tabaco existen dos miembros, *Asr1* y *Asr2* (*Sol Genomics Network*; Bombarely *et al.*, 2011).

1.2.3. El rol de ASR1 y otros parálogos en estrés

Las evidencias de la participación de ASR1 en las vías de respuestas a estreses biótico y abiótico son muy amplias. Existen una enorme cantidad de especies en las cuales ASR1 se induce por tratamientos con ácido abscísico (ABA). Entre ellas, frutilla (Chen *et al.*, 2011), tomate (Amitai-Zeigerson *et al.*, 1995; Maskin *et al.*, 2001), uva (Cakir *et al.*, 2003), arroz (Joo *et al.*, 2013) y lirio (Yang *et al.*, 2005).

Por otro lado, también se ha corroborado que los niveles del ARNm de *Asr1* y/o su proteína aumentan bajo distintos tipos de tratamiento de estrés en varias especies. Entre ellas, en tabaco por estrés osmótico y/o por sequía (Kalifa *et al.* 2004b; Jha *et al.* 2012; Hu *et al.* 2013), en tomate por estrés por sequía y osmótico (Iusem *et al.* 1993; Amitai-Zeigersona *et al.*, 1995), en maíz por estrés por sequía (Virilouvet *et al.*, 2011; Riccardi *et al.*, 1998), en arroz por estrés por sequía, salino y osmótico (Philippe *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2004; Kawasaki *et al.*, 2001; Vaidyanathan *et al.*, 1999), en plátano por estrés osmótico y biótico (Dai *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2010), en banana por estrés osmótico y heridas (Henry *et al.*, 2011), en lirio por estrés por sequía y salino (Yang *et al.*, 2005) y en la halófito *Salicornia brachiata* por estrés salino (Jha *et al.*, 2012). En relación con este patrón de expresión, varios tejidos naturalmente expuestos a condiciones de sequía como el polen de lirio (Huang *et al.*, 2000) y las semillas de tomate también expresan altos niveles de ASR (Wang *et al.*, 2013; Maskin *et al.*, 2007).

Asimismo, se han llevado a cabo estudios fisiológicos en los cuales se demuestra que los niveles de ASR1 tienen relación con la tolerancia a estrés a través de ensayos de desafío de plantas transgénicas con niveles alterados de ASR1. Se observó un aumento de la tolerancia a estrés salino en plántulas de tabaco por sobreexpresión de ASR1 de tomate (Kalifa *et al.*, 2004) (figura 2). Plantas de maíz que sobreexpresan *Asr1* mostraron mejoras en la producción en condiciones de sequía (Virilouvet *et al.*, 2011). La sobreexpresión de

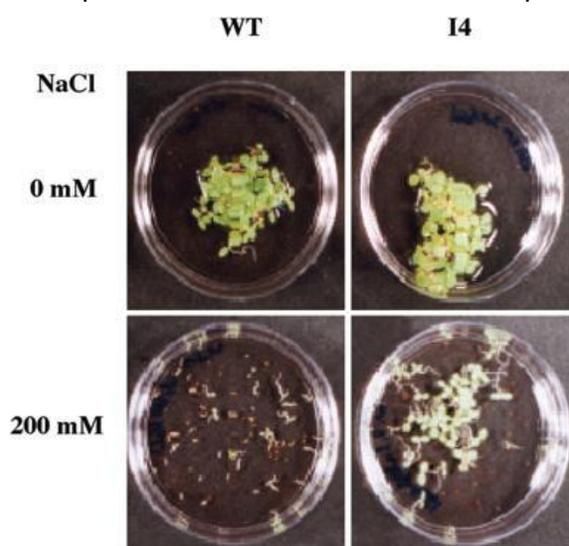


Figura 2. Crecimiento de plántulas de tabaco que sobreexpresan *Asr1* de tomate (I4) y controles (WT) en ausencia y presencia de NaCl (0 mM y 200 mM, respectivamente) (Kalifa *et al.*, 2004).

OsASR1 y OsASR3 en arroz aumentó la tolerancia a estrés por frío y por sequía (Joo *et al.*, 2013). Se observó un aumento de la tolerancia a estrés salino en arábidopsis por la expresión heteróloga de ASR1 de tomate (Yang *et al.*, 2005) y a estrés osmótico e hídrico en plantas de arábidopsis que expresan ASR de plátano (Dai *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2010). Por otro lado, en arábidopsis que expresan heterológamente ASR de lirio se observó una mayor tolerancia al estrés por frío acompañada por aumentos en la expresión de genes relacionados con ese tipo de estrés (Hsu *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2008). Sin embargo, en frutos de tomate expuestos a frío se observó una disminución de ASR1 (Sanchez-Bel *et al.*, 2012). La

sobreexpresión de ASR1 de la halófila *Salicornia brachiata* en tabaco aumentó la tolerancia de las plantas en estrés salino (Jha *et al.*, 2012).

La tolerancia a estrés mediada por ASR1 estaría dada por distintos mecanismos, que presumiblemente funcionan de manera simultánea y sinérgica. Por un lado, existen evidencias que indican que ASR1 puede actuar en el citoplasma como una proteína del tipo chaperona. Este tipo de proteínas pueden estabilizar la estructura de otras proteínas sin requerimiento de ATP para llevar a cabo su función como las chaperonas propiamente dichas (Konrad y Bar-Zvi, 2008). Los ensayos realizados *in vitro* con la proteína ASR1 de tomate, de plátano y de lirio muestran que ASR1 logra evitar la desnaturalización de enzimas como la lactato deshidrogenasa frente a tratamientos de congelado y descongelado o calentamiento (Dai *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2011; Konrad and Bar-Zvi, 2008). Incluso se probó que ASR1 de tomate actúa sinérgicamente con el osmolito glicin-betaína, que a su vez se acumula bajo condiciones de estrés (Konrad y Bar-Zvi, 2008).

Por otro lado ASR1 también actúa como factor de transcripción. Desde su descubrimiento se sabe que ASR1 se localiza tanto en el núcleo (Iusem *et al.* 1993; Cakir *et al.* 2003; Kalifa *et al.* 2004a; Yang *et al.* 2012) como en el citoplasma (Kalifa *et al.* 2004a). Además varios autores probaron que ASR1 tiene la capacidad de unirse al ADN (Cakir *et al.*, 2003; Kalifa *et al.*, 2004a; Rom *et al.*, 2006; Maskin *et al.*, 2007). Recientemente, se ha encontrado que ASR1 interactúa con regiones regulatorias de genes relacionados con la síntesis y remodelado de la pared celular así como también de canales de transporte de solutos como acuaporinas y, más aún, los niveles de esos genes se encontraron alterados en plantas de tomate con niveles alterados de ASR1 (Ricardi *et al.*, 2014). En este trabajo además se describió la secuencia consenso de *Asr1* de unión al ADN (figura 3), similar a la obtenida anteriormente por la técnica de SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) (Kalifa *et al.*, 2004a). Por otro lado, ASR1 puede formar un heterodímero con el factor de transcripción asociado a estrés DREB (*drought response element binding protein*) en uva (Saumonneau *et al.*, 2008). La versatilidad de las proteínas ASR podría ser aún mayor. Hu *et al.* (2013) sobreexpresaron ASR1 de trigo en plantas de tabaco y vieron que la tolerancia a estrés

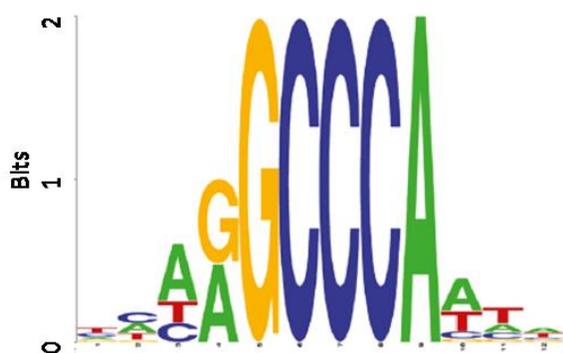


Figura 3. Gráfico de logo de la secuencia consenso de reconocimiento por ASR1 de tomate (Ricardi *et al.*, 2014). El tamaño de la letra es proporcional a la frecuencia de ese nucleótido en esa posición.

osmótico y por sequía que presentaban las plantas se puede explicar por una alteración en la transcripción de genes relacionados con estrés y además por la activación del sistema antioxidante. Incluso se ha sugerido que las proteínas ASR1 de arroz y de soja serían en sí mismas depuradoras de especies reactivas del oxígeno (Li *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2012).

El estudio de las características fisicoquímicas de la proteína ASR1 de tomate permitió proponer un modelo que muestra los cambios estructurales de ASR1 (Goldgur *et al.* 2007). En solución, la proteína ASR1 posee una estructura en forma de ovillo al azar (*random-coil*), es decir, completamente desnaturalizada (figura 4A). La proteína ASR1 de plátano y una proteína ASR de soja también tienen una estructura desnaturalizada en solución (Dai *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013). ASR1 llevaría a cabo su función de tipo chaperona con esta estructura (Goldgur *et al.*, 2007). El extremo amino terminal de ASR1 es capaz de unir dos átomos de zinc (Rom *et al.*, 2006) y ante la presencia de este metal la proteína adquiriría su estructura terciaria y cuaternaria, en forma de homodímeros (Ricardi *et al.* 2012; Goldgur *et al.*, 2007) (figura 4B). La estructura plegada es la que actuaría como factor de transcripción (figura 4C). Se encontraron homodímeros de ASR1 tanto en el citosol como en el núcleo y se demostró que el ensamblado de las dos subunidades puede ocurrir en el citosol (Ricardi *et al.*, 2012). El transporte de ASR1 de tomate hacia el núcleo es pasivo a través de los poros nucleares y puede ser tanto del monómero como del dímero (Ricardi *et al.*, 2012). Sin embargo, en polen de lirio la translocación de ASR hacia el núcleo no es pasiva sino que depende de un péptido señal (Yang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2005). La unión de ASR1 al ADN nuclear es dependiente de zinc (Kalifa *et al.*, 2004a) (figura 4C).

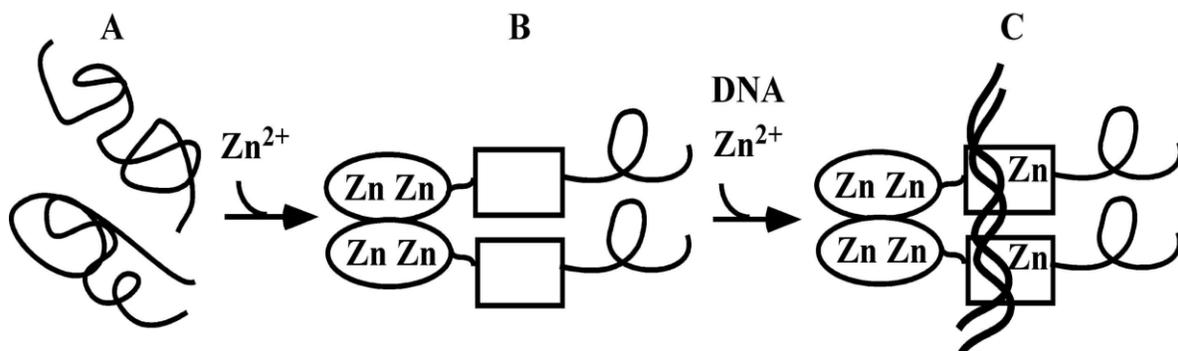


Figura 4. Esquema que describe los cambios fisicoquímicos de la proteína ASR1. (A) Estructura nativa de ASR1 (B) Adquisición de la estructura terciaria y cuaternaria de ASR1 luego de la unión a zinc (Zn) (C) Unión del homodímero de ASR1 a la hebra de ADN en presencia de Zn (Goldgur *et al.*, 2007).

Otros parálogos de *Asr1* también estarían involucrados en la respuesta a estrés. Los niveles de *Asr2* aumentan en condiciones de estrés por sequía en hojas y raíces (Maskin *et al.*, 2001) y el promotor de este responde diferencialmente a ABA en plantas transgénicas de papaya (Rossi *et al.*, 1998). Distintos ortólogos de arroz responden a estrés por sequía y al tratamiento con ABA (Pérez-Díaz *et al.*, 2014; Takasaki *et al.*, 2008). Por otro lado, la proteína ASR5 de arroz puede unirse a las regiones regulatorias de un transportador ABC STAR1 entre otros genes de tolerancia a aluminio (Arenhart *et al.*, 2014). El mecanismo que los autores proponen para la acción de ASR5 tiene similitudes con el propuesto para ASR1: ASR5 estaría presente en el cloroplasto como proteína inactiva y en respuesta a la presencia de aluminio sería liberado al núcleo para regular genes relacionados con la fotosíntesis (Arenhart *et al.*, 2012).

1.2.4. El rol de ASR1 y otros parálogos en el metabolismo

ASR1 se expresa además en condiciones ajenas a situaciones de estrés. Por ejemplo, durante la maduración del fruto del tomate y de la frutilla (Chen *et al.*, 2011; Maskin *et al.*, 2001; Iusem *et al.*, 1993). Esto indica que posee otras funciones más allá de su participación en las vías de estrés. El primer trabajo funcional publicado a este respecto fue de Çakir *et al.* (2003). En ese trabajo se probó que un ortólogo de ASR1 en uva (MSA) reconocía sitios específicos en la región regulatoria del gen de un transportador de hexosas de frutos llamado *Ht1* [descrito en Fillion *et al.* (1999), Vignault *et al.* (2005) y en Hayes *et al.* (2007)]. Además, probaron que la expresión de *Asr1* era regulada por ABA y por azúcares en los frutos (Çakir *et al.*, 2003). Esto permitió sugerir que *Asr1* es un factor de transcripción involucrado en el tráfico de azúcares cuyas señales son los azúcares y el ABA. Esto es particularmente interesante dado que los mecanismos de señalización de la interacción azúcares-hormonas no son completamente conocidos (Eveland y Jackson, 2012). Incluso se han obtenido más evidencias de la regulación de la expresión de *Asr1* de uva por ABA, glucosa y las dos proteínas más relevantes en la vía de señalización de los azúcares, la Hexoquinasa1 y SnRK1 (*Snf1-related kinase*) (Saumonneau *et al.*, 2012). El primer trabajo donde se probó fisiológicamente la relación entre ASR1 y el contenido de hexosas fue en plantas de papa transgénicas que sobreexpresaban constitutivamente ASR1 de tomate, que tuvieron reducciones significativas en los niveles de glucosa en tubérculos y simultáneamente una disminución significativa en los niveles del transportador de hexosas *Ht2* (Frankel *et al.*, 2007). Por otro lado, la sobreexpresión heteróloga de ASR de plátano en plantas de *Arabidopsis* incrementó los niveles de azúcares solubles (Dai *et al.*, 2011). Un análisis *in silico* de los motivos presentes en las regiones regulatorias de la familia ASR en arroz indicó que *Asr1*, *Asr2* y *Asr3* poseían un motivo de respuesta a represión por azúcares mientras que todos los parálogos de arroz

tenían en sus regiones regulatorias un elemento de inducción por azúcar y represión por giberelinas (Pérez-Díaz *et al.*, 2013). Joo *et al.* (2013) probaron que la expresión de ASR1 en arroz aumentaba significativamente frente al tratamiento con sacarosa y ABA mientras que ASR3 aumentaba con sacarosa, glucosa y ácido giberélico. Esto sugiere que otros parálogos de ASR1 podrían participar asimismo en la señalización azúcares-hormonas. Por otro lado, se observó que la sobreexpresión de *Asr1* de maíz aumenta la producción y disminuye los niveles de aminoácidos de cadena lateral ramificada, lo cual sugiere que la regulación de los niveles de esos metabolitos a través de ASR1 contribuye a la regulación del crecimiento vegetal (Virlovet *et al.*, 2011).

1.3. *Solanaceae*

1.3.1. Breve reseña sobre las familias de *Solanaceae*

Las *Solanaceae* o Solanáceas comprenden importantes especies vegetales, que incluyen al tomate (*Solanum lycopersicum*), la papa (*Solanum tuberosum*), el ají (*Capsicum annum*) y el tabaco (*Nicotiana tabacum*), entre otras. Existen alrededor de 3000 especies que crecen en hábitats tan variados como selvas, desiertos y montañas y aunque los miembros de esta familia están presentes en todo el mundo, la mayor diversidad se encuentra en el neotrópico (Knapp, 2002). Debido a la conservación de la organización de su genoma,



Figura 5. Fotografía de flores de *Nicotiana tabacum* (A), *Solanum lycopersicum* (B), *Petunia Hybrid* (C) y *Solanum tuberosum* (D). Fotos obtenidas de Pinterest.

estas especies son excelentes para estudios de adaptación a diversos ambientes (Wu y Tanksley, 2010). La familia es increíblemente diversa ya sea en su forma de vida (con especies que son hierbas efímeras tales como *Leptoglossis* en el desierto chileno a árboles en las selvas como *Duckeodendron* en el Amazonas) como en la morfología de sus flores (figura 5) (Knapp, 2002). Se estima que cerca de 2000 especies pertenecen al género cosmopolita *Solanum*. En cambio, otros géneros son menos abundantes, como *Nicotiana* que está representado por unas 70 especies (Hunziker y Armando, 2001). Los humanos emplean unas 18 especies de *Solanaceae* para distintos usos y aplicaciones y

aquellas especies consumidas como vegetales proveen cantidades significativas de vitaminas A y C y antioxidantes. Aunque existe una conservación del contenido génico y de la posición de los genes en varios miembros claves de *Solanaceae*, un amplio rango de

fenotipos se pueden observar entre ellos. Esta diversidad fenotípica se debería a la regulación transcripcional diferencial entre secuencias génicas similares (Moore *et al.*, 2005) o a pequeñas diferencias en la estructura génica (Somerville y Somerville, 1999).

1.3.2. Características generales de tomate y tabaco

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una planta herbácea anual, bianual o perenne, originaria de América. La mayoría de las plantas poseen crecimiento indeterminado, aunque existen algunas variedades que son semideterminadas o determinadas. Sus tallos son ramificados. Las hojas son ovadas u ovado-lanceoladas con folíolos. Las inflorescencias se componen de 3 a 7 flores. Las flores son amarillas y hermafroditas. El fruto es una baya formada por tejido epidérmico, con un pericarpio grueso y una placenta gelatinosa que envuelve a las semillas. Dentro de las *Solanaceae*, el tomate es la especie más ampliamente estudiada sobre todo a nivel de la biología de sus frutos (Seymour *et al.*, 2013; Giovannoni, 2007). Esto se debe a que tiene un genoma diploide ($n=12$) de tamaño medio (950 Mb), alta sintenia con otras *Solanaceae*, un ciclo de vida relativamente corto y a su gran importancia económica (*Tomato Genome Consortium*, 2012). Además, existe una enorme cantidad de herramientas desarrolladas para su estudio (ver siguiente sección; Sheehy *et al.*, 1988; Fernandez *et al.*, 2009; Bombarely *et al.*, 2011; Schauer y Fernie, 2005). Por otro lado, un estudio reveló que aproximadamente el 30% de los genes de tomate no tienen similitud significativa con genes de arábidopsis (Matsukura *et al.*, 2008). Por ende, el análisis funcional de estos genes en tomate provee información sobre mecanismos que controlan funciones biológicas que no existen en arábidopsis.

Como se mencionó, los estudios funcionales en tomate se han centrado principalmente en los distintos aspectos de la biología de sus frutos. El tomate es un fruto climatérico, con total dependencia del etileno para su maduración. El proceso de maduración del fruto de tomate es un evento altamente coordinado que coincide con la maduración de la semilla. La expresión regulada de cientos de genes controla el ablandamiento de los frutos así como también la acumulación de pigmentos, azúcares, ácidos orgánicos y compuestos volátiles con el objetivo de aumentar la atracción de los animales para la subsecuente dispersión de las semillas (Klee y Giovannoni, 2011). Al inicio de la maduración, el almidón se degrada a glucosa y fructosa, que constituyen el 2-4% del peso fresco del fruto. Los ácidos orgánicos, especialmente el ácido cítrico y el ácido málico, también son abundantes, y ubican al pH del fruto maduro en alrededor de 4. Tanto los azúcares como los ácidos son críticos en la determinación del gusto y de la calidad industrial de los frutos (Klee y Giovannoni, 2011). Simultáneamente, los frutos comienzan a producir compuestos volátiles. Se calcula que 20 a 30 volátiles contribuyen al aroma y sabor característico del tomate. Los compuestos volátiles derivan de aminoácidos esenciales (fenilalanina, leucina

e isoleucina), ácidos grasos esenciales (especialmente ácido linolénico) y del beta-caroteno. Aunque la síntesis de los volátiles está claramente asociada a la maduración, los mecanismos regulatorios de estas vías no están completamente establecidos. Se ha sugerido que al menos parte de esta regulación se deba a factores de transcripción asociados a la maduración (Klee y Giovannoni, 2011).

El tabaco (*Nicotiana tabacum*) es una planta herbácea anual, bienal o perenne, oriunda de América, que parece haber surgido del cruce espontáneo entre *Nicotiana sylvestris* y *Nicotiana tomentosa*. Sus hojas y tallos son viscosos. Las flores son hermafroditas de color rosado con polinización entomófila. El tabaco se ha empleado ampliamente en estudios de estrés biótico (Akhtar *et al.*, 2011; Scholthof, 2004) y en estudios de tecnología de ADN recombinante debido a que los protocolos para su transformación están bien establecidos y a que existen muchos vectores de expresión robustos (Twyman *et al.*, 2006). Por otro lado, la línea celular BT-2 deriva de la variedad de tabaco *Bright Yellow-2* y es empleada como sistema modelo en estudios de fisiología celular, señalización hormonal, ciclo celular, etcétera (Nagata *et al.*, 1992). Además, recientemente su genoma ha sido completamente secuenciado (Sierro *et al.*, 2014). A nivel metabólico su importancia deriva de su capacidad de síntesis de compuestos alcaloides, como la nicotina (Ritala *et al.*, 2014; Xia *et al.*, 2014). Sin embargo, las diferencias fisiológicas con otras especies de *Solanaceae* lo constituyen un buen modelo comparativo. Las especies de *Nicotiana* son arbustos o hierbas en hábitats secundarios usualmente secos como la zona central de Australia o el sudoeste de Estados Unidos. Sus frutos son cápsulas secas (Knapp, 2002) (figura 6). En cambio, los tomates poseen frutos frescos de color brillante, rojos o naranjas (Knapp, 2002) (figura 6). Las diferencias en la producción de los frutos en las dos especies y por ende en la partición de asimilados (o sea en su metabolismo) son marcadas debido a que dependen en parte de la fuerza de los tejidos destino, la fuerza de los tejidos fuente (afectada por el área de las hojas, la arquitectura de las plantas, las características fotosintéticas) y la tasa de floración (Wubs *et al.*, 2009). Por otro lado, el estudio de ortólogos en distintas especies puede enriquecer el análisis de sus mecanismos de acción dadas las variaciones que pueden surgir de los distintos contextos génicos y de la propia fisiología de la planta.



Figura 6. Fotografías de fruto de *Nicotiana tabacum* (izquierda) y de *Solanum lycopersicum* (derecha). Las barras verticales representan 1 cm. Fotos obtenidas de Pinterest.

1.3.3. Herramientas aplicadas a estudios funcionales en *Solanaceae*

Como se mencionó previamente, el tomate constituye actualmente la especie modelo de estudios de plantas con frutos frescos debido a su genoma pequeño (950 Mb) y su organización relativamente conservada con otras Solanáceas (Hille *et al.*, 1989, Van der Hoeven *et al.*, 2002; Carrari y Fernie, 2006). Recientemente se ha completado la secuenciación de su genoma por el *International Solanaceae Genomics Project (Tomato Genome Consortium, 2012)*. Acompañando a esta creciente información se fueron desarrollando técnicas para estudios funcionales de los genes en tomate. Desde muy tempranamente se desarrollaron protocolos para la transformación eficiente de tomate (Sheehy *et al.*, 1988; Tumer *et al.* 1987; Chyi *et al.*, 1987). Como plataforma genética, el tomate posee un germoplasma rico, fácilmente cultivable y transformable que permite el análisis de procesos biológicos imposibles de investigar en otras especies modelos. Para ello se han investigado secuencias regulatorias que permiten el control temporal y tisular de la expresión génica en tomate (Hirai *et al.*, 2011; Fernandez *et al.*, 2009; Frommer *et al.*, 1994). Otras alternativas para el estudio funcional de genes en tomate por manipulación de su expresión es la existencia de colecciones de mutantes (Okabe *et al.*, 2013) y el desarrollo de protocolos eficientes para el silenciamiento de genes mediado por virus (VIGS) (Quadrana *et al.*, 2011). En este trabajo de Tesis se optó por el empleo de plantas transgénicas dado que las colecciones de mutantes no se encuentran completamente caracterizadas y que la técnica de VIGS en tomate no genera tejidos completamente silenciados sino por sectores. Otros recursos disponibles en tomate son un sinnúmero de secuencias expresadas (EST o *expressed sequence tags*), mapas genéticos de alta densidad, diversas poblaciones diseñadas para el mapeo de QTLs (*quantitative trait loci*), entre otros tipos de información disponible en las bases de datos *Solanaceae Genomics Network (SGN)* (Bombarely *et al.*, 2011) y *Tomato Functional Genomics DB* (Fei *et al.*, 2010). Adicionalmente, la totalidad de las secuencias génicas de tomate han sido anotadas funcionalmente y esta información se encuentra parcialmente disponible en el contexto del programa Mapman (Thimm *et al.*, 2004). En la actualidad dos estrategias poderosas para la identificación de mecanismos regulatorios génicos son la transcriptómica y la metabolómica comparativas. En el primer caso existen varios tipos de microarreglos actualmente empleados en tomate (TOM1, microarreglos de ADN copia; TOM2, microarreglos de oligonucleótidos; Affymetrix, microarreglos con *probe sets*; Fei *et al.*, 2010), aunque últimamente se está extendiendo el empleo de técnicas de secuenciación masiva de ARN (Aoki *et al.*, 2013). Por otro lado, el estudio de perfiles metabólicos es considerado actualmente una herramienta clave en la anotación de genes (Schauer y Fernie, 2005). Un acercamiento promisorio en los trabajos más recientes para el estudio de redes de regulación en sistemas biológicos es la integración de datos de

perfiles transcripcionales y/o metabólicos (Toubiana *et al.*, 2013; Fukushima *et al.*, 2012). Por ejemplo, el estudio de módulos de coexpresión a través de conglomerados de redes con datos de distintos órganos y etapas de desarrollo de los tejidos facilitó el análisis funcional de genes involucrados en la biosíntesis de flavonoides en tomate (Ozaki *et al.*, 2010).

A pesar de que el tabaco es una especie ampliamente empleada en estudios funcionales, la existencia de herramientas para su estudio es menor que en las especies emparentadas tomate, papa y *Nicotiana benthamiana*. Sin embargo, muchas de las herramientas disponibles para estas especies son aplicables al tabaco debido a su cercanía filogenética (Särkinen *et al.*, 2013; Knapp, 2002). Por otro lado, existen protocolos muy eficientes de transformación de la especie (Siemianowski *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2013) y de silenciamiento inducido por virus (Zhang y Thomma, 2014). Recientemente se ha publicado el genoma completo de tres especies de *Nicotiana tabacum* (Sierro *et al.*, 2014) que se espera que contribuya ampliamente al desarrollo del tabaco como especie modelo. Al igual que para tomate, se puede acceder a la base de datos *Sol Genomics Network*, que contiene información de ESTs, unigenes, genes y marcadores moleculares, entre otras herramientas y datos.

1.4. Definición del problema, hipótesis y objetivos

Las características metabólicas de las especies vegetales son esenciales para la determinación de su calidad agronómica (Aragüez y Valpuesta, 2013; Putri *et al.*, 2013; Shachar-Hill, 2013; Staniek *et al.*, 2013). En el caso del fruto del tomate, el sabor está determinado principalmente por la relación entre el contenido de hidratos de carbono y ácidos (Jones and Scott, 1984; Gautier *et al.*, 2008), aunque aminoácidos, compuestos volátiles y minerales también contribuyen al mismo (Klee y Giovannoni, 2011; Carli *et al.*, 2009). A nivel fisiológico, los azúcares proveen del carbono y la energía necesarios para los procesos metabólicos vegetales. Además actúan como moléculas de señalización en un gran número de procesos tales como el crecimiento, el desarrollo y la senescencia (Rolland *et al.*, 2006; Baena-González y Sheen, 2008; Hanson y Smeekens, 2009; Eveland y Jackson, 2012). Las vías de señalización de los azúcares interactúan extensamente con las vías de señalización hormonales y estas interacciones son parcialmente responsables del control de los procesos fisiológicos (Rolland *et al.*, 2006; Eveland and Jackson, 2012). Por ende, el estudio de los mecanismos que afectan el contenido de metabolitos en general y glúcidos en particular permite conocer los mecanismos de numerosos procesos fisiológicos, así como también genera el conocimiento necesario para el desarrollo y la aplicación de tecnologías para el mejoramiento de numerosas especies vegetales de interés agrícola.

Asr es un familia de genes a los cuales se les atribuye la función de regular transcripcionalmente la expresión de un transportador de hexosas en frutos de uva (Çakir *et al.*, 2003). La regulación de *Asr* a nivel transcripcional está mediada por ABA y azúcares (Çakir *et al.*, 2003). Además, plantas transgénicas de papa que sobreexpresan constitutivamente la proteína ASR1 de tomate mostraron alteraciones significativas en los niveles de glucosa y de los niveles del transcrito del transportador de hexosas *Ht2* en tubérculos (Frankel *et al.*, 2007).

El hecho de que la transcripción de los genes *Asr* se induzca por concentraciones exógenas crecientes de sacarosa y ABA tanto en tomate como en uva, y que se haya probado su capacidad de controlar la expresión del transportador de hexosas *Ht1* en uva y los niveles de azúcares en tubérculos de papa, permiten postular la hipótesis que las proteínas ASR son parte de un complejo de regulación transcripcional que controla la expresión de transportadores de azúcares y consecuentemente el tráfico de asimilados en aquellos tejidos donde se expresan y cuyas señales son los azúcares y el ABA.

En este contexto entonces, el objetivo general de este trabajo de Tesis fue contribuir al entendimiento de los mecanismos moleculares y fisiológicos que regulan el tráfico de azúcares y sus efectos sobre la fisiología en Solanáceas. Para abordarlo experimentalmente se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- 1) Evaluar el efecto de la alteración de los niveles de expresión de *Asr1* en plantas de tabaco transgénicas sobre el metabolismo y el transporte de hidratos de carbono y los efectos sobre la fisiología de la planta.
- 2) Caracterizar plantas de tomate transgénicas con niveles alterados de la proteína ASR1 de manera constitutiva y de manera específica en frutos desde un punto de vista molecular, fenotípico y bioquímico.
- 3) Analizar los perfiles transcripcionales de plantas de tomate transgénicas con niveles alterados de *Asr1* e identificar posibles motivos regulatorios en los genes cuya expresión resulte alterada en estas plantas transgénicas.
- 4) Analizar integralmente los perfiles transcripcionales y metabólicos de las plantas con niveles alterados de *Asr1* para la reconstrucción de las redes metabólicas en las que esta proteína opera.

Capítulo 2

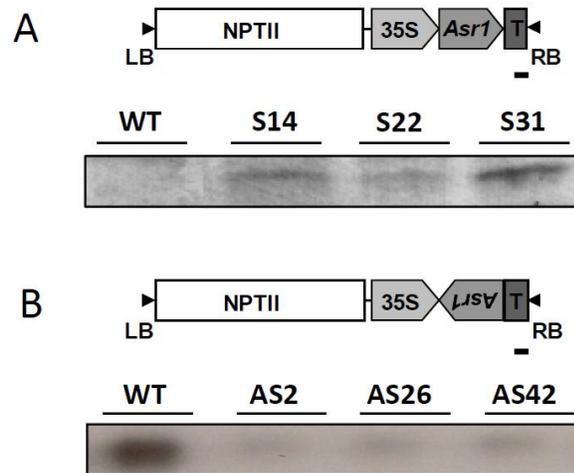
Análisis funcional de ASR1 en plantas de tabaco

2.1. INTRODUCCIÓN

La familia ASR en tabaco está compuesta por dos miembros, *Asr1* y *Asr2* (*Sol Genomics Network*; Bombarely *et al.*, 2011). La función de ASR1 en plantas de tabaco documentada hasta el momento tiene relación con la tolerancia a distintos tipos de estreses. Los niveles de expresión de *Asr1* aumentan en hojas de tabaco por estrés osmótico y/o por sequía (Kalifa *et al.*, 2004b; Jha *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2013) y además plantas de tabaco que sobreexpresan ASR1 de tomate son más tolerantes al estrés salino (Kalifa *et al.*, 2004b). Existen a su vez algunos trabajos donde expresan ASR1 de manera heteróloga en tabaco donde también se observaron aumentos de la tolerancia a estrés (Jha *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2013).

Con el objetivo de profundizar en el estudio funcional de ASR1 en tabaco, en un trabajo previo de nuestro laboratorio se generaron líneas de tabaco transgénicas con niveles alterados de *Asr1*. Para ello, las 348 pares de bases de la región codificante de *Asr1* de tomate (GenBank U86130.1) se clonaron en orientación sentido y antisentido bajo el control del promotor CaMV35S (promotor constitutivo 35S del virus mosaico del coliflor) (figura 2.1). En ese trabajo se evaluaron tres líneas que portan la construcción con *Asr1* en sentido por *Western blot* (figura 2.1A) y tres líneas que portan la construcción de *Asr1* en antisentido por *Northern blot* (figura 2.1B).

Figura 2.1. Niveles de expresión de *Asr1* de plantas de tabaco transgénicas. Las líneas sobreexpresantes se seleccionaron a través de *Western blots* (A) y las líneas silenciadas se seleccionaron a través de *Northern blots* (B). Los WB se revelaron con un suero anti-ASR1 (Maskin *et al.*, 2007) y los NB se revelaron con una ribosonda (Frankel *et al.*, 2007). Las mediciones se realizaron en plantas con 6 hojas expandidas. El esquema de las construcciones empleadas se encuentra en la parte superior de cada ítem. Las 348 pares de bases de *Asr1* de tomate (GenBank U86130.1) se clonaron en el vector pBINAR (Liu *et al.*, 1990) entre el promotor CaMV35S y el terminador del gen octopina sintetasa (OCS). El gen de selección de la construcción es *NptII* (gen de la neomicina fosfotransferasa, que confiere resistencia a la kanamicina). Las barras indican 100 pb.



La evaluación fenotípica de las plantas mostró que las líneas sobreexpresantes no se diferencian de las líneas controles mientras que las líneas silenciadas muestran dramáticas alteraciones fenotípicas en comparación con las plantas controles (figura 2.2A). Las tres líneas silenciadas evaluadas presentan un acortamiento de los entrenudos, que se evidenció en la disminución del peso fresco de los tallos (figura 2.2B). Además las hojas son cloróticas y poseen puntos de necrosis y muestran aumentos de hasta 3 veces en los niveles de glucosa y fructosa en un momento del día (figura 2.3). Más aun, los niveles de glucosa también se mantuvieron significativamente altos durante el período de oscuridad (figura 2.3). Estos resultados sugirieron que el fenotipo observado en las líneas silenciadas estaría íntimamente relacionado con el contenido de hexosas y que una evaluación más profunda de las plantas sería necesaria para confirmarlo.

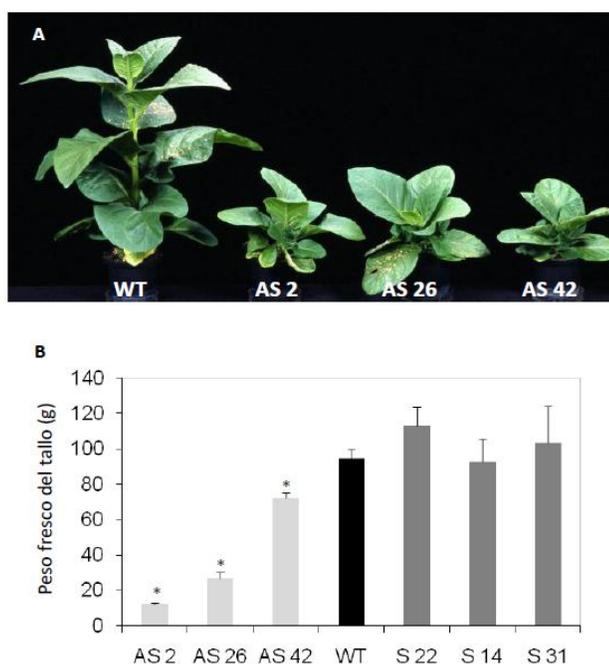


Figura 2.2. Fenotipo de las líneas transgénicas de tabaco. **(A)** Fenotipo de plantas de 6 semanas de tres líneas antisense independientes T0. **(B)** Peso fresco de los tallos de las líneas silenciadas (AS2, AS26, AS42), sobreexpresantes (S22, S14, S31) y los controles WT. Las mediciones se realizaron cuando las plantas tenían 10 hojas expandidas. Los asteriscos indican diferencias significativas por la prueba de Student ($p < 0,05$). Se indica el promedio \pm EE.

La importancia de estudiar los mecanismos de producción y transporte de azúcares está dada por el hecho de que estos proveen del carbono y de la energía necesarios para la mayor parte de los procesos metabólicos de las plantas. Además, los azúcares actúan como moléculas señales en un amplio rango de procesos fisiológicos tales como el crecimiento, el desarrollo y la senescencia (Rolland *et al.*, 2006; Baena-González y Sheen, 2008; Hanson y Smeekens, 2009; Eveland y Jackson, 2012). Los factores de señalización de azúcares más estudiados hasta el momento son la hexoquinasa 1, la SnRK (*Snf1-related kinase*), la quinasa TOR y los factores bZIP C/S1 (Baena-González y Sheen, 2008; Hanson y Smeekens, 2009; Eveland y Jackson, 2012; Lastdrager *et al.*, 2014). Las vías de señalización de los azúcares interactúan extensamente con las vías hormonales y estas interacciones son parcialmente responsables del control de procesos fisiológicos básicos (Rolland *et al.*,

2006; Eveland y Jackson, 2012). Estudiar la naturaleza de estas interacciones y los mecanismos de control involucrados llevará a un mejor entendimiento de estos procesos fisiológicos.

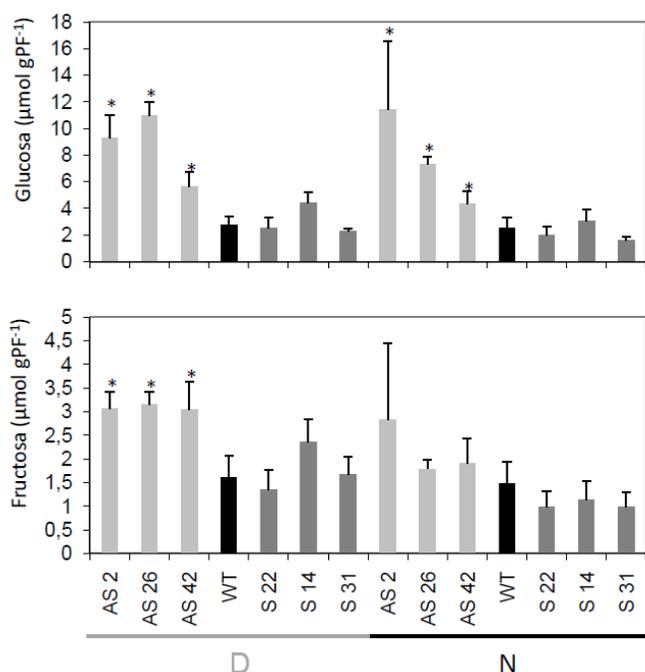


Figura 2.3. Contenido de hidratos de carbono en hojas de las líneas T1 que sobreexpresan (S) y silencian (AS) *Asr1*. Medición de glucosa (arriba) y fructosa (abajo) en hojas fuentes de plantas T0 en un punto del día con luz (D: 13 hs) y uno con oscuridad (N: 5 hs). Se muestra la media \pm EE. N=4-6. Los asteriscos indican diferencias significativas por la prueba de Student ($p < 0,05$) en comparación con el control wild type (WT). PF: peso fresco.

y las hormonas.

Sobre la base de los antecedentes expuestos y en el marco de la hipótesis general de este trabajo de Tesis, este capítulo aborda el análisis de plantas de tabaco transgénicas con el siguiente objetivo: evaluar el efecto de la alteración de los niveles de expresión de *Asr1* en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transgénicas sobre el metabolismo y transporte de hidratos de carbono y los efectos sobre la fisiología de la planta.

Este primer objetivo de la Tesis aborda el estudio de *Asr1* en tabaco como especie modelo de las Solanáceas. Su estudio permitirá conocer el efecto que produce modificar los niveles de ASR1 sobre la planta de tabaco en general y sobre el metabolismo de sus hojas en particular. Los resultados permitirán realizar comparaciones con otras Solanáceas en

El estudio de las vías en común entre azúcares y hormonas se ha llevado a cabo fundamentalmente a través del estudio de mutantes de las vías hormonales y de respuesta a azúcares. Por ejemplo, *ABI4* (*ABA insensitive 4*) es un factor de transcripción cuyo motivo de unión (llamado *coupling element 1-like*) está presente en las regiones regulatorias de genes que responden al tratamiento con azúcares y ABA (ácido absísico) y además es necesario para el arresto en el desarrollo mediado por la glucosa que se produce durante la morfogénesis en *arabidopsis* (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Dekkers *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014). Por otro lado, no existen muchos trabajos donde se estudie la función de factores de transcripción en la interface de las vías de los azúcares

consideración de sus similitudes y diferencias. Para abordar este objetivo se utilizaron las plantas transgénicas de tabaco mencionadas anteriormente en estado homocigota y se profundizó en el análisis de algunas líneas para hallar las causas de los fenotipos observados haciendo foco en las alteraciones observadas en los niveles de hexosas.

2.2. RESULTADOS

2.2.1. Obtención de líneas transgénicas homocigotas y análisis de los niveles de expresión de *Asr1*

Previo al desarrollo de esta Tesis se generaron líneas transgénicas de tabaco. Se utilizó para la transformación mediada por *Agrobacterium* el vector pBINAR (Liu *et al.*, 1990) con las 348 pares de bases de la región codificante de *Asr1* de tomate (GenBank U86130.1) clonadas en orientación sentido y antisentido (figura 2.1). Análisis preliminares de plantas de la generación T0 mostraron que mientras ninguna línea sobreexpresante se diferencia fenotípicamente de los controles sin transformar, las tres líneas silenciadas presentaron alteraciones importantes en el fenotipo: menor altura, necrosis localizada en las hojas de mayor edad y mayores niveles de glucosa en hojas tanto durante las horas de luz como de oscuridad (figuras 2.2 y 2.3). Para profundizar la caracterización funcional a nivel del metabolismo y transporte de azúcares y de la interacción entre azúcares y hormonas, en este trabajo se procedió a obtener plantas homocigotas de la línea silenciada que muestra el fenotipo más marcado (llamada AS2) y de una de las líneas sobreexpresantes (llamada S22), a través de sucesivas autofecundaciones y selecciones en kanamicina (200 mg/l) hasta la obtención de la generación T4 homocigota. De cada una de las líneas se evaluaron dos sublíneas, es decir plantas T4 de la familia original pero de distintos individuos T1, llamadas AS2-2 y AS2-4 a las silenciadas y S22-2 y S22-3 a las sobreexpresantes. Esto permitió descartar posibles efectos maternos en los caracteres medidos de las plantas adultas T4, sobre todo el efecto fenotípico materno ambiental, usualmente no considerado pero que puede llegar a tener sustanciales efectos sobre la competencia de la planta adulta (Roach y Wulff, 1987). Los niveles del ARNm de *Asr1* de las hojas de estas plantas mostraron aumentos significativos en las homocigotas T4 sobreexpresantes (S22 2 y S22 3) y disminuciones significativas en las silenciadas (AS2 2 y AS2 4) en comparación con las plantas controles

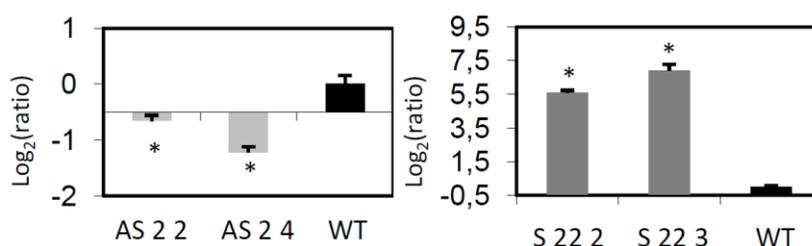


Figura 2.4. Expresión de *Asr1* en las líneas transgénicas de tabaco homocigotas T4. Se midieron los niveles del ARNm por *qPCR* en hojas fuentes de las líneas homocigotas. Las barras representan los niveles del ARNm de *Asr1* relativos a los niveles del ARNm en las plantas WT, ambos normalizados por los niveles del ARNm del gen de referencia (EF-1- α) (*ratio*). Las barras de error representan el error estándar. A la derecha: líneas *sense*. A la izquierda: líneas *antisense*. Los asteriscos indican diferencias significativas por la prueba de permutación ($p < 0,05$). N=3-5.

(WT) (figura 2.4).

2.2.2. Las plantas silenciadas muestran dramáticos cambios en su fenotipo

Las hojas fuente de las plantas silenciadas homocigotas mostraron signos marcados de clorosis y puntos densos necróticos (figura 2.5A). En estas mismas plantas silenciadas también se observó, al igual que en el estudio previo, reducciones significativas en la altura (figura 2.5B). Esto se debió a que las longitudes de los entrenudos eran más cortas que en las plantas WT (figura 2.5C).

Estas plantas también mostraron una prolongación del tiempo a la floración (figura 2.5D) y una reducción del peso fresco de las hojas, de los tallos y de las raíces (figura 2.5E). Por el contrario, las plantas sobreexpresantes no mostraron diferencias significativas con las plantas controles (figura 2.5). Asimismo tampoco mostraron alteraciones en el peso fresco de sus tejidos (datos no mostrados). Estos resultados confirman y extienden los resultados obtenidos previamente con las seis líneas heterocigotas (figura 2.2).

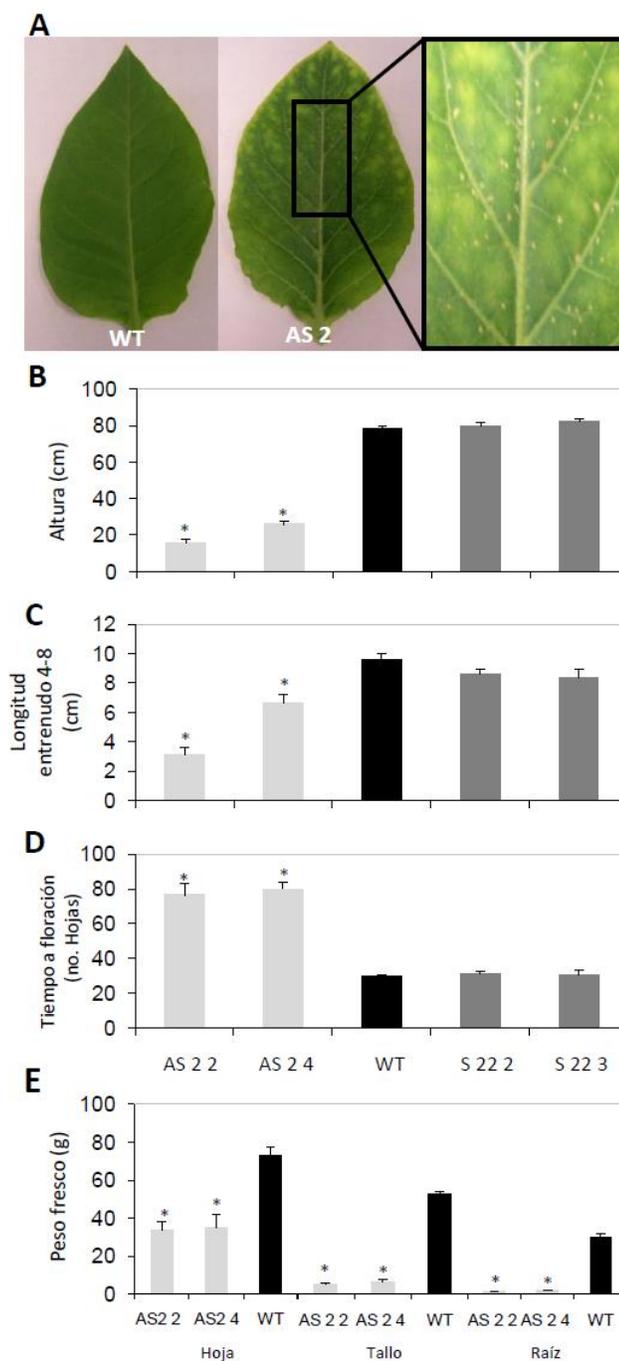
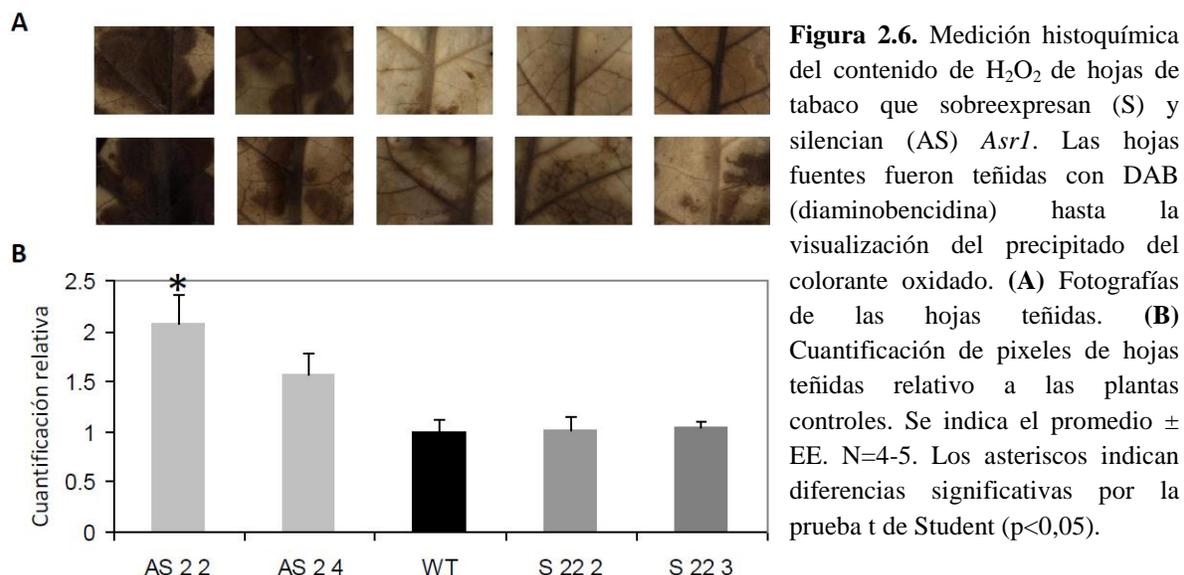


Figura 2.5. Caracterización fenotípica de tabacos homocigotas que silencian (AS) y sobreexpresan (S) *Asr1*. **(A)** Aspecto de la 7^o hoja de las plantas controles (WT) y de las líneas silenciadas (AS2). **(B)** Altura de las plantas **(C)** Longitud de los entrenudos 4 a 8 **(D)** Tiempo a floración (número de hojas al momento de la aparición del botón floral) **(E)** Peso fresco en hojas, en tallos y en raíces. Las mediciones se realizaron cuando las plantas tenían 10 hojas expandidas. Los datos representan la media \pm EE. Los asteriscos indican diferencias significativas por la prueba t de Student ($p < 0,05$).

En relación con el fenotipo de clorosis y necrosis de las hojas de las plantas silenciadas, se detectó que los niveles de H_2O_2 en sus hojas eran mayores que en las plantas controles (figura 2.6).



2.2.3. Las plantas silenciadas poseen los parámetros fotosintéticos alterados

Dado que la disminución del peso fresco de los tejidos podría estar dada por una alteración en la asimilación del CO_2 se realizaron mediciones de parámetros fotosintéticos de las plantas. Estas mediciones indicaron que efectivamente la asimilación de CO_2 estaba significativamente reducida en las plantas homocigotas silenciadas a todas las densidades de flujo de fotones (PFD, sus siglas en inglés) empleadas (figura 2.7A). Sin embargo, la transpiración y la conductancia estomática resultaron disminuidas sólo a altas irradiancias (PFD entre 700 y $1700 \mu mol m^{-2} s^{-1}$) (figura 2.7B y C). Estos resultados tienen un correlato con observaciones realizadas en geles de proteínas totales extraídas de hojas fuentes de estas plantas. Las bandas correspondientes a las subunidades mayor y menor de la Rubisco resultaron menos intensas en las líneas silenciadas que en los controles. Además, el patrón de bandas de proteínas totales también fue diferente en los extractos de estas plantas (figura 2.8). Por otro lado, las plantas sobreexpresantes no mostraron diferencias significativas en comparación con las plantas WT (figuras 2.7 y 2.8).

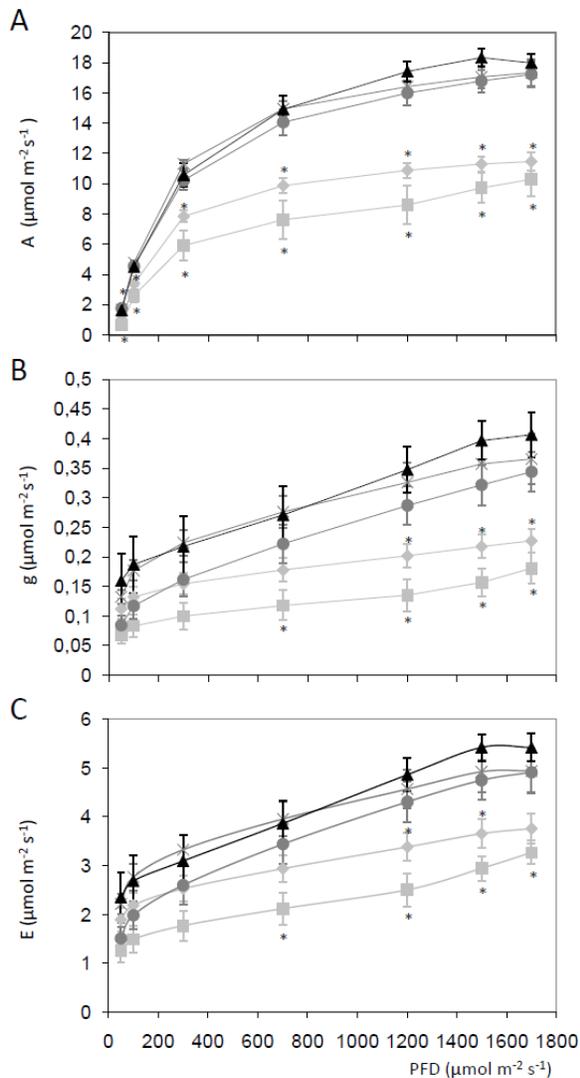


Figura 2.7. Parámetros fotosintéticos de las plantas de tabaco que silencian (AS) o sobreexpresan (S) *Asr1* y de los controles WT. (A) Asimilación de CO₂ o A (B) Conductancia estomática o g (C) Tasa de transpiración o E. Todos los parámetros fueron medidos en hojas completamente expandidas en la fase vegetativa de las plantas a las densidades fotosintéticas del flujo de fotones (PPFD) indicadas. Se muestra el promedio \pm EE. Los asteriscos indican diferencias significativas por la prueba t de Student. N= 4-6. Referencias: cuadrados grises claros, AS 2 2; rombos grises claros, AS 2 4; triángulos negros, WT; círculos grises oscuros, S 22 2; cruces grises oscuras, S 22 3.

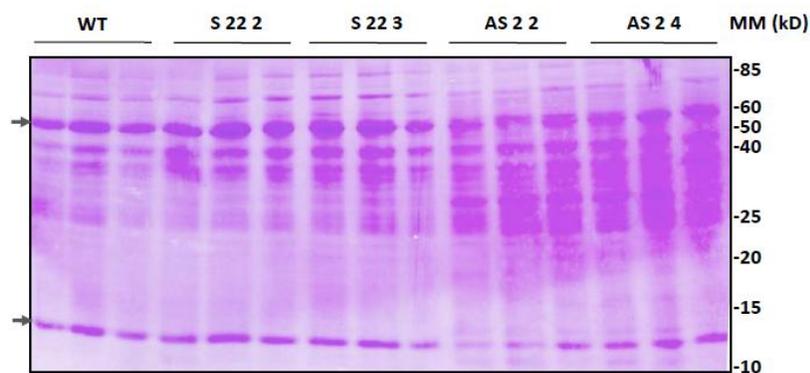


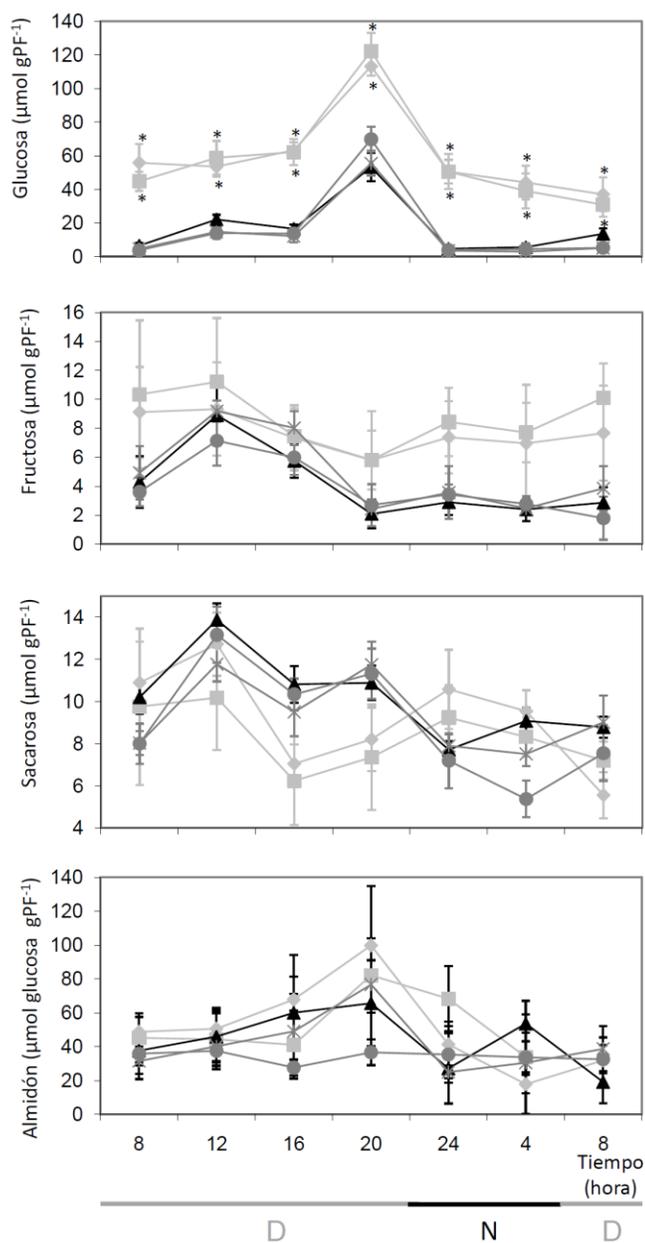
Figura 2.8. SDS-PAGE de las proteínas totales de las hojas de plantas transgénicas de tabaco. Cantidades equivalentes de proteínas (20 μ g) se sembraron en un gel 15%, que luego se tiñó con el colorante *Coomasie Blue*. Las flechas indican la subunidades mayor (55 kDa) y menor (13 kDa) de la Rubisco. MM: masa molecular. S: sobreexpresante. AS: silenciada. WT: *wild-type*.

2.2.4. Las plantas silenciadas poseen alteraciones en los niveles de glucosa en sus hojas

Las líneas silenciadas mostraron aumentos en los niveles de glucosa a lo largo del día, aunque no se observaron diferencias en los niveles de otros azúcares medidos (figura 2.9). Por otro lado, las líneas sobreexpresantes no mostraron diferencias significativas en comparación con las plantas WT (figura 2.9). Estos resultados confirman los obtenidos previamente para las líneas heterocigotas, excepto que en esas líneas se observaron diferencias en los niveles de fructosa durante la fase lumínica del día (figura 2.3).

Figura 2.9. Curva diurna de hidratos de carbono en hojas de las líneas de tabaco que silencian (AS) y sobreexpresan (S) *Asr1*. Se midieron la glucosa, fructosa, sacarosa y almidón por el método enzimático. Los datos representan la media \pm EE. N=4-6. Los asteriscos indican diferencias significativas por la prueba t de Student ($p < 0,05$) en comparación con el control WT. Referencias: cuadrados grises claros, AS 2 2; rombos grises claros, AS 2 4; triángulos negros, WT; círculos grises oscuros, S 22 2; cruces grises oscuras, S 22 3. D: día. N: noche. PF: peso fresco.

También se analizó el contenido de sacarosa del exudado floemático de las líneas (figura 2.10). Las plantas silenciadas mostraron una reducción en los niveles de sacarosa en el exudado (figura 2.10A). Además, se observó que las hojas tuvieron un notable deterioro luego de la incubación de 17 horas en comparación con las hojas de las líneas control o sobreexpresantes (figura 2.10B). Por otro lado, en una de las líneas sobreexpresantes también se detectó una disminución de los niveles de sacarosa (figura



2.10A).

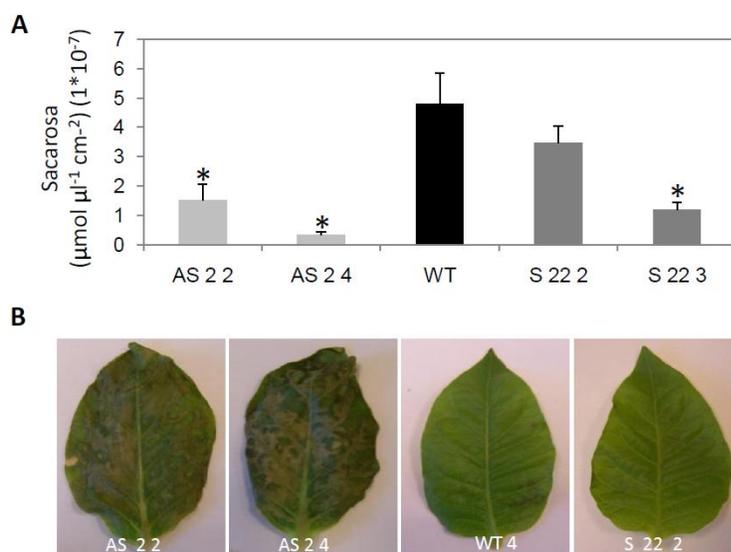


Figura 2.10. Contenido de sacarosa en el exudado floemático de hojas de plantas de tabaco que sobreexpresan (S) y silencian (AS) *Asr1*. **(A)** Contenido de sacarosa del exudado floemático de hojas recolectado luego de 17 horas de incubación en condiciones controladas (humedad relativa 60%, temperatura 23°C, luz continua 200 µmol m⁻² s⁻¹) **(B)** Fotos de las hojas luego de 17 horas de incubación. Los datos representan el promedio ± EE. Los asteriscos representan diferencias significativas ($p < 0,05$) por la prueba t de Student. N=5.

2.2.5. Las hojas de las plantas transgénicas poseen alteraciones en los niveles de ABA y giberelinas

La regulación de *Asr1* por el ABA está bien documentada en tomate (Amaitai-Zeigerson *et al.*, 1995; Rossi *et al.*, 1998), uva (Çakir *et al.*, 2003) y maíz (Virlouvét *et al.*, 2011). Se conoce también que la glucosa modula la expresión de genes involucrados en la biosíntesis y señalización del ABA (Rolland *et al.*, 2006). Para conocer los efectos de la alteración de *Asr1* sobre el ABA en las hojas de tabaco, se midieron los niveles de esta hormona en hojas fuentes por LC-MS/MS (figura 2.11). En las líneas silenciadas, los niveles de ABA resultaron significativamente disminuidos (al menos tres veces). En las plantas sobreexpresantes hubo incrementos de esta hormona, aunque sólo fue significativo en la línea S22 3.

Por otro lado, el fenotipo previamente descrito respecto del largo de los entrenudos de las plantas silenciadas (figura 2.5C) podría deberse a alteraciones en el metabolismo de giberelinas (GA). Se decidió entonces medir los contenidos de giberelinas en las hojas de tabaco. De los 20 estándares de giberelinas empleados (ver materiales y métodos), sólo pudieron ser cuantificados de manera confiable siete (GA8, GA29, GA23, GA1, GA19, GA20, GA53). GA34 pudo ser detectada pero no cuantificada. Se realizó una reconstrucción de una vía probable de síntesis de GA en hojas de tabaco en base a las vías previamente descritas por Yamaguchi (2008) y MacMillan (1997) en distintas especies (figura 2.12).

GA1 fue la única giberelina activa en el crecimiento que se detectó y cuantificó. Las líneas silenciadas no mostraron alteraciones en los niveles de esta GA. Sin embargo, su precursor inmediato GA20 resultó significativamente reducido y su producto de degradación GA8 estuvo aumentado en esas plantas. GA29, que deriva de GA20, también resultó reducido en las plantas silenciadas. Por otro lado, las plantas sobreexpresantes mostraron una reducción en los niveles de GA1. GA23 estuvo aumentada en AS2 4 y disminuida en S22 2. GA53 y GA19 no mostraron diferencias significativas. Para profundizar en el análisis de los datos, se calculó el cociente entre el producto de una reacción y su sustrato (tabla 2.1). De manera interesante, los valores obtenidos para los pasos de oxidación catalizados por la GA20 oxidasa (las conversiones GA19>GA20 y GA23>GA1) estuvieron disminuidos en las líneas silenciadas, mientras que los pasos catalizados por la GA3 oxidasa (las conversiones GA20>GA1 y GA19>GA23) estuvieron aumentados. Esto sugiere que las actividades de la GA20 oxidasa y de la GA3 oxidasa se encontrarían alteradas en las líneas silenciadas.

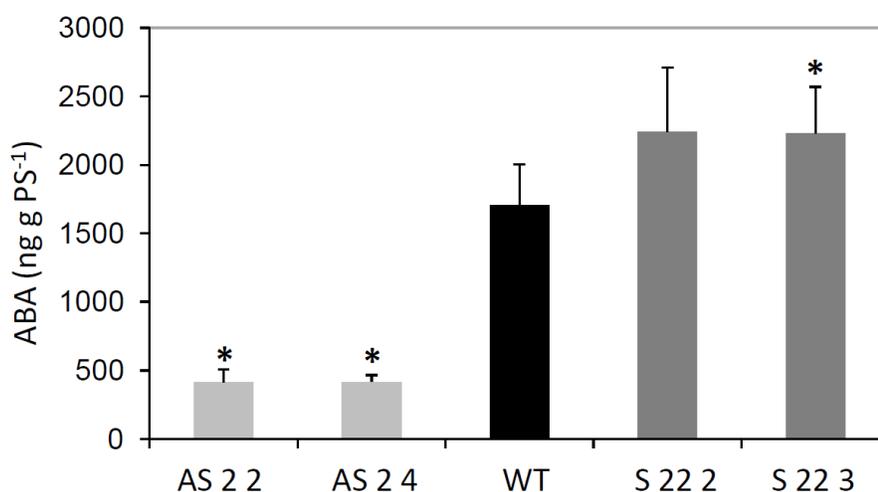


Figura 2.11. Contenido de ABA en plantas de tabaco que sobreexpresan (S) y que silencian (AS) *Asr1*. El contenido de ABA fue medido por LC-MS/MS en hojas fuentes de plantas de 6 semanas. Se indica el promedio \pm EE. N=5. Los asteriscos indican diferencias significativas por la prueba t de Student. PS: peso seco.

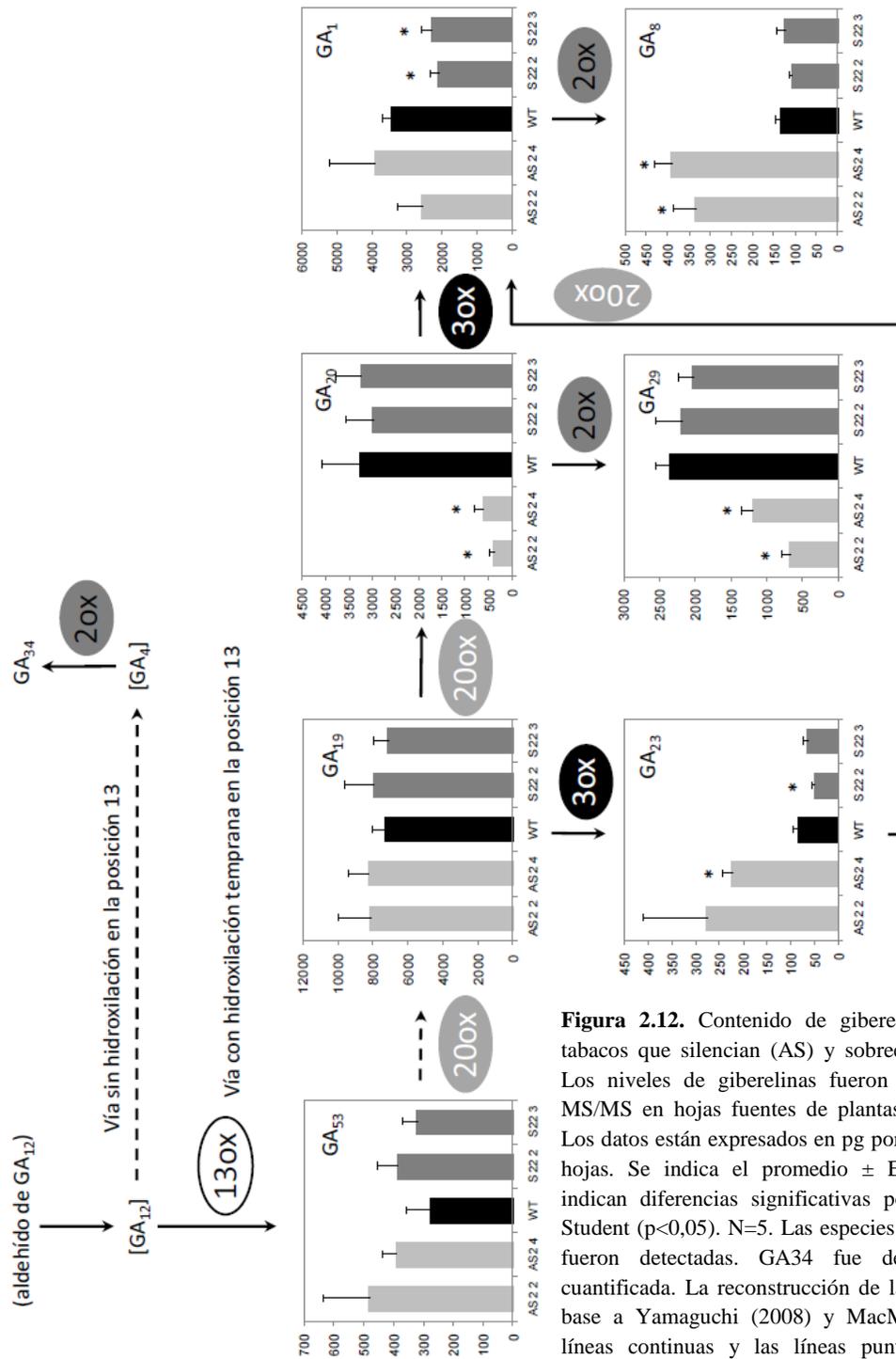


Figura 2.12. Contenido de giberelinas en hojas de tabacos que silencian (AS) y sobreexpresan (S) *Asr1*. Los niveles de giberelinas fueron medidos por LC-MS/MS en hojas fuentes de plantas de seis semanas. Los datos están expresados en pg por g de peso seco de hojas. Se indica el promedio \pm EE. Los asteriscos indican diferencias significativas por la prueba t de Student ($p < 0,05$). $N=5$. Las especies entre corchetes no fueron detectadas. GA₃₄ fue detectada pero no cuantificada. La reconstrucción de la vía se realizó en base a Yamaguchi (2008) y MacMillan (1997). Las líneas continuas y las líneas punteadas representan reacciones simples o múltiples, respectivamente. 13ox, 20ox, 3ox y 2ox son abreviaturas para GA 13-oxidasa, GA 20-oxidasa, GA 3-oxidasa y GA 2-oxidasa, respectivamente.

	Oxidación C20			Oxidación C3		Oxidación C2	
	GA ₅₃ >GA ₁₉	GA ₁₉ >GA ₂₀	GA ₂₃ >GA ₁	GA ₂₀ >GA ₁	GA ₁₉ >GA ₂₃	GA ₂₀ >GA ₂₉	GA ₁ >GA ₈
AS 2 2	19,92±4,14	0,05±0,01	12,71±1,87	6,42±0,82	0,03±0,01	1,93±0,43	0,15±0,03
AS 2 4	20,18±1,42	0,07±0,02	17,21±5,44	6,64±1,33	0,03±0,005	3,11±1,16	0,17±0,06
WT	27,06±5,64	0,45±0,10	42,36±4,74	1,41±0,40	0,01±0,005	0,93±0,24	0,04±0,005
S 22 2	22,56±4,31	0,38±0,09	42,13±3,99	0,82±0,20	0,01±0,005	0,78±0,12	0,06±0,01
S 22 3	28,63±4,27	0,44±0,04	37,74±5,63	0,72±0,07	0,01±0,005	0,68±0,10	0,06±0,02

Tabla 2.1. Conversión de una giberelina en la siguiente.

La conversión de una giberelina en la siguiente se calculó como el cociente entre el producto y el sustrato de cada reacción basándose en los datos de la figura 2.12. Se muestra el promedio ± EE. Las diferencias significativas fueron calculadas por la prueba t de Student ($p < 0,05$) y se muestran en negrita. N=5.

2.2.6. Las líneas silenciadas mantienen la sensibilidad a GA3 en sus tallos

Dado que GA1, la única GA detectada que fue descrita como activa en el crecimiento, no está alterada en las plantas silenciadas, se decidió investigar si la menor longitud de los tallos se debía a una menor sensibilidad a las GA (figura 2.13). El ensayo se realizó rociando las plantas con GA3 10 μ M dos veces por semana. Otro grupo idéntico se roció simultáneamente con el solvente (etanol). El tratamiento se realizó desde la emergencia de las plántulas hasta la floración. Como medida de respuesta al tratamiento se midió la longitud de los entrenudos de las plantas tratadas en comparación con las plantas no tratadas. Las pendientes de las curvas de altura de las plantas silenciadas tratadas con GA3 fueron similares a las pendientes de los controles WT tratados, lo cual sugiere que la sensibilidad de ambos genotipos a GA3 en los tallos es igual.

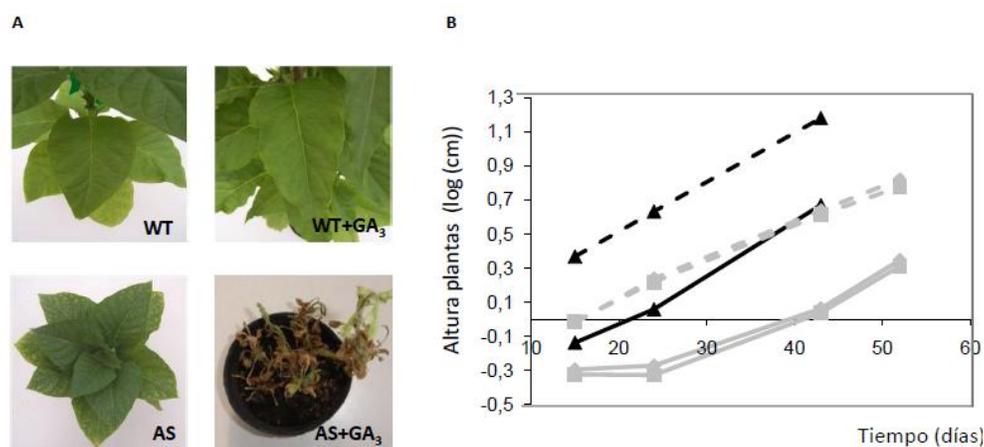


Figura 2.13. Sensibilidad a GA3 de plantas de tabaco que silencian *Asr1* (AS) y de los controles (WT). Las plántulas fueron rociadas con GA3 10 μ M. (A) Fotos de las plantas tratadas con GA3 (derecha) y no tratadas (izquierda) luego de 80 días de la siembra. (B) Altura de las plantas desde el día 15 hasta el día 53 luego de la siembra. Referencias: cuadrados grises, AS2 2; rombos grises, AS2 4; triángulos negros, WT; líneas continuas, plantas no tratadas; líneas punteadas, plantas tratadas.

Sin embargo, hubo otras diferencias fenotípicas. Las plantas controles tuvieron los azúcares alterados en comparación con las plantas controles no tratadas (tabla 2.2). En cambio, las líneas silenciadas no tuvieron diferencias significativas en los niveles de azúcares. Interesantemente, se obtuvieron resultados similares para la biomasa. Las plantas WT aumentaron su biomasa frente al tratamiento con GA₃ mientras que las plantas silenciadas no lo hicieron. Además, el tratamiento con GA₃ retrasó la floración en las plantas WT. Sin embargo, esto no pudo ser medido en las plantas silenciadas porque senescieron antes de la floración.

	Peso fresco (g)			Tiempo a floración (no. hojas)	Glucosa (μmol cm ⁻²)	Fructosa (μmol cm ⁻²)	Sacarosa (μmol cm ⁻²)
	Hoja	Tallo	Raíz				
AS 2 2	3,3±4,5*	5,3±0,6*	1,2±0,1*	85,0±3,6*	1,9±0,2*	0,27±0,1*	0,17±0,1
AS 2 4	34,9±7,0*	6,5±1,6*	1,7±0,3*	85,0±7,1*	1,9±0,1*	0,31±0,1	0,12±0,01*
WT	73,2±4,0	53,7±1,2	28,6±1,5	26,0±2,6	0,77±0,1	0,45±0,01	0,25±0,01
AS 2 2+GA ₃	24,8±2,8	8,3±0,2•	1,1±0,1	NR	1,78±0,08▲	0,36±0,1▲	0,15±0,01▲
AS 2 4+GA ₃	27,9±4,2	9,6±0,8	1,1±0,3	NR	1,8±0,1	0,27±0,1▲	0,12±0,01
WT+GA ₃	87,3±1,8•	59,1±1,3•	27,4±5,2	75,0±11,4•	1,35±0,03•	0,61±0,01•	0,08±0,01•

Tabla 2.2. Caracterización fenotípica y bioquímica de las plantas silenciadas y controles tratadas con GA₃. Las plantas silenciadas y WT fueron tratadas con GA₃ (10 μM) y caracterizadas fenotípicamente a través de la medición del peso fresco de hojas, tallos y raíces en plantas de 12 semanas de edad y el tiempo a la floración (como el número de hojas al momento de la aparición del botón floral). Se muestran el promedio ± EE. Para la medición de la glucosa, fructosa y sacarosa se tomaron las muestras al mediodía. El análisis estadístico se realizó a través de la prueba t de Student. Los asteriscos indican diferencias significativas de las plantas transgénicas no tratadas en comparación con las controles (WT) no tratadas (p<0,05). Los círculos negros indican diferencias significativas entre las plantas tratadas en comparación con las no tratadas del mismo genotipo (p<0,05). Los triángulos indican diferencias significativas entre las transgénicas tratadas en comparación con las no transgénicas (WT) tratadas (p<0,05). NR=no registrado.

2.2.7. Las plantas silenciadas tienen niveles de expresión alterados de transportadores y sensores de azúcares

Çakir *et al.* (2003) encontraron que una proteína de uva ortóloga a ASR (llamada VvMSA) se une a los motivos conservados de la región reguladora del transportador de monosacáridos *Ht1*. Se evaluaron entonces los niveles del ARNm de cuatro transportadores putativos de azúcares en las líneas de tabaco, a saber: *Ht1* (ortólogo de *VvHt1*), *Sut2* (*Sucrose transporter2*; Meyer *et al.*, 2000; Hackel *et al.*, 2006), *Tmt3* (*Tonoplast monosaccharide transporter3*; Wormit *et al.*, 2006) y *Vgt* (*Vacuolar glucose transporter*; Büttner, 2007) (figura 2.14 A a D). Las plantas silenciadas mostraron menores niveles del ARNm de *Ht1* y de *Sut2* que las plantas controles. Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de *Tmt3* y de *Vgt* en estas plantas. Para tener un mayor conocimiento de la vía de señalización de los azúcares, también se midieron los

niveles del ARNm de la hexoquinasa 1 y de *SnRk1.1* (*Snf1-related kinase1.1*), dos genes claves en la vía de señalización de la glucosa (figura 2.14 E y F). Las plantas silenciadas mostraron mayores niveles del ARNm de la hexoquinasa 1 y menores niveles del ARNm de la *SnRk1.1*. Las plantas sobreexpresantes no mostraron niveles alterados de los ARNm de ninguno de los genes medidos (figura 2.14).

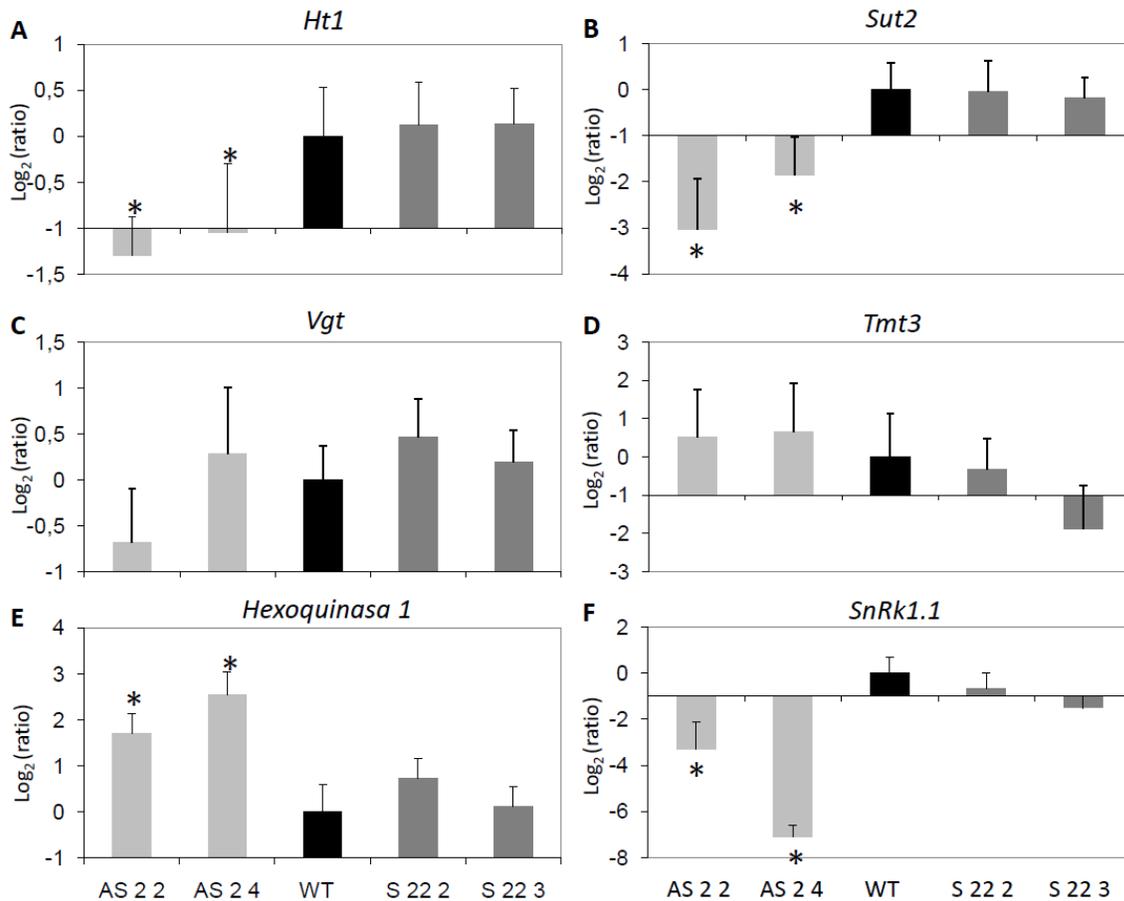


Figura 2.14. Análisis de expresión de transportadores y sensores de azúcares en líneas de tabaco que sobreexpresan (S) y silencian (AS) *Asr1*. Se midieron por *qPCR* los niveles de los transportadores de azúcares *Ht1* (A), *Sut2* (B), *Vgt* (C) y *Tmt3* (D) y de los sensores *Hexoquinasa 1* (E) y *SnRK1.1* (F) en las hojas de las líneas transgénicas en comparación con las plantas *wild-type*. Los asteriscos indican diferencias significativas por la prueba de permutación ($p < 0,05$). $N=3-5$.

Ratio = $(E_{\text{blanco}})^{\Delta C_p \text{ blanco (PROMEDIO control-PROMEDIO tratamiento)}} \left((E_{\text{referencia}})^{\Delta C_p \text{ referencia (PROMEDIO control-PROMEDIO tratamiento)}} \right)^{-1}$ (Pfaffl *et al.*, 2001).

2.3. DISCUSIÓN

2.3.1. Los niveles de glucosa se encuentran afectados por los niveles del transportador *Ht1* en las hojas de las líneas silenciadas

Estudios previos mostraron que un ortólogo de *Asr* en uva (*Msa*), regula la expresión del transportador de hexosas *Ht1* (Çakir *et al.*, 2003). Los transcriptos de *Asr1* en hojas de tomate se expresan en las células acompañantes del floema (Maskin *et al.*, 2007). A su vez *Ht1* se expresa en los haces vasculares del floema de hojas, pecíolos y frutos de uva (Vignault *et al.*, 2005). El silenciamiento de *Asr1* en tabaco llevó a una reducción de los niveles del ARNm de *Ht1* y a un aumento de los niveles de glucosa en las hojas. Este resultado está en línea con los resultados previamente obtenidos para otras especies donde se observaron cambios en los niveles de glucosa por la modificación de los niveles de *Asr1* (Frankel *et al.*, 2007; Virlouvét *et al.*, 2011). El rol propuesto para los transportadores de hexosas como *Ht1* es la recuperación de hexosas que hayan difundido hacia el apoplasto (Lalonde *et al.*, 2003; Vignault *et al.*, 2005; Slewinski, 2011). De acuerdo con esto, una disminución en los niveles de *Ht1* en las hojas de los tabacos llevaría a una falla en la recuperación de las hexosas desde el apoplasto y aumentarían los niveles de hexosas en el mismo. Es posible entonces que la glucosa en exceso en el apoplasto se distribuya a otros tipos celulares como el parénquima y las células del mesófilo, dado que las plantas silenciadas mostraron alteraciones fenotípicas asociadas a altos niveles de glucosa en las células del mesófilo (ver más adelante). A su vez, la expresión del transportador *Sut2* está disminuida en las plantas silenciadas. *Sut2* es un transportador de sacarosa localizado en los tubos cribosos del floema cuya expresión es regulada por la sacarosa (Barker *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2004; Hackel *et al.*, 2006; Kühn, 2011). Aunque *Sut2* se expresa en hojas (Barker *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2000), su función en este tejido no ha sido dilucidada. La disminución de la expresión de *Sut2* puede ser consecuencia de una alteración de los niveles de sacarosa en el floema (los niveles de sacarosa en el exudado floemático estaban disminuidos) o una regulación directa por parte de *Asr1* (considerando que las proteínas en las células de los tubos cribosos se sintetizan en las células de compañía; Liesche *et al.*, 2011). A pesar de que la asimilación del CO₂ es menor en las plantas silenciadas, los niveles de sacarosa totales en las hojas son normales. Por lo tanto, los menores niveles de sacarosa en el exudado floemático se pueden explicar por una disminución en la carga de sacarosa en el floema, quizás para mantener los niveles de sacarosa foliar normales.

2.3.2. Los niveles hormonales en las hojas de las líneas silenciadas están afectados por los niveles de glucosa

El efecto de la glucosa como molécula señal es parcialmente mediado por la hexoquinasa 1 (Eveland y Jackson, 2012), que entre otras funciones está involucrada en la inhibición de la transcripción de genes de la fotosíntesis (Moore *et al.*, 2003) y en el desarrollo de la senescencia (Dai *et al.*, 1999). En el núcleo, la hexoquinasa puede unirse a proteínas nucleares y formar un complejo que regula la expresión de genes como *Cab2* (*Chlorophyll a/b-binding protein 2*) que son regulados por la glucosa (Cho *et al.*, 2006). Otra proteína involucrada en el sensado y transducción de la señal de la glucosa es SnRK1, que es un regulador global del metabolismo vegetal (Ghillebert *et al.*, 2011; Tsai y Gazzarrini, 2014). SnRK1 es una quinasa de serinas y treoninas que se activa durante el déficit de azúcares y en condiciones de déficit energético como la oscuridad y la hipoxia. Una vez activada favorece el catabolismo e inhibe el anabolismo para mantener la homeóstasis energética, por ejemplo, promueve la utilización de las reservas energéticas. Las vías de la hexoquinasa 1 y de *SnRK1* estarían conectadas aunque los detalles de la conexión no son conocidos. Por ejemplo, se ha observado que plantas de arroz que sobreexpresan SnRK1 son altamente sensibles en sus respuestas a glucosa mediadas por la hexoquinasa 1 durante el desarrollo de las plántulas (Cho *et al.*, 2012). A su vez, las interacciones entre la glucosa y la vía de las hormonas son muy extensas, aunque el conocimiento acerca de los mecanismos involucrados es incompleto (Eveland y Jackson, 2012; Rolland *et al.*, 2006; Moore *et al.*, 2003). Se sabe que la hexoquinasa 1 interviene en la interconexión de la vía de señalización de la glucosa y ciertas hormonas como las citoquininas y las auxinas. Por ejemplo, la mutante de hexoquinasa 1 (*gin2*) es resistente al tratamiento con auxina y mutantes resistentes a auxinas son insensibles a altas concentraciones de glucosa (Eveland y Jackson, 2012). Las plantas silenciadas tienen niveles de ABA disminuidos y a su vez niveles de glucosa aumentados. Esta relación es inversa a lo esperado si se considera lo informado hasta el momento en la literatura (Rolland *et al.*, 2006; Eveland y Jackson, 2012), aunque hay que tener en cuenta que la mayor parte de los estudios acerca de los efectos de la glucosa sobre los niveles de ABA se realizaron en plántulas y no en plantas adultas. Los resultados de esta Tesis sugieren que el catabolismo del ABA podría estar aumentado en las hojas de las plantas silenciadas dado que los altos niveles de glucosa y de la hexoquinasa 1 podrían llevar a la glicosilación del ABA para generar ésteres de glucosil-ABA (Xu *et al.*, 2002; Bolouri-Moghaddam *et al.*, 2010).

En cuanto al metabolismo de las giberelinas se observaron diferencias en los niveles de las mismas y en las proporciones entre los productos y los sustratos, lo cual sugiere alteraciones en la actividad de las oxidasas GA20 y GA3. Existen también interacciones

entre la vía de las giberelinas y de los azúcares. Por ejemplo, las giberelinas regulan la fotosíntesis y las relaciones fuente-destino a través de la regulación de la SPS (*sucrose phosphate synthase*) y de invertasas (Biemelt *et al.*, 2004; Huerta *et al.*, 2008; Iqbal *et al.*, 2011). Por otro lado, las giberelinas son necesarias para integrar el metabolismo de hidratos de carbono y nitrógeno en concentraciones ambientales de CO₂ y obtener una biomasa óptima en plantas de *arabidopsis* (Ribeiro *et al.*, 2012) y, además, se sabe que en esta especie el déficit de azúcares que se produce por defectos en el metabolismo del almidón reduce la expresión de la ent-kaureno sintasa, enzima clave en la síntesis de giberelinas (Papapelli *et al.*, 2013). La regulación de la bioactividad de las giberelinas también se da por la glicosilación de sus especies (Boulori-Moghaddam *et al.*, 2010). Entonces, las alteraciones en los niveles de giberelinas también podrían estar dadas por las alteraciones en los niveles de glucosa. Además, se observó que los niveles de *Asr1* aumentaban con el tratamiento con GA3 en las plantas controles (datos no mostrados). Esto está de acuerdo con el hecho de que los niveles de transcriptos de *Asr5* de arroz aumentan luego de un tratamiento con GA3 (Takasaki *et al.*, 2008). Es decir que la regulación de *Asr1* por ABA, GA y azúcares proporciona información sobre un nuevo vínculo entre las vías hormonales y de azúcares.

2.3.3. Las líneas silenciadas presentan síntomas de senescencia acelerada

Un aspecto notable del fenotipo de las plantas silenciadas es la ocurrencia de clorosis y necrosis en sus hojas. Este fenotipo, junto a otras características de las hojas como la disminución en la asimilación de CO₂, la degradación de la subunidad mayor y menor de la Rubisco, el deterioro acelerado de las hojas luego del período de incubación y el aumento de las especies reactivas del oxígeno, señalan que las plantas silenciadas experimentan un proceso de senescencia acelerado (Yoshida *et al.*, 2002; Rolland *et al.*, 2006; Gregersen *et al.*, 2008; Breeze *et al.*, 2011). En algunas especies, incluido el tabaco, el incremento en el contenido de glucosa y en otros azúcares solubles en las células del mesófilo puede desencadenar la senescencia (Rolland *et al.*, 2006; Slewinski, 2011; Wingler *et al.*, 2012). Al igual que en otros aspectos de la fisiología de las plantas, se ha propuesto que la señalización por azúcares en la senescencia está mediada por la hexoquinasa 1 (Dai *et al.*, 1999; Swartzberg *et al.*, 2011). Entonces, es posible que los aumentos de glucosa y de la hexoquinasa 1 hayan disparado la senescencia en las plantas silenciadas. Es más, altos niveles de glucosa inhiben la fotosíntesis a través de la hexoquinasa 1 (Sheen *et al.*, 1990; Moore *et al.*, 2003) y, a su vez, la inhibición de la fotosíntesis puede llevar a la senescencia (Dai *et al.*, 1999). Es decir que la inhibición de la fotosíntesis en las plantas silenciadas también pudo haber activado la senescencia. Por otro lado, las plantas silenciadas tuvieron altos niveles de H₂O₂ (una especie reactiva del oxígeno o ROS) que también

podieron contribuir al establecimiento de la senescencia dado que las ROS pueden actuar como moléculas señales que activan a los genes de senescencia (Jongebloed *et al.*, 2004; Boulori-Moghaddam *et al.*, 2010). A su vez, los niveles de ROS también están asociados con la hexoquinasa. Mientras que la hexoquinasa 1 está involucrada en la remoción de las ROS cuando su incremento es temporal a través de la inducción de mecanismos antioxidantes, se ha propuesto que un incremento drástico de los niveles de ROS pueden gatillar la senescencia luego de la liberación de la hexoquinasa de la membrana de la mitocondria (Boulori-Moghaddam *et al.*, 2010). La disminución de la actividad de SnRK1 también acelera la senescencia y lo opuesto ocurre cuando aumenta su actividad en distintas etapas del desarrollo de la planta (Rolland *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2012; Wingler *et al.*, 2012). Los tabacos silenciados mostraron niveles disminuidos del ARNm de *SnRk1.1* (subunidad catalítica de SnRK1), una característica de las plantas que podría estar influyendo en el comienzo temprano de la senescencia observado en estas plantas. A nivel hormonal, el ABA no es necesario para la inducción de la senescencia asociada con azúcares (Pourtau *et al.*, 2004) y las giberelinas, por otro lado, retrasan la senescencia (Gan, 2010). Aunque las plantas silenciadas no tuvieron diferencias significativas en el contenido de GA1, no se puede excluir que otras giberelinas u otras hormonas estén influyendo en el fenotipo observado. En la literatura ya se había relacionado a ASR1 con el desarrollo de senescencia en plantas de maíz debido a condiciones de estrés (Jeanneau *et al.*, 2002). El tratamiento con GA3 produjo un deterioro importante en las plantas silenciadas, lo cual es opuesto a los efectos conocidos de las giberelinas sobre la senescencia (Gan, 2010). Por lo tanto, el fenotipo observado bajo el tratamiento con GA3 sería consecuencia de interacciones complejas entre los cambios producidos por el silenciamiento de *Asr1* y el tratamiento con GA3.

2.3.4. Otras alteraciones fenotípicas en las líneas silenciadas pueden estar dadas por alteraciones en el metabolismo de la glucosa y hormonales

Además de la senescencia acelerada, las plantas silenciadas mostraron otros cambios fenotípicos tales como los tallos acortados, el retraso en la floración y la biomasa reducida. Estos rasgos son altamente complejos y regulados a distintos niveles. Algunas de las causas más probables de estos cambios son las menores tasas de fotosíntesis y la reducción concomitante de la exportación de sacarosa que implica una disminución del flujo de carbono hacia los tejidos destinos y también las alteraciones hormonales que se producen por el incremento de los niveles aumentados de glucosa en las hojas. A su vez, los tejidos destinos podrían tener alteraciones en la captación de glucosa. Aunque ASR1 probablemente no esté relacionado con la descarga del floema dado que este proceso suele ser simplástico (Turgeon y Wolf, 2009), puede estar involucrado a través de *Ht1* en

la recuperación de las hexosas que difunden de las células hacia el apoplasto (Lalonde *et al.*, 2003; Vignault *et al.*, 2005; Slewinski, 2011; Reuscher *et al.*, 2014) dado que ambas proteínas se expresan en tejidos destino como los tallos de tabaco (Saumonneau *et al.*, 2012). Además, cuando la actividad de los tejidos destino disminuye, los hidratos de carbono se acumulan en las hojas y la fotosíntesis se inhibe por un mecanismo de retroalimentación (Paul y Foyer, 2001; Lalonde *et al.*, 2003; Ainsworth y Bush, 2011). De esta manera, podría haber otros mecanismos que contribuyan a la acumulación de azúcares.

El acortamiento de los tallos es una característica fenotípica que puede estar asociada a un déficit en las giberelinas activas. Se ha propuesto que las hojas maduras de plántulas de tabaco producen GA1 o GA20 como moléculas señales necesarias para estimular el crecimiento de las células madres (Dayan *et al.*, 2012). De manera similar, Gallego-Giraldo *et al.* (2007) propusieron, basándose en distintos patrones de GA20 y GA1, que las hojas podrían ser la fuente de los precursores de giberelinas para las células madres de tabaco. No hubo cambios en los niveles de GA1 en las hojas expandidas de las plantas silenciadas. Sin embargo, la reducción en los niveles de GA20 en las plantas silenciadas podría entonces explicar potencialmente el fenotipo de las líneas transgénicas. Por otro lado, las líneas silenciadas revirtieron el fenotipo de entrenudos cortos en respuesta al tratamiento con GA3, lo cual confirma que la sensibilidad a GA3 en los tallos no está modificada en estas plantas. Es notable que el fenotipo de las plantas silenciadas coincida con un trabajo previo donde manipularon los niveles de la actividad de la GA20 oxidasa en tabaco y observaron plantas con tallos acortados y sensibilidad conservada a GA3 (Biemelt *et al.*, 2004). También se observó un incremento en la biomasa de las plantas *wild-type* luego del tratamiento con GA3, lo cual sugiere que hay un cambio en la asimilación global de CO₂, un efecto que ya estaba descrito para las giberelinas (Biemelt *et al.*, 2004). Sin embargo, las plantas silenciadas no tuvieron la biomasa alterada luego del tratamiento con GA3. La observación que las plantas *wild-type* tenían menores niveles de sacarosa y mayores niveles de glucosa y fructosa en las hojas probablemente se deba a la promoción de la actividad de la invertasa por GA3 (Iqbal *et al.*, 2011). En el caso de las plantas silenciadas no hay cambios en los azúcares, probablemente debido a la inhibición de la actividad de la invertasa por el contenido de glucosa.

El cambio del meristema apical de vegetativo a reproductivo se controla por el contenido de azúcares y sus señales (Francis y Halford, 2006). Hay muchos casos que describen que las interrupciones en la disponibilidad de hexosas genera retrasos en el tiempo a floración (Eveland y Jackson, 2012; Slewinski, 2011). Por ejemplo, plantas de *Arabidopsis* silenciadas para el transportador de hexosas *Vgt1* tienen la floración retrasada

(Slewelinski, 2011). Esto sugiere que el mayor tiempo a floración en las plantas silenciadas puede deberse a la afectación en la disponibilidad de azúcares. Sin embargo, también podría haber efectos hormonales. Las giberelinas están íntimamente relacionadas con la floración. En tabaco se ha demostrado que la GA1 y la GA4 que se acumulan en los meristemas apicales y en las hojas no son las giberelinas activas en la floración y que, a diferencia de lo que ocurre en *arabidopsis*, la concentración de giberelinas en los meristemas se correlacionan con la expresión de genes del metabolismo de las giberelinas en esos tejidos, lo cual sugiere que las giberelinas activas en la floración se sintetizan localmente (Gallego-Giraldo *et al.*, 2007). De esta forma no se puede descartar que las plantas silenciadas para *Asr1* tengan alteraciones en la síntesis meristemática de giberelinas que afecten la floración. Sin embargo, tampoco se pueden descartar otros cambios hormonales que pudiesen estar influyendo sobre el fenotipo de floración retrasada que presentan las líneas silenciadas.

2.4. CONCLUSIONES

En este capítulo se presentan evidencias acerca del rol que cumple ASR1 en el control del metabolismo de las plantas y del papel de esta proteína en las vías de la glucosa, el ABA y las giberelinas en hojas de tabaco. Los resultados obtenidos en relación al rol de ASR1 en el metabolismo de azúcares están en línea con los obtenidos para otras especies como uva (Çakir *et al.*, 2003) y papa (Frankel *et al.*, 2007). Además se confirmó que *Asr1* está involucrado en la vía del ABA y se encontró que también estaría involucrado en la vía de las giberelinas. El hecho de que las plantas silenciadas muestren cambios fenotípicos marcados y las plantas sobreexpresantes no, podría ser un indicio de que los niveles de ASR1 en las plantas controles estuviesen saturados en cuanto al efecto de ASR1 en el metabolismo de la glucosa. Este trabajo indica claramente que ASR1 modula los niveles de glucosa en tejidos fotosintéticos de tabaco, probablemente a través de su efecto sobre el transportador de hexosas *Ht1*. Esta regulación tiene un impacto sobre la señalización de azúcares mediada por la hexoquinasa 1 y por SnRK1, que subsecuentemente afectan a la fotosíntesis, la senescencia foliar y los niveles hormonales.

Capítulo 3

Análisis funcional de ASR1 en plantas de tomate

3.1. INTRODUCCIÓN

El estudio del rol de ASR1 en los mecanismos de tolerancia a estrés se ha estudiado en tomate con bastante profundidad, como ya se ha descrito. No sólo se sabe que su expresión es inducida por estrés y por ABA en hojas (Amitai-Zeigersona *et al.*, 1995; Maskin *et al.*, 2001; Iusem *et al.* 1993; Amitai-Zeigersona *et al.*, 1995) sino que además se conocen algunos de sus blancos directos (Ricardi *et al.*, 2014). Por otro lado, la función de ASR1 como proteína de tipo chaperona se probó inicialmente en ASR1 de tomate (Konrad y Bar-Zvi, 2008). Recientemente se realizaron ensayos de resistencia a estrés de plantas de tomate con niveles alterados de *Asr1*. Las plantas de tomate que sobreexpresan *Asr1* tuvieron un aumento de la tolerancia a estrés por sequía (Figura 3.1; Golan *et al.*, datos no publicados). No se pudo comprobar que esas plantas fuesen resistentes a estrés salino, aunque se observó un aumento de la tolerancia a dicho estrés en plantas de arabis por la expresión heteróloga de ASR1 de tomate (Yang *et al.*, 2005). Estos resultados reflejan claramente que ASR1 favorece los mecanismos de tolerancia a estrés en tomate aunque todos los trabajos se centraron en el estudio de ASR1 en tejidos vegetativos y/o cuando las plantas se encontraban en fase vegetativa. No hay por lo tanto datos que indiquen el rol de ASR1 en estrés en otros tejidos. En este capítulo se intentará dilucidar si ASR1 posee un rol en vías asociadas a estrés en frutos de tomate a partir del análisis de microarreglos de frutos de plantas con niveles alterados de ASR1.



Figura 3.1. Ensayo fisiológico de resistencia a estrés por sequía de las plantas que sobreexpresan y silencian *Asr1*. Ensayo realizado en colaboración con Golan I. y Bar-Zvi D. (Golan *et al.*, datos no publicados). Las fotografías **A** y **B** muestran plantas representativas de las líneas *wild-type* (WT) y de las sobreexpresantes S31, S12 y S16 (de izquierda a derecha). En la fotografía **A** se muestran las plantas luego de 22 días de deshidratación y en la **B** luego de 17 días de rehidratación de las mismas plantas. En el gráfico **C** se muestra el porcentaje de supervivencia de las líneas controles (WT), sobreexpresantes (OE) y silenciadas (AS), medido al final de la etapa de rehidratación.

Por otro lado, no existen evidencias acerca de las vías metabólicas en las cuales participa ASR1 en tomate. Sin embargo, plantas de papa transgénicas que sobreexpresan constitutivamente ASR1 de tomate, presentaron reducciones significativas en los niveles de glucosa en tubérculos y simultáneamente una disminución significativa en los niveles del transportador de hexosas *Ht2*, así como también alteraciones en el contenido de

aminoácidos (Frankel *et al.*, 2007). Por otro lado, la sobreexpresión de *Asr1* de tomate en plantas de tabaco no generó cambios en los niveles de glucosa en sus hojas (capítulo 2). Otras evidencias sobre el rol de *Asr1* en el metabolismo son la disminución de aminoácidos en hojas de maíz por la sobreexpresión de su ortólogo (Virilouvet *et al.*, 2011) y el aumento de glucosa en hojas de *Arabidopsis* por la expresión heteróloga de *Asr1* de plátano (Dai *et al.*, 2011). Esta información sugiere que *Asr1* estaría involucrado en el control del metabolismo de azúcares y/o de aminoácidos en plantas de tomate. Como ya ha sido introducido en el capítulo 1, el entendimiento de la regulación del metabolismo primario en frutos es importante dado que impacta directamente en la calidad del fruto fresco (Giovannoni, 2007).

A pesar de la información disponible, sobre todo de la participación de ASR1 de tomate en estrés, no existen datos sobre las vías en las cuales ASR1 está involucrado que reflejen no sólo los blancos directos sino también los blancos indirectos y los efectos finales sobre el metabolismo y el fenotipo. Como consecuencia se desconoce el rol que cumple ASR1 en tomate más allá de su participación en los mecanismos de tolerancia a estrés. Más aun, no existen trabajos funcionales de ASR1 en frutos de tomate, con lo cual su rol en este tejido sigue siendo esencialmente desconocido. De esta forma, los objetivos de este capítulo están focalizados en ampliar la información sobre las vías en las cuales participa ASR1 y su efecto en tomate, con particular atención en su rol en el fruto. En base a la literatura existente se propone que ASR1 participa en vías de estrés y en vías del metabolismo primario en frutos de tomate. Sin embargo, la estrategia metodológica empleada para el estudio de las líneas transgénicas de tomate fue diferente a la empleada para estudiar las líneas de tabaco. En este capítulo se utilizaron técnicas *high-throughput* como son los microarreglos y los análisis de metabolómica para generar nuevas hipótesis sobre la función de ASR1 en frutos de tomates. Se espera entonces no sólo poder corroborar la participación de ASR1 en vías de estrés y en vías del metabolismo primario en frutos de tomate sino también generar nueva información sobre el rol de esta proteína, sobre todo en lo que respecta a las vías de señalización en las cuales participa ASR1 en frutos.

En este capítulo se abordan el segundo, tercer y cuarto objetivos específicos de esta Tesis:

2) Caracterizar plantas de tomate transgénicas con niveles alterados de la proteína ASR1 de manera constitutiva y de manera específica en frutos, desde un punto de vista molecular, fenotípico y bioquímico. Este objetivo aborda el estudio de los efectos fenotípicos y bioquímicos que se generan por la alteración de los niveles de *Asr1* en plantas de tomate. Permitirá conocer las vías metabólicas en las cuales interviene *Asr1* en tomate y sus posibles efectos en el fenotipo. El empleo de un promotor constitutivo (35S del virus del mosaico del coliflor) y de un promotor específico de frutos (B33 del gen de la

patatina de papa) permitirá también diferenciar los efectos bioquímicos que se produzcan por la alteración sistémica de *Asr1* de aquéllos que sean consecuencia de la alteración de la expresión de *Asr1* en el fruto.

3) Analizar perfiles transcripcionales de plantas de tomate transgénicas con niveles alterados de *Asr1* e identificar posibles motivos regulatorios en los genes cuya expresión está alterada en estas plantas transgénicas. Este objetivo aborda el estudio de los perfiles transcripcionales en frutos de tomate con los niveles de *Asr1* alterados. Esto permitirá conocer las redes transcripcionales en las cuales opera *Asr1*. Además el estudio de los motivos sobrerrepresentados en las regiones regulatorias de los genes alterados en las plantas transgénicas permitirá modelar las vías en las cuales intervendría *Asr1*.

4) Analizar integralmente los perfiles transcripcionales y metabólicos de las plantas con niveles alterados de *Asr1* para la reconstrucción de las redes metabólicas en las que esta proteína opera. Este objetivo aborda la integración de los perfiles transcripcionales y metabólicos de los frutos de tomate con los niveles de *Asr1* alterados. Esto permitirá revelar la coordinación entre los cambios transcripcionales y los cambios metabólicos en las plantas transgénicas y de este modo reforzar la información sobre las vías en las cuales actuaría *Asr1*.

3.2. RESULTADOS

3.2.1. Obtención y selección de plantas transgénicas de tomate con niveles alterados de *Asr1*

Para el análisis funcional del gen *Asr1* en plantas de tomate se obtuvieron líneas transgénicas con una construcción que contiene las 348 pb desde el ATG hasta el codón de terminación del gen *Asr1* de tomate (Iusem *et al.*, 1993) en orientación sentido (S) o antisentido (AS) bajo el control del promotor constitutivo 35S (figura 3.2).

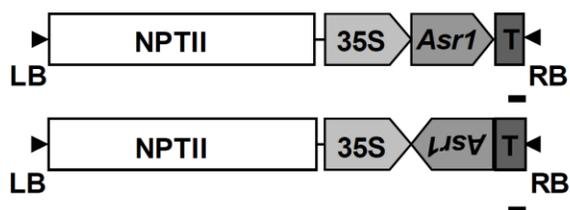


Figura 3.2. Esquemas de las construcciones empleadas en la generación de las plantas transgénicas de tomate: la región codificante del gen *SlAsr1* se clonó en sentido (*sense*: S, arriba) y en antisentido (*antisense*: AS, abajo) en el vector pBINAR (Liu *et al.*, 1990) bajo el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor. Este vector contiene al gen de selección NPTII bajo el promotor NOS que confiere resistencia a kanamicina. Las barras indican 100 pares de bases.

Inicialmente, se seleccionaron las líneas transgénicas por análisis de *Northern blots* (Figura 3.3 A y B). A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron por sus niveles de expresión las líneas sobreexpresantes S12, S16 y S31 (Figura 3.3 A) y las líneas silenciadas AS5, AS17 y AS18 (Figura 3.3 B). Luego de esta selección se realizó un análisis de los patrones de segregación de la resistencia al marcador selectivo kanamicina de las tres líneas *sense* (líneas S12, S16 y S31) y de dos líneas *antisense* (líneas AS5 y

AS17). Las mismas mostraron un patrón de segregación 3:1 (resistencia:susceptibilidad) en un medio con kanamicina, lo cual sugeriría un único sitio de inserción del transgén. Se transfirieron al invernáculo entre 15 y 20 plantas de cada una de las líneas seleccionadas (generación T1) para un nuevo análisis de los niveles de expresión de *Asr1*. Se evaluaron hojas de dos muestras biológicas independientes de cada una de las plantas. Las líneas S12, S16 y S31 se evaluaron a través de *Western blots* con un anticuerpo específico para ASR1, que mostraron que los niveles de la proteína ASR1 eran mayores que en los controles sin transformar (figura 3.3 C). Asimismo, las plantas T1 de las líneas *antisense* (líneas AS5 y AS17) fueron analizadas por *qPCR* utilizando oligonucleótidos específicos para el gen *Asr1* y mostraron niveles del ARNm significativamente menores a los controles sin transformar (figura 3.3 C). Posteriormente, se seleccionó una tercera línea *antisense* (AS18), que había sido seleccionada previamente por *Northern blot* (figura 3.3 B), por su patrón de su segregación en kanamicina. Los niveles de expresión de *Asr1* en las plantas T1 descendientes de la línea AS18 fueron evaluados por *qPCR* en los experimentos realizados posteriormente junto al resto de las líneas (figura 3.4). A continuación, se

seleccionaron entre 1 y 3 plantas de cada una de las líneas S y AS en la generación T1 de acuerdo a sus niveles de expresión y se propagaron vegetativamente obteniéndose entre 6 y 8 plantas por línea junto a los controles no transformados (plantas *wild-type*) para los análisis posteriores.

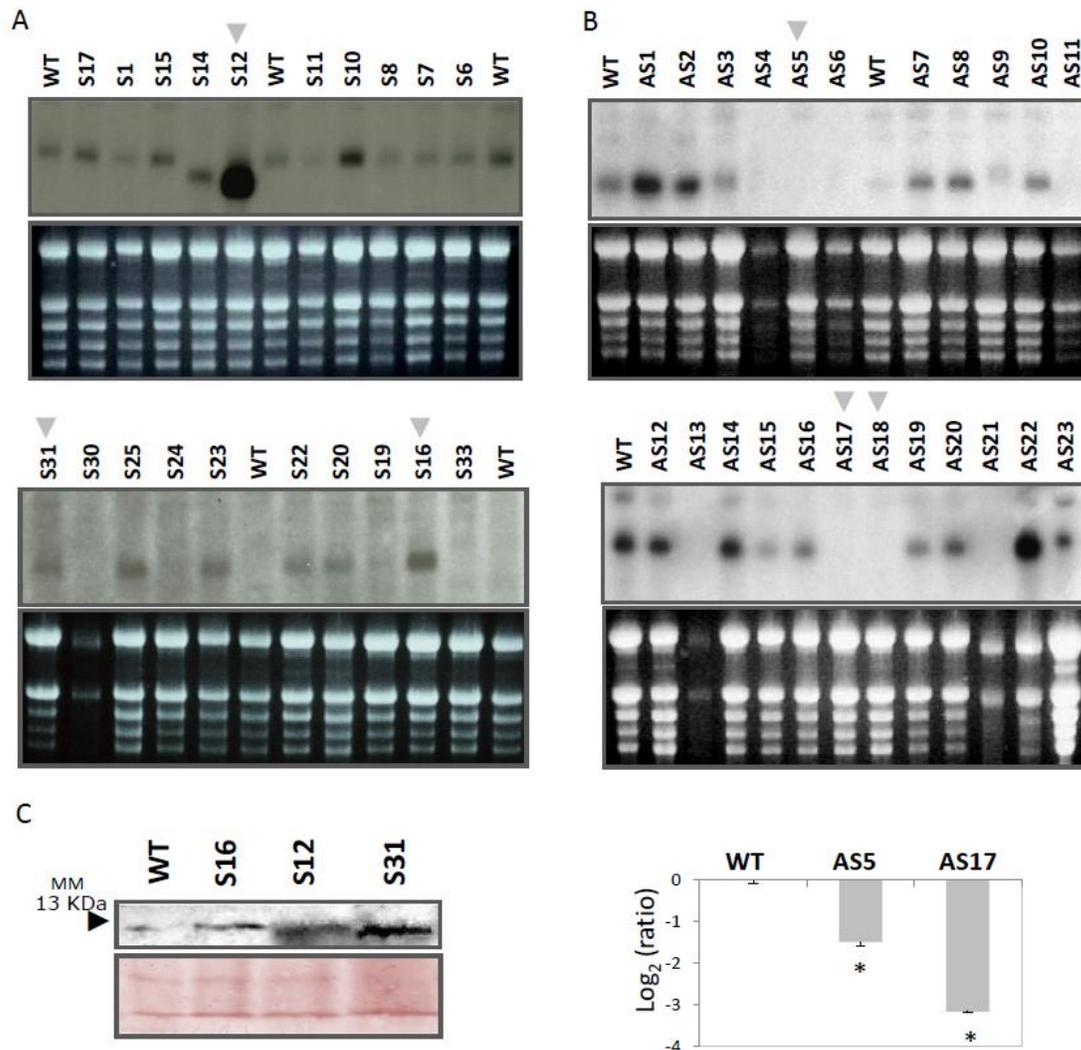


Figura 3.3. Selección de plantas de tomates transgénicas con el gen *SlAsr1* en sentido (S) o en antisentido (AS) bajo el control del promotor 35S. **A y B.** Niveles del ARNm de *Asr1* detectado a través de *Northern blots* realizados en tejido foliar de plantas T0 con seis hojas expandidas de todas las líneas S (**A**) y AS (**B**) obtenidas en el ensayo de transformación y de plantas sin transformar (WT). Debajo de cada *Northern blot* se muestra el gel de agarosa (1,5%) del ARN total empleado para la transferencia. Las flechas grises indican las líneas seleccionadas. **C.** Niveles de ASR1 detectados a través de *Western blots* (WB) realizados en hojas fuentes (3°-4° hoja expandida) de las tres líneas S T1 seleccionadas (S12, S16 y S31) y de plantas no transformadas (WT) (izquierda). Los WB se revelaron con un suero anti-ASR1 (Maskin *et al.*, 2007) (panel superior). En el panel inferior se observa la membrana de WB teñida con Rojo Ponceau. A la derecha: Niveles

del ARNm de *Asr1* cuantificados por *qRT-PCR* en tejido foliar de dos líneas transgénicas AS T1 seleccionadas (AS5 y AS17) relativos a los niveles en las plantas controles WT y normalizados por el gen de referencia *18S rRNA* (*ratio*). Las barras de error representan el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con las plantas WT (prueba de permutación, $p < 0,05$, $n = 3-5$).

Para los análisis fenotípicos, bioquímicos y moleculares, se realizaron tres experimentos independientes llamados I, II y III. Estos experimentos fueron realizados en condiciones de invernáculo durante los meses de abril-noviembre, diciembre-marzo y julio-noviembre, respectivamente. Las plantas seleccionadas (figura 3.3) fueron propagadas vegetativamente y en cada ensayo se midieron los niveles de expresión de *Asr1*. Mientras se corroboró el silenciamiento de *Asr1* en todas las líneas AS en todos los ensayos, no ocurrió lo mismo con las plantas 35::*Asr1* (S), que no mostraron niveles de expresión de *Asr1* estadísticamente mayores a los controles (figura 3.4).

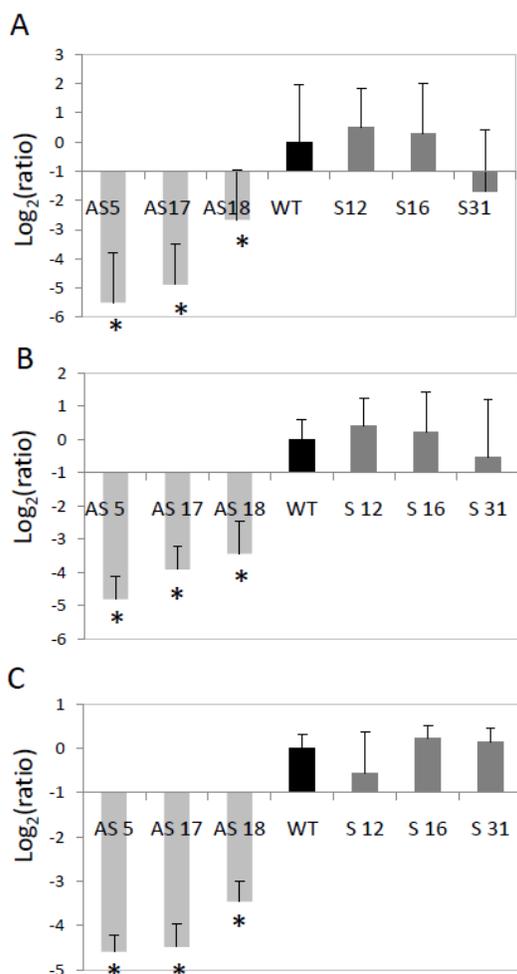


Figura 3.4. Análisis de los niveles de expresión de *Asr1* en frutos de las líneas de tomate transgénicas. Niveles del ARNm de *Asr1* cuantificados por *qPCR* en frutos maduros de las líneas transgénicas seleccionadas (figura 3.3) y del control WT. Las plantas T1 (entre 4 y 8 plantas por línea) fueron propagadas vegetativamente y utilizadas en los experimentos I (A), II (B) y III (C). Las barras representan los niveles del ARNm de *Asr1* en las líneas transgénicas relativos a los niveles del ARNm en las plantas WT, ambos normalizados por los niveles del ARNm del gen de referencia (*18S rRNA*) (el *ratio*). Las barras de error representan al error estándar. Los experimentos I, II y III fueron realizados en condiciones controladas de invernáculo durante los meses de abril-noviembre, diciembre-marzo y julio-noviembre, respectivamente. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con las plantas WT (prueba de permutación, $p < 0,05$, $n = 3-5$).

En los mismos ensayos se midieron los niveles de los parálogos de *Asr1* (*Asr2*, *Asr3/5* y *Asr4*) por *qPCR*. *Asr2* mostró niveles estadísticamente menores en los experimentos I y III en las plantas silenciadas (figura 3.5A). En cambio en las líneas S, *Asr2* mostró un comportamiento más errático: en la línea S12 estuvo aumentado en el experimento I y disminuido en el experimento III, mientras que sus niveles disminuyeron

en la línea S31 durante el experimento III (figura 3.5A). Los niveles de *Asr3/5* no mostraron una tendencia clara: resultaron disminuidos en las plantas silenciadas AS5 en el experimento II y disminuidos en las líneas AS18 y S31 en el experimento III (figura 3.5B). *Asr4* sólo mostró diferencias en la línea S16 durante el experimento I (figura 3.5C).

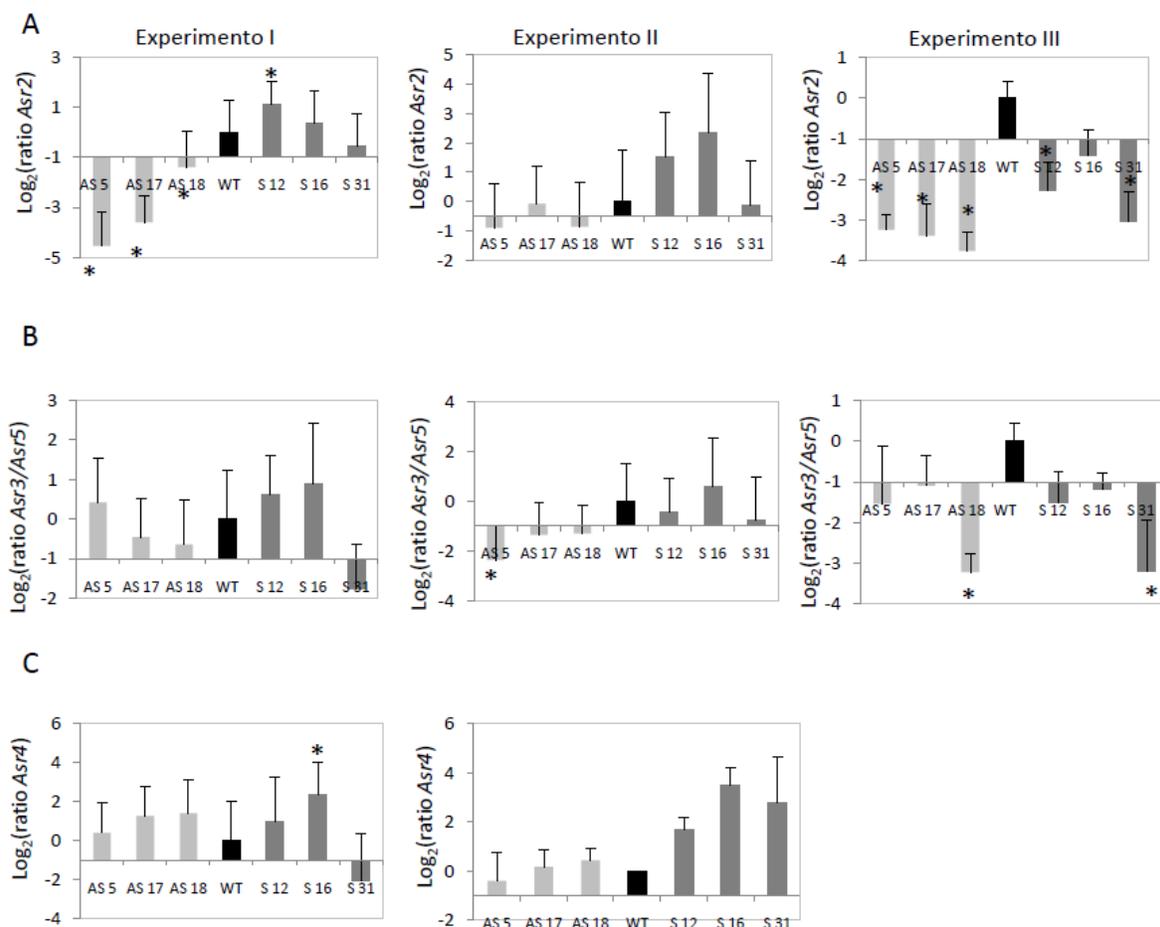


Figura 3.5. Niveles de ARNm de los genes *Asr2*, *Asr3/5* y *Asr4* en frutos maduros de las líneas de tomate transgénicas. Los niveles de ARNm de los genes *Asr2*, *Asr3/5* y *Asr4* fueron cuantificados por *qRT-PCR* en frutos maduros en los experimentos I (A), II (B) y III (C). Las barras representan los niveles del ARNm del gen de interés en las líneas transgénicas relativos a los niveles del ARNm en las plantas WT, ambos normalizados por los niveles del ARNm del gen de referencia (*18S rRNA*) (el *ratio*). Las barras de error representan al error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con los niveles del ARNm en las plantas WT (prueba de permutación, $p < 0,05$, $n = 3-5$).

Para conocer la relación entre los niveles del ARNm de los distintos parálogos, se realizó una correlación de Pearson en cada uno de los experimentos (tabla 3.1). Se detectó una correlación positiva estadísticamente significativa entre *Asr1* y *Asr2* en el experimento I. En cambio, en los otros dos experimentos la correlación entre los niveles de estos dos

parálogos no resultó significativa. Entre *Asr1* y *Asr3*, sólo en el experimento II se observa una correlación estadísticamente significativa. La correlación entre *Asr2* y *Asr3* fue estadísticamente significativa en el experimento II.

Tabla 3.1. Correlación de Pearson de los niveles del ARNm de los parálogos de *Asr* en frutos maduros. Se realizó una correlación de Pearson de los niveles del ARNm de *Asr1*, *Asr2*, *Asr3/5* y *Asr4* de los frutos maduros (figuras 3.4 y 3.5) en los experimentos I (A), II (B) y III (C). Por debajo de la diagonal principal de las tablas (números en color gris) se muestra el coeficiente de correlación y por encima de la misma, la probabilidad asociada a la prueba de hipótesis de correlación. En negrita se muestran los valores significativos ($p < 0,05$).

A

	$\text{Log}_2(\text{Asr1})$	$\text{Log}_2(\text{Asr2})$	$\text{Log}_2(\text{Asr3/5})$	$\text{Log}_2(\text{Asr4})$
$\text{Log}_2(\text{Asr1})$	1,00	5,5E-05	0,60	0,90
$\text{Log}_2(\text{Asr2})$	0,98	1,00	0,79	0,98
$\text{Log}_2(\text{Asr3/5})$	0,24	0,13	1,00	0,06
$\text{Log}_2(\text{Asr4})$	0,06	0,01	0,73	1,00

B

	$\text{Log}_2(\text{Asr1})$	$\text{Log}_2(\text{Asr2})$	$\text{Log}_2(\text{Asr3/5})$	$\text{Log}_2(\text{Asr4})$
$\text{Log}_2(\text{Asr1})$	1,00	0,06	0,01	0,09
$\text{Log}_2(\text{Asr2})$	0,74	1,00	0,03	0,06
$\text{Log}_2(\text{Asr3/5})$	0,90	0,80	1,00	0,10
$\text{Log}_2(\text{Asr4})$	0,68	0,74	0,67	1,00

C

	$\text{Log}_2(\text{Asr1})$	$\text{Log}_2(\text{Asr2})$	$\text{Log}_2(\text{Asr3/5})$
$\text{Log}_2(\text{Asr1})$	1,00	0,08	0,80
$\text{Log}_2(\text{Asr2})$	0,69	1,00	0,06
$\text{Log}_2(\text{Asr3/5})$	0,12	0,74	1,00

Con el objetivo de diferenciar los efectos de la alteración constitutiva de los niveles del ARNm de *Asr1* de aquéllos que fueran consecuencia de la alteración de la expresión de *Asr1* en el fruto, se obtuvieron además plantas con una construcción similar a la empleada anteriormente a la que se le cambió el promotor por el del gen de la patatina de papa (B33; identificación en Pubmed: X60399), cuya expresión es específica de frutos (figura 3.6) (Rocha-Sosa *et al.*, 1989).

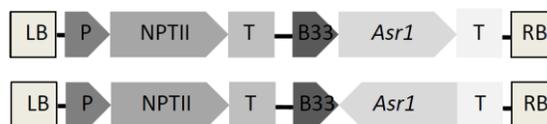


Figura 3.6. Esquemas de las construcciones empleadas en la generación de las plantas transgénicas de tomate: la región codificante del gen *SlAsr1* se clonó en sentido (*sense*: S, arriba) y en antisentido (*antisense*: AS, abajo) en el vector pBINB33 (Rocha-Sosa *et al.*, 1989) bajo el promotor del gen de la patatina de papa B33. Este vector contiene al gen de selección NPTII bajo el promotor NOS que confiere resistencia a kanamicina.

En forma similar a lo descrito anteriormente, líneas independientes T0 de plantas de tomate cv *Money Maker* transformadas con la construcción portadora del ADNc completo del gen *Asr1* de tomate en dirección sentido y antisentido bajo el promotor específico de fruto B33 y del gen de resistencia *NptII* (Figura 3.6) fueron crecidas *in vitro* en medio MS con kanamicina (100 mg/l). Se seleccionaron 3 líneas *sense* (líneas S3, S12 y S21) y 3 líneas *antisense* (líneas AS17, AS27 y AS28) que presentaron resistencia a la kanamicina en una proporción 3:1. Se transfirieron al invernáculo entre 15 y 20 plantas resistentes de cada línea para el análisis de los niveles de expresión de ASR1 que se detectaron por *Western Blot* tanto en los frutos como en las hojas, para evaluar la especificidad del promotor (figuras 3.7 A y B). Se corroboró la sobreexpresión de ASR1 en frutos en las líneas S3, S12 y S21 y el silenciamiento de ASR1 en frutos de las líneas AS17, AS27 y AS28 (figura 3.7 A). A su vez, se observó que la línea S3 no mantiene la especificidad de expresión en el fruto, ya que también sobreexpresa ASR1 en hojas (figura 3.7 B). De cada una de las líneas silenciadas o sobreexpresantes se seleccionaron entre 1 y 3 plantas de acuerdo a sus niveles de expresión. Luego se propagaron vegetativamente hasta obtener entre 6 y 8 plantas por línea junto a los controles no transformados (plantas *wild-type*) para los análisis posteriores. Estas líneas transgénicas fueron empleadas en los experimentos II y III, en los cuales se evaluó nuevamente los niveles de expresión de *Asr1* de las líneas. Las líneas AS17 y AS27 mostraron niveles de silenciamiento estadísticamente significativo en comparación con el control sin transformar en el experimento II (figura 3.7 C) pero no en el III (figura 3.7 E), mientras que las líneas *sense* (S) no mostraron sobreexpresión estadísticamente significativa, excepto la línea S21 en el experimento III (gráfico 3.7 C y E). En cuanto a las hojas, ninguna línea mostró alteraciones en los niveles de *Asr1* excepto la línea S12 (figura 3.7 D y F).

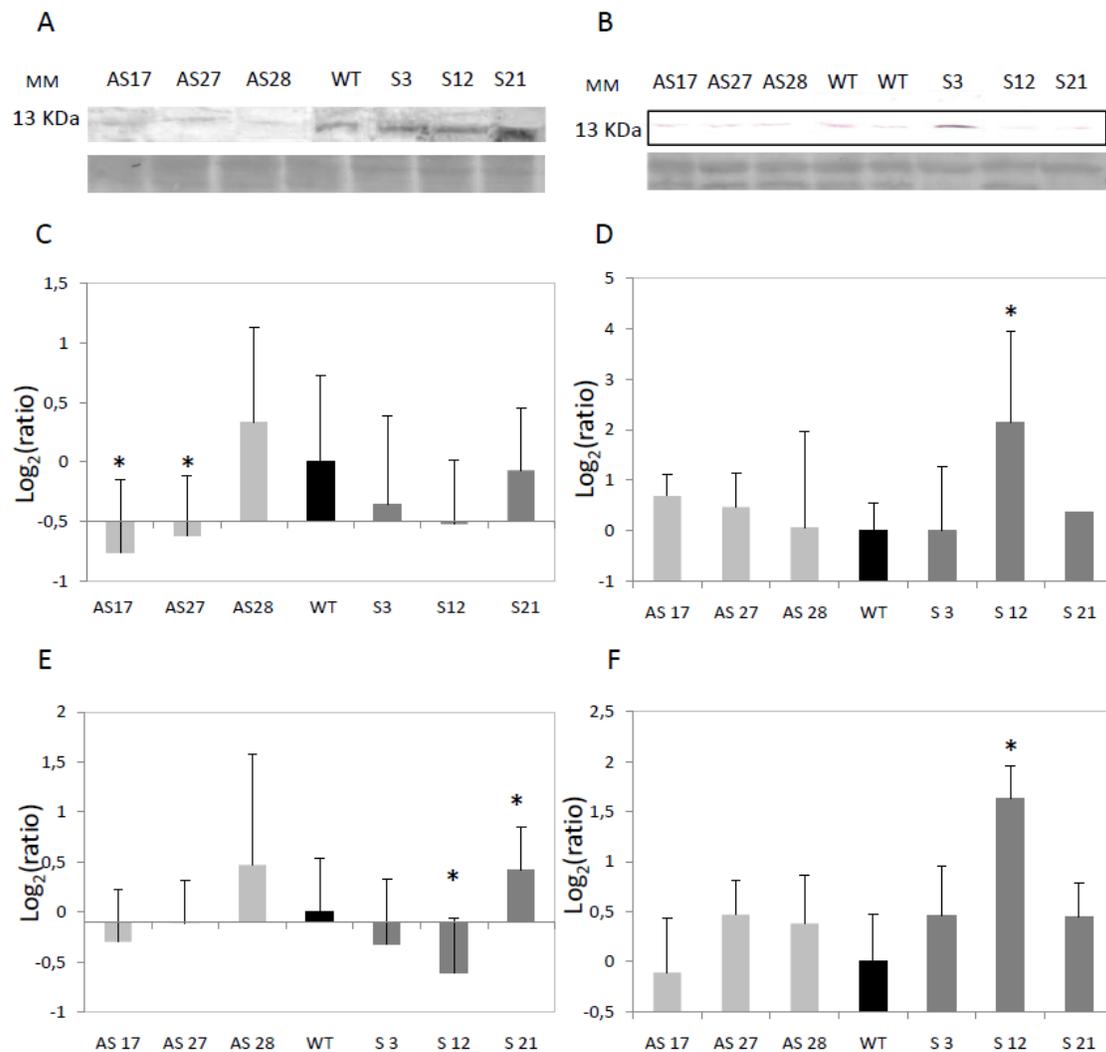


Figura 3.7. Niveles de expresión de *Asr1* de los tomate transgénicos con el gen *SlAsr1* en sentido o en antisentido bajo el promotor del gen de la patatina B33. **A y B.** Niveles de ASR1 detectados a través de Western blots (WB) realizados en frutos maduros (**A**) y hojas fuentes (3°-4° hoja expandida) (**B**) de tres líneas *antisense* T1 (AS17, AS27 y AS28), tres líneas *sense* T1 (S3, S12 y S21) y de plantas no transformadas (WT). Los WB se revelaron con un suero anti-ASR1 (Maskin *et al.*, 2007) (paneles superiores). En los paneles inferiores se observa la membrana de WB teñida con Rojo Ponceau. **C, D, E y F.** Los niveles del ARNm de *Asr1* fueron cuantificados por qRT-PCR en frutos maduros (**C y E**) y hojas fuentes (**D y F**) de plantas propagadas vegetativamente a partir de las líneas T1 seleccionadas (**A**) y de las plantas controles (WT). Estos clones fueron utilizados en los experimentos II (**C y D**) y III (**E y F**). Las barras representan los niveles de cambio del ARNm de *Asr1* en las líneas en comparación con los niveles del ARNm de *Asr1* en las plantas controles, ambos normalizados por los niveles del ARNm del gen de referencia *18S rRNA* (el *ratio*). Las barras de error representan el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con los niveles del ARNm en las plantas WT (prueba de permutación, $p < 0,05$, $n = 3-5$).

3.2.2. Análisis fenotípico de las plantas transgénicas de tomate

Las líneas seleccionadas por los niveles de sobreexpresión del transgén y de silenciamiento del gen endógeno fueron evaluadas para caracteres de crecimiento vegetativo y reproductivo. Las variables medidas fueron: conductancia estomática, peso total de frutos maduros, número de frutos maduros producidos por planta, grados Brix y peso promedio de los frutos. En el caso de las líneas transgénicas S y AS con la construcción 35S::*Asr1*, el análisis fenotípico se realizó en tres experimentos independientes, llamados experimentos I a III (figura 3.8 y tabla 1 del anexo). Si bien en el experimento I se observó una disminución significativa en el peso total y número de los frutos maduros en las líneas silenciadas, en los demás experimentos las diferencias no resultaron significativas en comparación con los controles (figura 3.8). Los demás parámetros evaluados no mostraron diferencias significativas en ninguno de los experimentos (figura 3.8). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en la conductancia estomática (tabla 2 del anexo) medida en el experimento I. En el caso de las líneas S y AS con la construcción B33::*Asr1*, se realizaron dos experimentos independientes simultáneamente con las líneas 35S::*Asr1* (experimentos II y III) y tampoco se observaron diferencias fenotípicas en comparación con las plantas controles (figura 3.8 y tabla 1 del anexo). El análisis de las medias multivariadas arrojó que en el experimento I los genotipos no se diferencian en su fenotipo global de manera estadísticamente significativa de las plantas controles. A su vez, este análisis mostró que las líneas 35S::*Asr1* S12 y S31 y las líneas B33::*Asr1* AS17 y AS27 en el experimento II y las líneas 35S::*Asr1* AS18 y S31 en el experimento III se agrupan separadamente de los controles sin transformar (tabla 3.3).

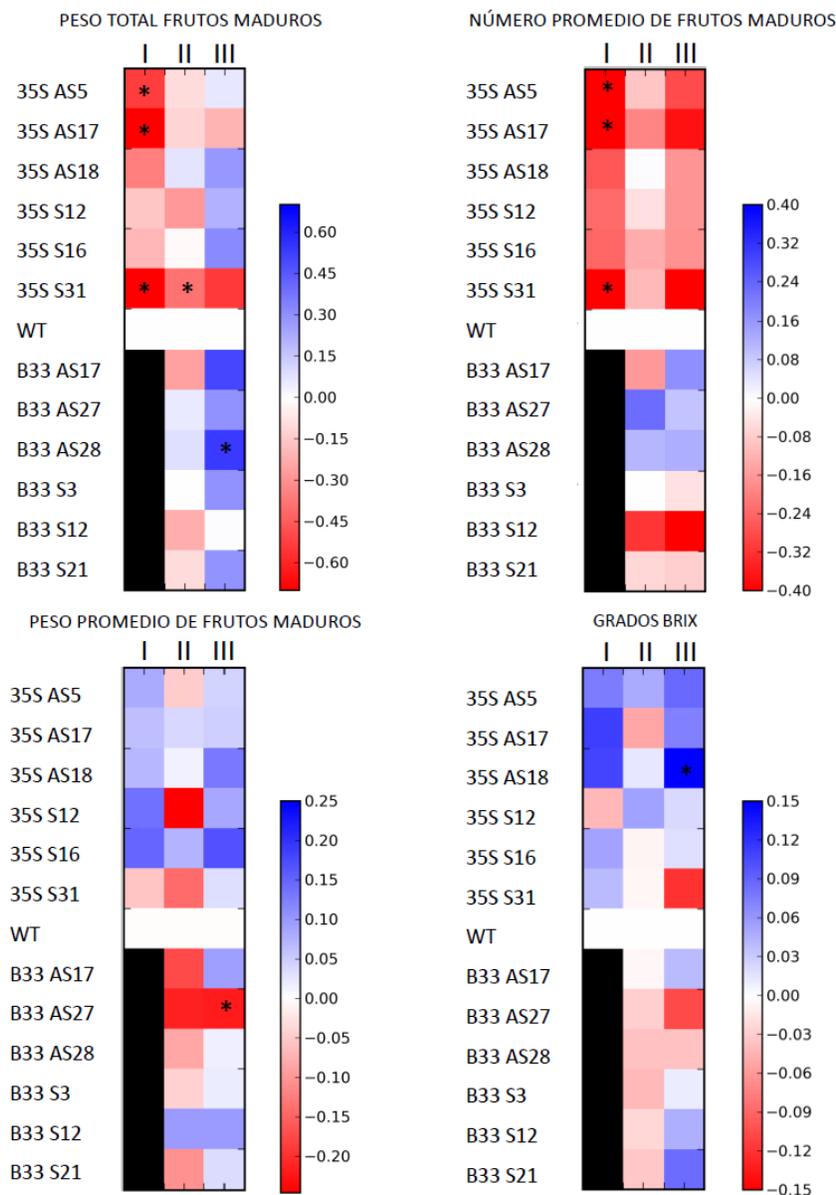


Figura 3.8. Análisis fenotípico de las líneas transgénicas de tomate para *Asr1* bajo los promotores 35S y B33. Las líneas 35S::*Asr1-sense* (S12, S16, S31), 35S::*Asr1-antisense* (AS5, AS17, AS18), B33::*Asr1-sense* (S3, S12, S21), B33::*Asr1-antisense* (AS17, AS27, AS28) y los controles (WT) se evaluaron fenotípicamente en tres experimentos independientes (experimentos I, II y III, en las columnas de los gráficos). Se muestran mapas de calor de los valores promedio de las líneas en relación con el control, transformados logarítmicamente para cada variable medida (peso total de frutos maduros producido por planta, número de frutos maduros producidos por planta, peso promedio de los frutos maduros producidos por planta y grados Brix de los frutos). A la derecha de cada gráfico se encuentra la referencia de los valores. Los valores absolutos de las medias se encuentran en la tabla 1 del anexo. El análisis estadístico se realizó por ANOVA con el método de comparación de Duncan. Los valores estadísticamente significativos se marcan con un asterisco ($p < 0,05$). Las celdas negras son líneas no medidas en el experimento I.

Tabla 3.3. Comparación de medias multivariadas de los datos fenotípicos de la figura 3.8 (peso total de frutos maduros, número promedio de frutos maduros, peso promedio de frutos maduros y grados Brix) de todas las líneas de tomate transgénicas y el control WT a través de la prueba basada en conglomerados DGC (Di Rienzo, Guzmán y Casanoves) para los experimentos I, II y III. El nivel de significación es de 0,05. Se empleó una matriz de varianza desestructurada y el método promedio. Números distintos indican grupos resultantes distintos.

Experimento I		Experimento II		Experimento III	
Línea	Grupo	Línea	Grupo	Línea	Grupo
35S S12	1	35S S12	1	35S S12	1
35S S16	1	B33 AS17	1	B33 S12	1
35S AS17	1	35S S31	1	35S S16	1
35S AS18	1	B33 S12	2	B33 AS17	1
35S S31	1	35S S16	2	35S AS17	1
35S AS5	1	35S AS17	2	B33 S21	1
WT	1	35S AS18	2	B33 AS27	1
		B33 S21	2	B33 AS28	1
		B33 AS28	2	B33 S3	1
		B33 S3	2	35S AS5	1
		35S AS5	2	WT	1
		WT	2	35S AS18	2
		B33 AS27	3	35S S31	3

3.2.3. Análisis de los niveles de hidratos de carbono solubles en las líneas transgénicas de tomate

Se realizó un análisis de los contenidos de los principales azúcares solubles en hojas y frutos de las líneas S y AS tanto en aquellas transformadas con la construcción 35S::*Asr1* como en las transformadas con B33::*Asr1*. No se encontraron diferencias en los niveles de glucosa, fructosa ni sacarosa en frutos maduros (tabla 3 del anexo) ni en hojas fuentes (tabla 4 del anexo) en los tres experimentos independientes realizados. Asimismo, al analizar el transcriptoma de los frutos de las líneas AS5 y AS17 (análisis de microarreglos: punto 3.2.5 y tablas 15 y 16 del anexo), los niveles del ARNm del transportador de hexosas *Ht1* en frutos maduros no mostraron diferencias significativas en comparación con el control sin transformar. Este resultado fue posteriormente validado por *qPCR* en frutos cosechados de estas mismas líneas durante el experimento III (tabla 18 del anexo).

3.2.4. Análisis de los perfiles metabólicos de frutos y hojas de las líneas transgénicas de tomate

Se evaluaron los perfiles metabólicos de hojas y frutos de las líneas S y AS tanto de aquellas transformadas con las construcciones 35S::*Asr1* (figura 3.2) como de las transformadas con B33::*Asr1* (figura 3.6) en los tres experimentos llevados a cabo. En cada uno de estos experimentos se identificaron y cuantificaron (en términos relativos al control sin transformar) aproximadamente 100 metabolitos en hojas y 80 en frutos.

En las hojas de las líneas AS 35S::*Asr1*, la beta-alanina (metabolismo de nucleótidos), el ácido 2-aminoadípico (aminoácidos) y la noradrenalina (metabolismo secundario) resultaron disminuidos en comparación con los controles sin transformar en el experimento I (figura 3.9 y tabla 5 del anexo). Sin embargo, no presentaron cambios en el experimento II (figura 3.9 y tabla 6 del anexo). Durante el experimento III un metabolito similar a la hexapiranososa (vía desconocida) se encontró disminuido (figura 3.9 y tabla 8 del anexo). En las hojas S 35S::*Asr1* la fenilalanina (aminoácido) y la noradrenalina (metabolismo secundario) resultaron disminuidos durante el experimento I (figura 3.9 y tabla 5 del anexo). Durante el experimento II, la prolina (aminoácido) y el ácido 2-oxoglutarico (ciclo de Krebs) también mostraron disminuciones significativas y la 5-hidroxitriptamina mostró aumentos (metabolismo secundario) (figura 3.9 y tabla 6 del anexo). Durante el experimento III, un metabolito similar a la hexapiranososa (vía desconocida) y el gliceraldehído (metabolismo de azúcares) estuvieron disminuidos (figura 3.9 y tabla 8 del anexo). En las hojas de las líneas AS B33::*Asr1* durante el experimento II, la 5-hidroxitriptamina (metabolismo secundario) resultó aumentada y durante el experimento III la tiramina (metabolismo secundario) mostró disminuciones (figura 3.10, tablas 7 y 9 del anexo). En las hojas de las plantas S B33::*Asr1* la 5-hidroxitriptamina aumentó y el ácido 2-oxoglutarico (ciclo de Krebs) disminuyó en las muestras del experimento II (figura 3.10, tabla 7 del anexo). Durante el experimento III, el gliceraldehído está disminuido (hidratos de carbono) (figura 3.10 y tabla 9 del anexo).

En los frutos de las líneas AS 35S::*Asr1*, durante el experimento I se observaron aumentos en los niveles de los aminoácidos leucina, isoleucina, valina, metionina, 4-hidroxi prolina y beta-alanina (figura 3.11 y tabla 10 del anexo). En el experimento II, esas líneas mostraron aumentos en el aminoácidos lisina (figura 3.11 y tabla 11 del anexo). En el experimento III no se encontraron cambios significativos (figura 3.11 y tabla 13 del anexo). Las líneas S 35S::*Asr1* mostraron aumentos en la isoleucina, leucina, valina y metionina durante el experimento I, mientras que no tuvieron diferencias en los otros experimentos (figura 3.11 y tabla 10 del anexo). Las líneas AS B33::*Asr1* durante el experimento II mostraron disminuciones en el ácido 3-hidroxipirúvico (fotosíntesis), alanina, isoleucina, prolina, serina (todos estos 4 del metabolismo de aminoácidos) y etanolamina (metabolismo de lípidos) (figura 3.12 y tabla 12 del anexo). Las mismas líneas durante el experimento III mostraron disminuciones en el contenido de los aminoácidos leucina, isoleucina y lisina y en los metabolitos involucrados en el metabolismo de nucleótidos alantoína y uridina (figura 3.12 y tabla 14 del anexo). Las líneas S B33::*Asr1* mostraron disminuciones en el contenido del gliceraldehído (metabolismo de lípidos) durante el experimento II y no tuvieron cambios durante el experimento III (figura 3.12 y tablas 12 y 14 del anexo). Una observación consistente entre líneas son los cambios en el metabolismo de los

aminoácidos de la vía de la prolina, del aspartato, de la lisina y de los de cadena ramificada. La figura 3.13 muestra un resumen de los cambios en los aminoácidos relacionados con esas vías en los frutos de todas las líneas y en todos los experimentos.

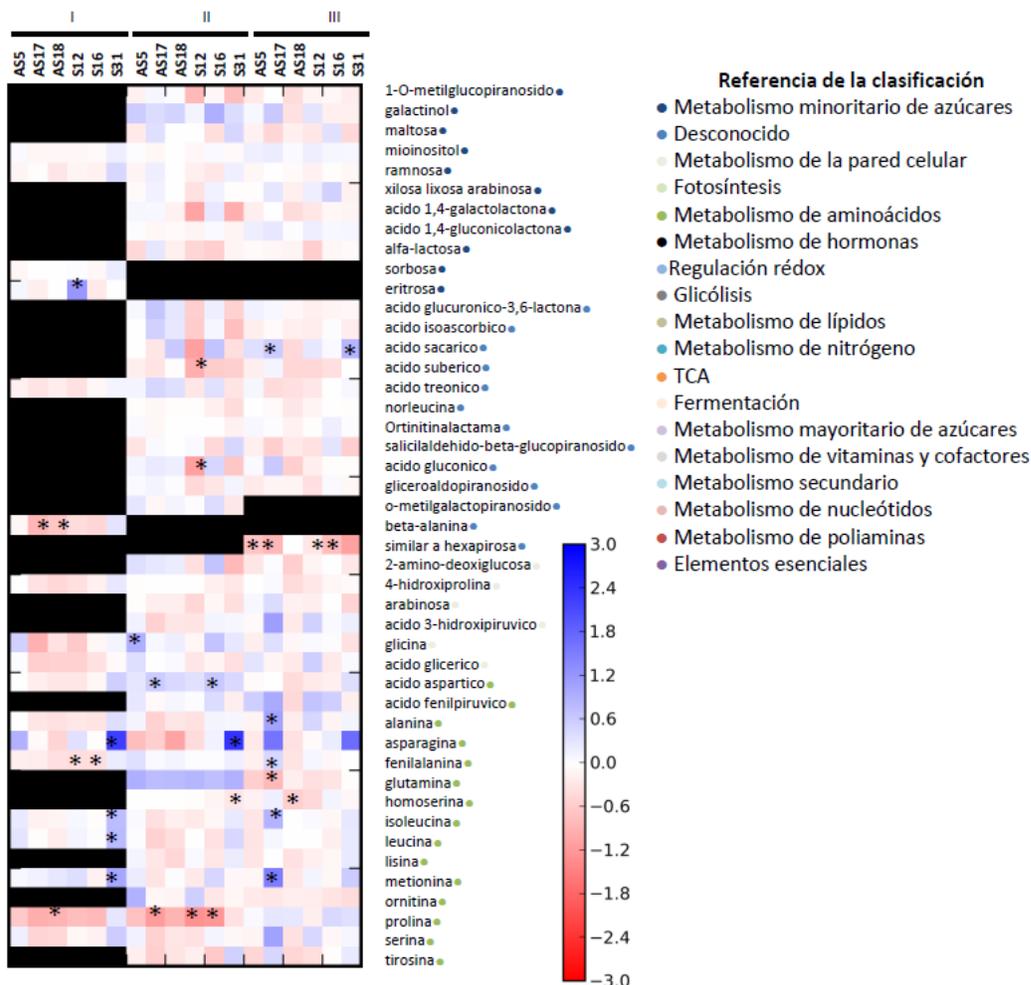


Figura 3.9. Contenido relativo de metabolitos en las hojas fuentes de las plantas 35S::*Asr1-sense* y 35S::*Asr1-antisense* en los experimentos I, II y III. Mapa de calor que representa los niveles de cambio de los metabolitos en escala logarítmica de hojas fuentes de las plantas *antisense* (AS5, AS17, AS18) o *sense* (S12, S16, S31) en relación a las plantas controles. Los puntos de colores indican la clasificación de los metabolitos por Mapman y/o de la base de datos Kegg. Los metabolitos se midieron por GC-MS. Los asteriscos representan diferencias significativas en comparación con el control por la prueba de ANOVA y el método de comparación empleado fue la prueba de Duncan ($p < 0,05$). Las celdas en negro indican metabolitos no identificados. Los valores se encuentran en las tablas 5, 6 y 8 del anexo. Continúa en el gráfico siguiente.

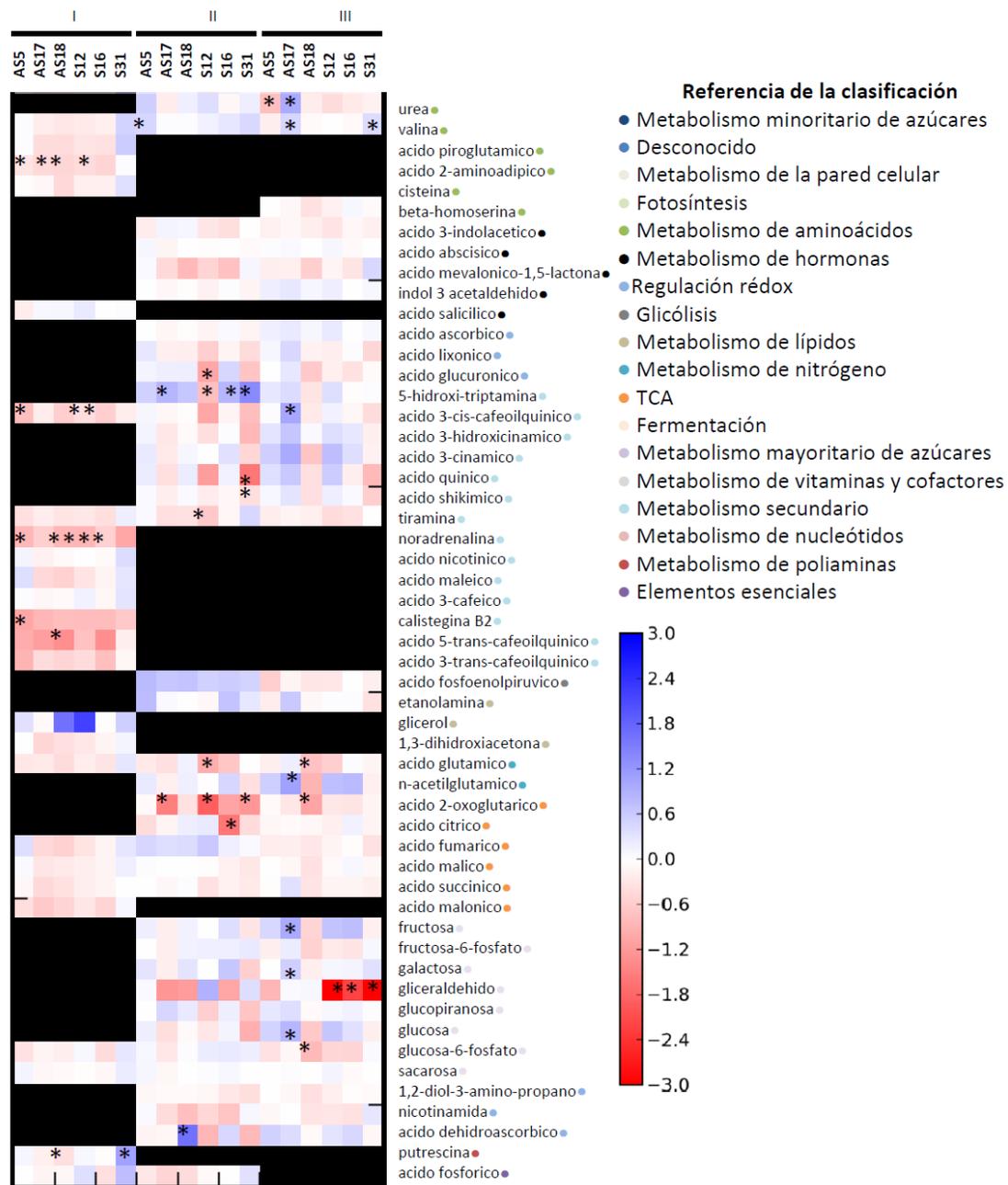


Figura 3.9. Continuación. Contenido relativo de metabolitos en las hojas fuentes de las plantas 35S::*Asr1-sense* y 35S::*Asr1-antisense* en los experimentos I, II y III.

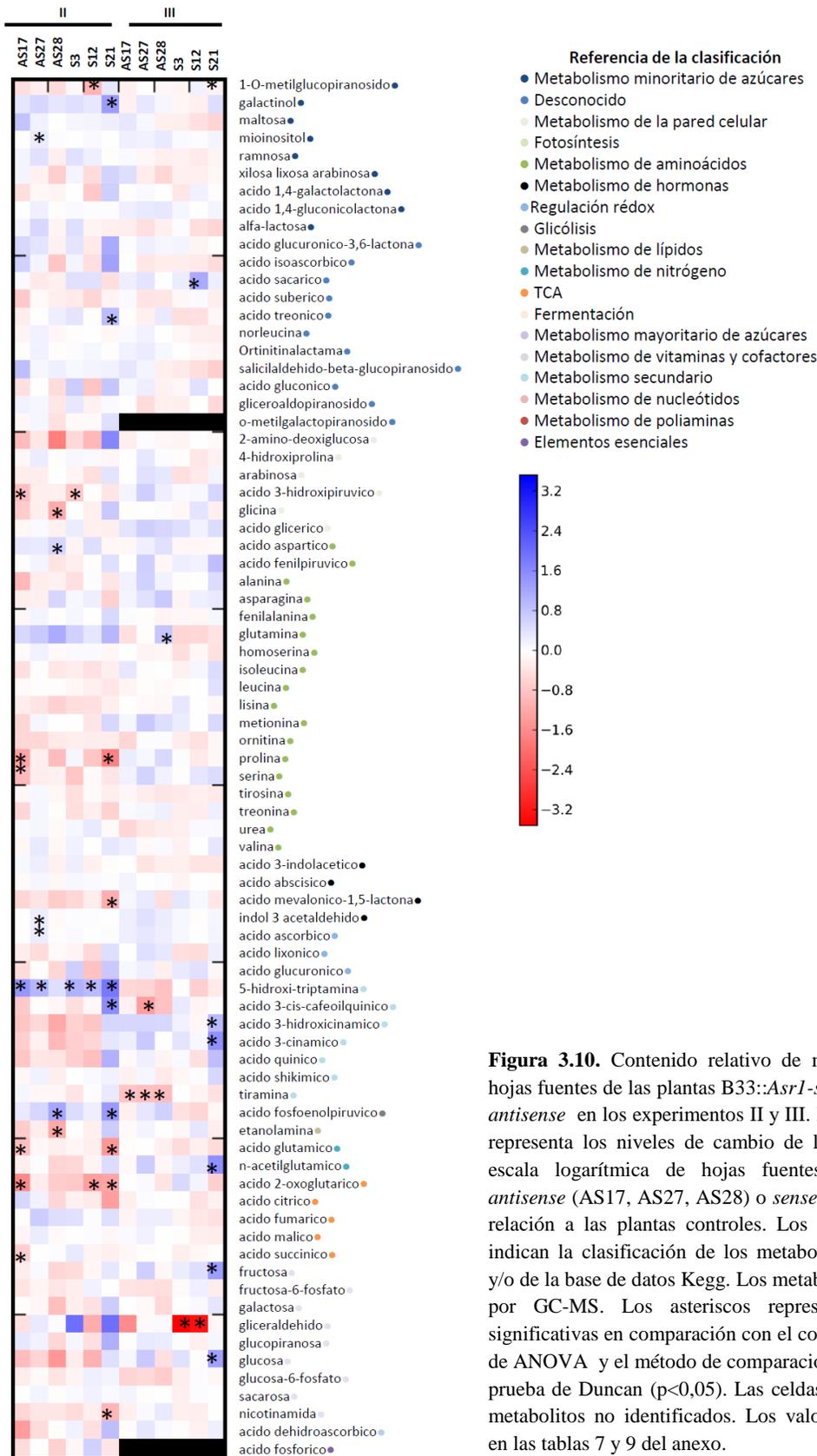


Figura 3.10. Contenido relativo de metabolitos en las hojas fuentes de las plantas B33::*AsrI-sense* y B33::*AsrI-antisense* en los experimentos II y III. Mapa de calor que representa los niveles de cambio de los metabolitos en escala logarítmica de hojas fuentes de las plantas *antisense* (AS17, AS27, AS28) o *sense* (S3, S12, S21) en relación a las plantas controles. Los puntos de colores indican la clasificación de los metabolitos por Mapman y/o de la base de datos Kegg. Los metabolitos se midieron por GC-MS. Los asteriscos representan diferencias significativas en comparación con el control por la prueba de ANOVA y el método de comparación empleado fue la prueba de Duncan ($p < 0,05$). Las celdas en negro indican metabolitos no identificados. Los valores se encuentran en las tablas 7 y 9 del anexo.

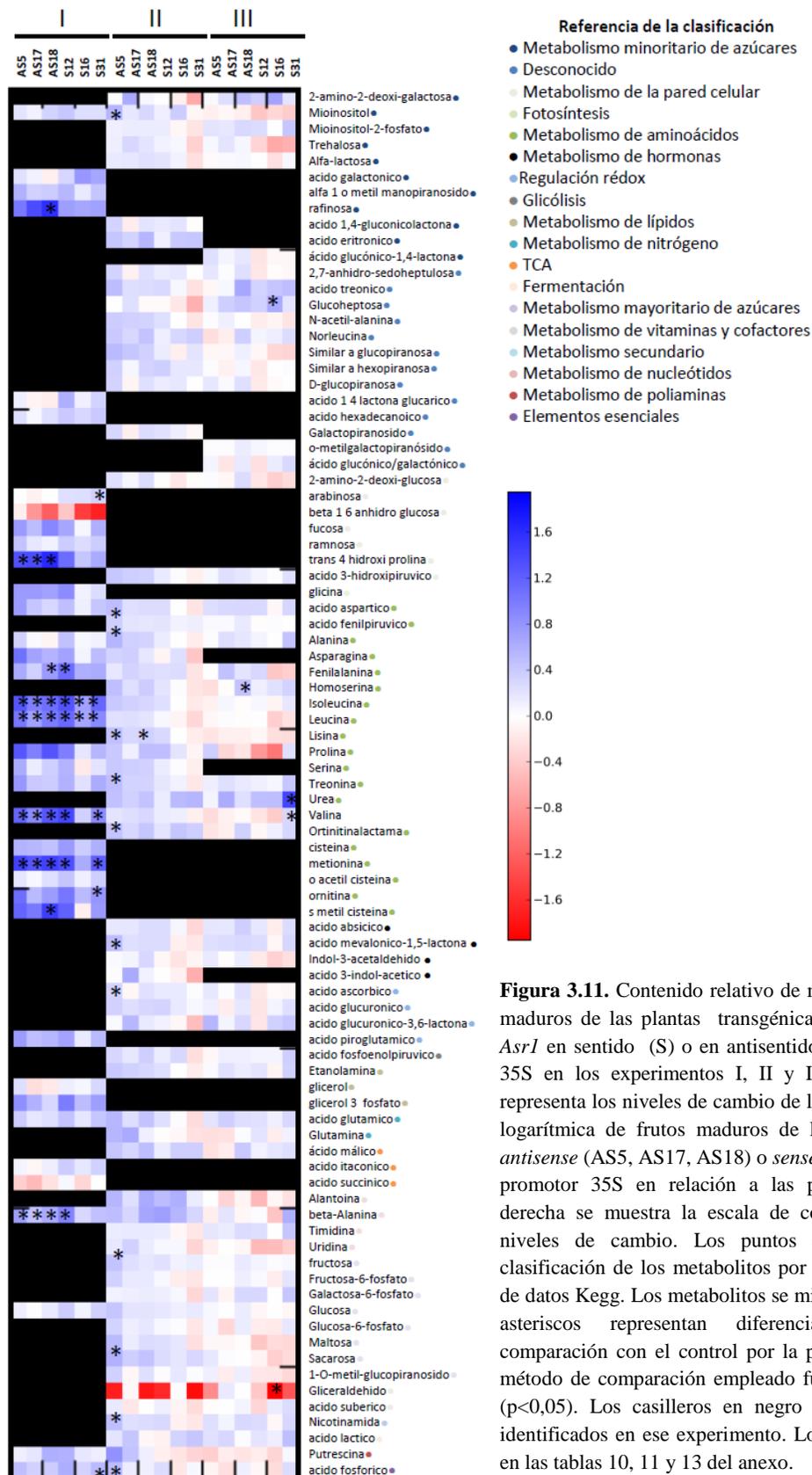


Figura 3.11. Contenido relativo de metabolitos en los frutos maduros de las plantas transgénicas de tomate con el gen *Asr1* en sentido (S) o en antisentido (AS) bajo el promotor 35S en los experimentos I, II y III. Mapa de calor que representa los niveles de cambio de los metabolitos en escala logarítmica de frutos maduros de las plantas transgénicas *antisense* (AS5, AS17, AS18) o *sense* (S12, S16, S31) bajo el promotor 35S en relación a las plantas controles. A la derecha se muestra la escala de color que representa los niveles de cambio. Los puntos de colores indican la clasificación de los metabolitos por Mapman y/o de la base de datos Kegg. Los metabolitos se midieron por GC-MS. Los asteriscos representan diferencias significativas en comparación con el control por la prueba de ANOVA y el método de comparación empleado fue la prueba de Duncan ($p < 0,05$). Los casilleros en negro indican metabolitos no identificados en ese experimento. Los valores se encuentran en las tablas 10, 11 y 13 del anexo.

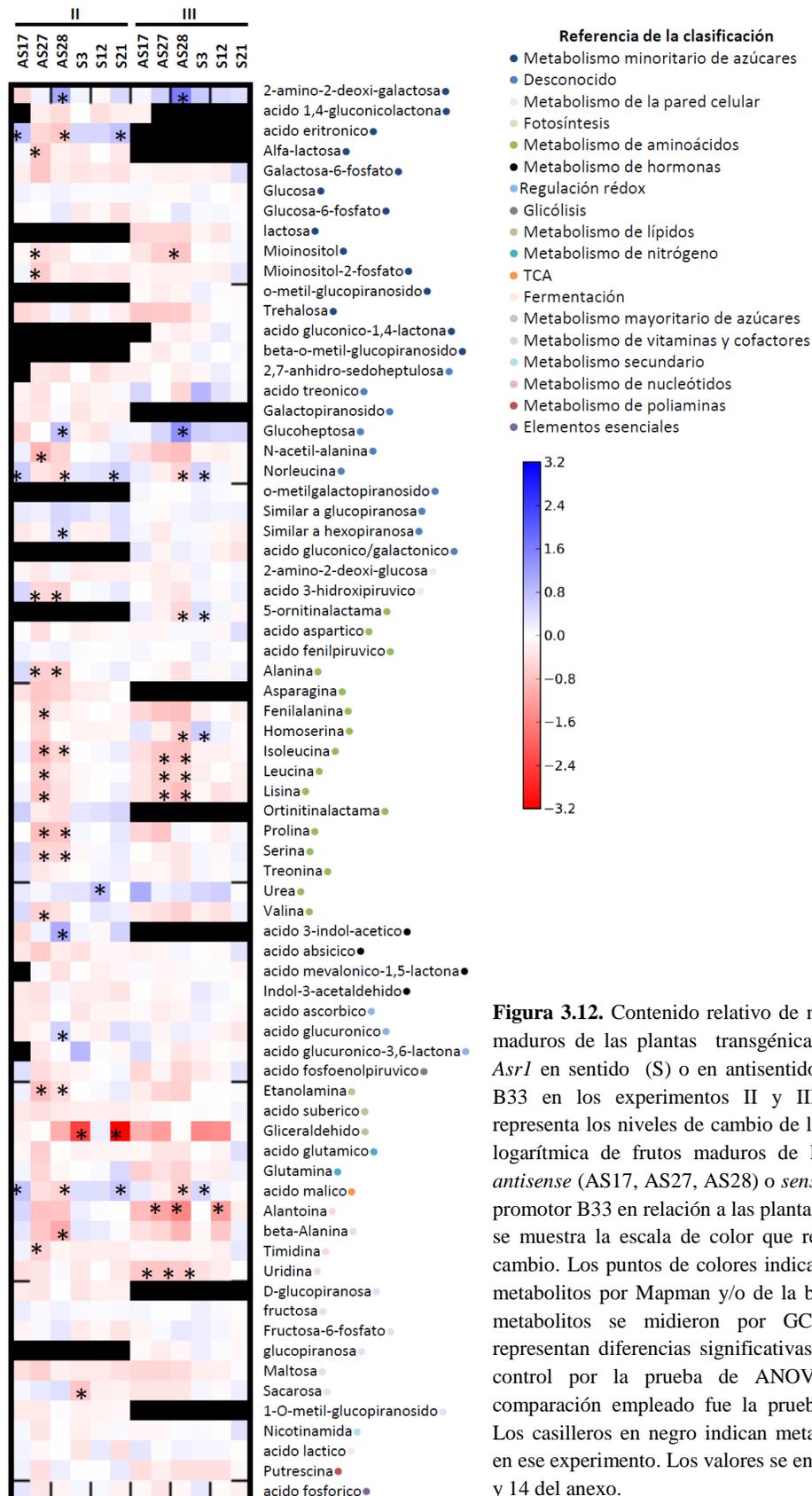


Figura 3.12. Contenido relativo de metabolitos en los frutos maduros de las plantas transgénicas de tomate con el gen *Asr1* en sentido (S) o en antisense (AS) bajo el promotor B33 en los experimentos II y III. Mapa de calor que representa los niveles de cambio de los metabolitos en escala logarítmica de frutos maduros de las plantas transgénicas *antisense* (AS17, AS27, AS28) o *sense* (S3, S12, S21) bajo el promotor B33 en relación a las plantas controles. A la derecha se muestra la escala de color que representa los niveles de cambio. Los puntos de colores indican la clasificación de los metabolitos por Mapman y/o de la base de datos Kegg. Los metabolitos se midieron por GC-MS. Los asteriscos representan diferencias significativas en comparación con el control por la prueba de ANOVA y el método de comparación empleado fue la prueba de Duncan ($p < 0,05$). Los casilleros en negro indican metabolitos no identificados en ese experimento. Los valores se encuentran en las tablas 12 y 14 del anexo.

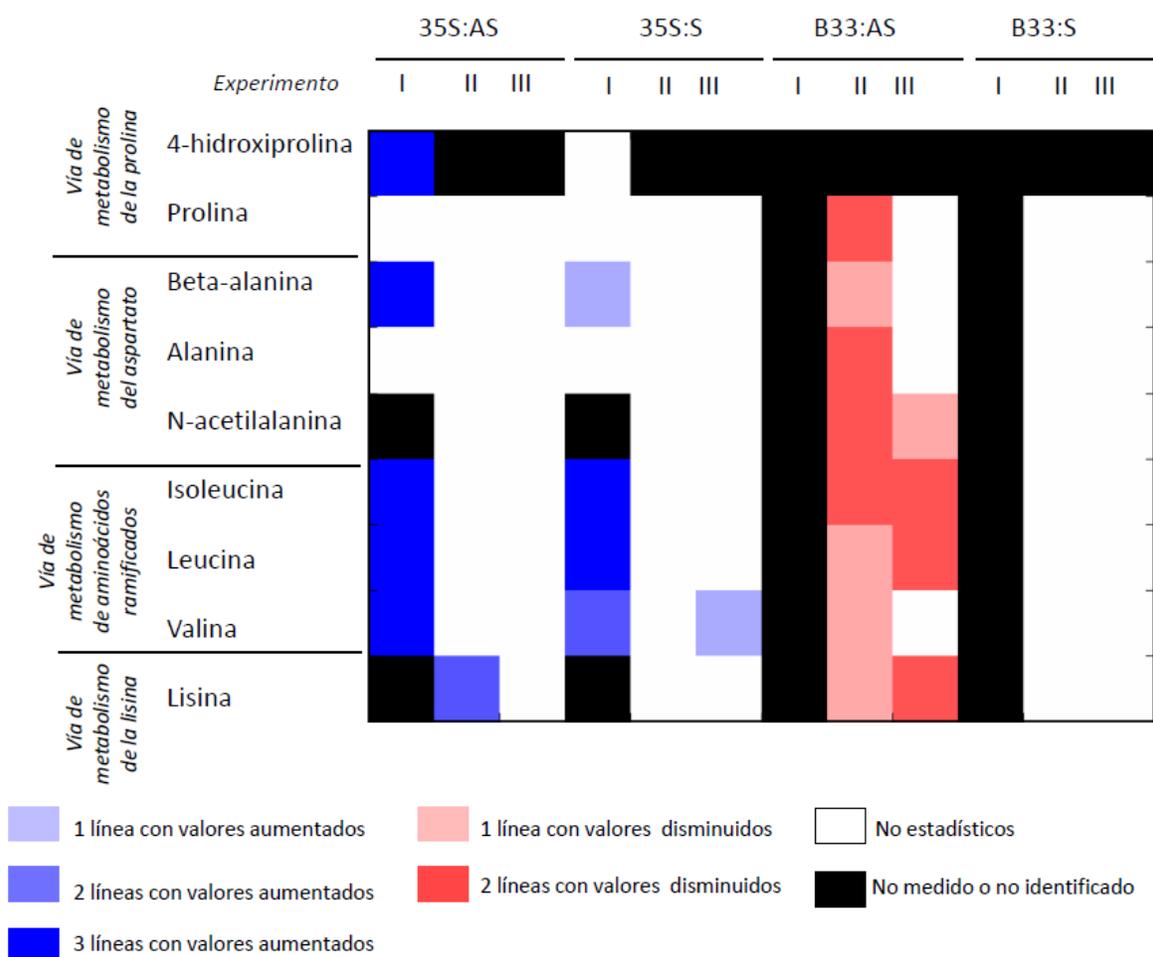


Figura 3.13. Comparación de las vías metabólicas alteradas en frutos maduros de las líneas transgénicas. *Heatmap* que muestra el número de líneas que presentaron metabolitos alterados estadísticamente en frutos maduros (figuras 3.11 y 3.12) y que pertenecen a las mismas vías en los tres experimentos independientes llevados a cabo (I, II y III) con las líneas transgénicas 35S::*Asr1-antisense* (35S:AS), 35S::*Asr1-sense* (35S:S), B33::*Asr1-antisense* (B33:AS) y B33::*Asr1-sense* (B33:S) en comparación con las plantas controles.

3.2.5. Análisis de los perfiles transcriptómicos de los frutos de las líneas transgénicas AS 35S::*Asr1*

Se realizó un análisis del transcriptoma de los frutos maduros de las líneas 35S::*Asr1* AS5 y AS17 en comparación con las plantas sin transformar empleando los microarreglos GeneChip® Tomato Genome Arrays de Affymetrix durante el experimento I. Los resultados de la normalización de los datos de los microarreglos se presentan en la sección de Materiales y Métodos. Se observó que ambas líneas tienen aumentados y disminuidos los ARNm de 53 y 29 genes en común, respectivamente, en comparación con las plantas controles (figura 3.14A y tablas del anexo 15 y 16). Si bien la mayor parte de los genes con

ARNm aumentados son de función desconocida (14 en total), también se encontraron genes con niveles aumentados de sus transcritos que codifican enzimas (7 genes), asociados a la fotosíntesis (5 genes), a estrés (4 genes), a la pared celular (4 genes) y asociados a la regulación de la transcripción (4 genes), entre otras funciones (figura 3.14B). La mayor parte de los genes que presentaron disminuciones en sus niveles de ARNm en las líneas transgénicas son enzimas (7 genes), aunque también se hallaron genes de función desconocida (6 genes), genes asociados al metabolismo de los isoprenoides (4 genes) y al ADN/cromatina (4 genes), entre otras funciones (figura 3.14B). Para validar técnicamente los resultados de los microarreglos se midió por *qPCR* la expresión de algunos genes con ARNm disminuidos: *Cbf4* (*c-repeat-binding factor 4*), *Eix1* (*Elicitor Ethylene-Inducing Xylanase1*), *Histone 3*, *Hta6* (*Histone H2A.1*), *Nadp or* (*NADP-dependent oxidoreductase*) y *Prl* (*prolifera*) (tabla 17 del anexo). En todos los casos, los niveles del ARNm de estos genes resultaron disminuidos en frutos de las líneas AS5 y AS17, aunque sólo fueron estadísticamente significativos *Histone 3* e *Hta6* para ambas líneas y *Prl* para la línea AS17. Además, la línea AS18 mostró el mismo comportamiento que la línea AS17.

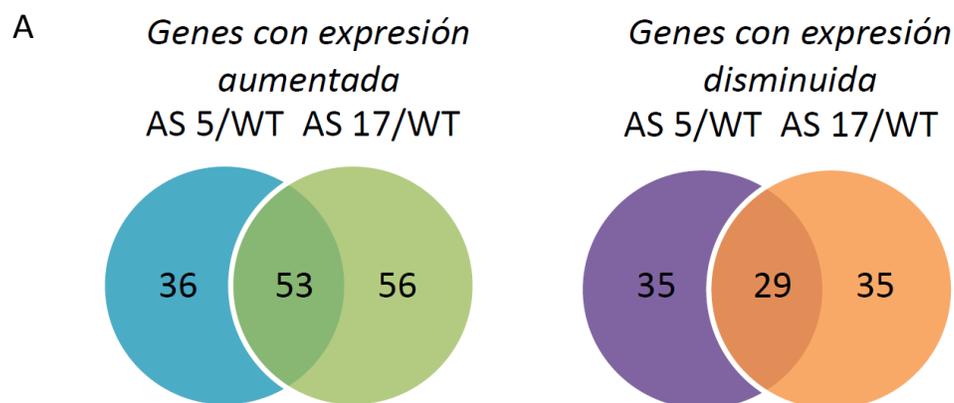


Figura 3.14. Análisis de microarreglos de las líneas silenciadas para *Asr1*. Se evaluaron los niveles de expresión de genes en frutos maduros de las líneas silenciadas AS5 y AS17 para *Asr1* bajo el promotor 35S en comparación con sus niveles en las plantas controles mediante el uso de microarreglos *GeneChip Tomato Genome Array* (Affymetrix) durante el experimento I. **A.** Diagrama de Venn mostrando el número de genes diferencialmente expresados en las líneas silenciadas. La identidad y niveles de expresión de todos los genes se presentan en las tablas 15 y 16 del anexo. Continúa en el gráfico siguiente.

B

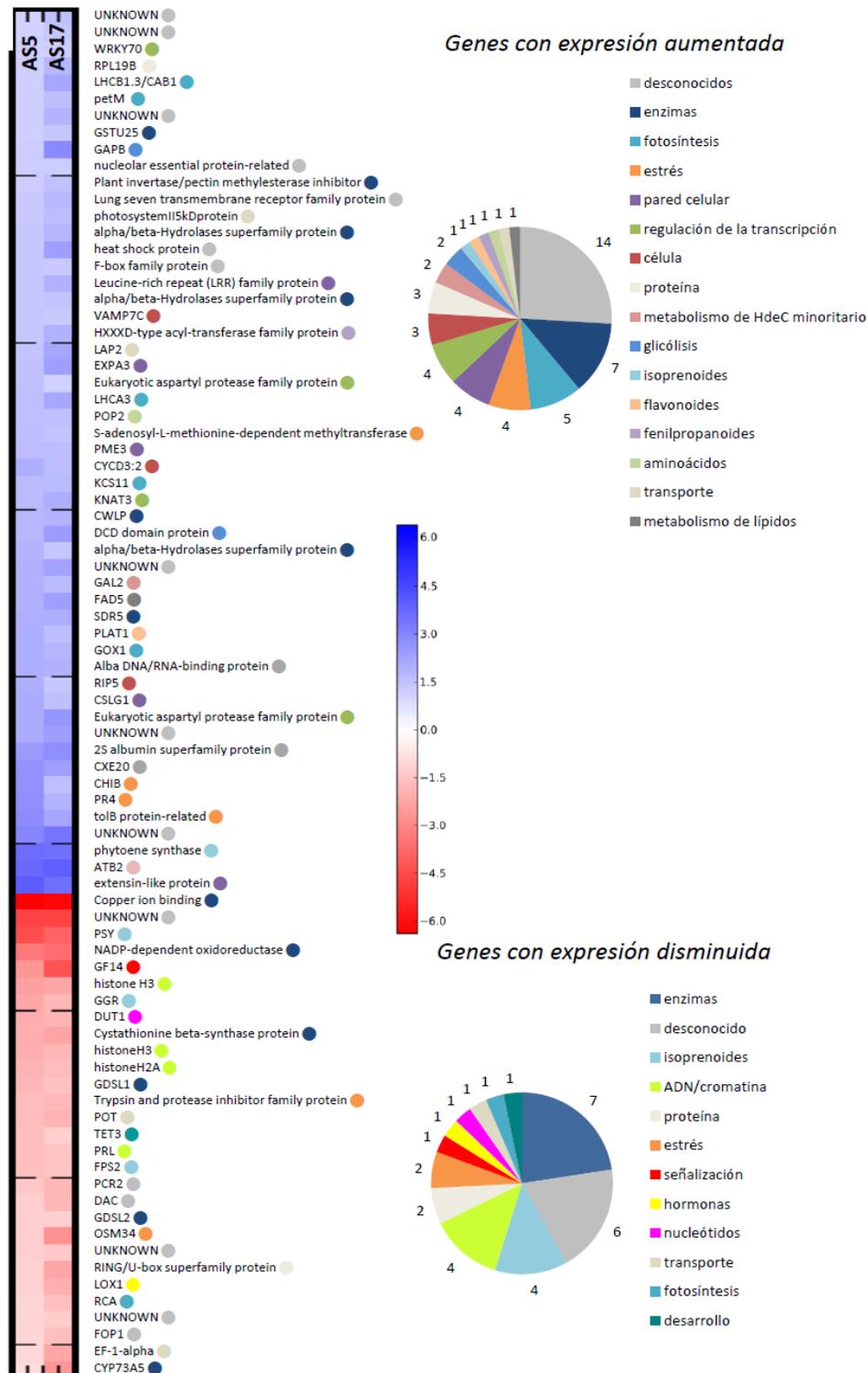


Figura 3.14. (continuación) Análisis de microarreglos de las líneas silenciadas para *Asr1*. **B.** Heat map representando los niveles de expresión diferenciales de genes en ambas líneas silenciadas. Los círculos de colores al lado de los genes indican la categoría Mapman (Thimm *et al.*, 2004) correspondiente. La clasificación está resumida en gráficos de tortas a la derecha. Los números en la parte exterior de los gráficos

de torta representan el número de transcritos que pertenecen a cada categoría. En las tablas 15 y 16 del anexo se encuentran detallados los datos de los genes. *Prueba estadística: Rank Product. Normalización: Rma. N=3. $p < 0,05$ para todos los genes mostrados en esta figura.*

A su vez, se validaron estas alteraciones en los frutos en un experimento independiente (el III) (tabla 18 del anexo). De esta manera se validaron los resultados en al menos una línea silenciada para 26 genes asociados mayoritariamente a estrés tales como *Knat3* (*Knotted1-like homeobox gene 3*) y *PR3* (*pathogenesis related 3*), pero también al ciclo celular (*Prl, Prolifera*) y a la pared celular (*Expansina A3*). Dentro de los factores de transcripción asociados a estrés se encontró un aumento de los niveles del ARNm de *Knat3* en las tres líneas silenciadas mientras que los niveles del ARNm de *Cbf4* aumentaron sólo en la línea AS5 de manera significativa y *Cbf3* (*c-repeat-binding factor 3*) mostró niveles disminuidos en la línea AS18 de manera significativa (figura 3.15).

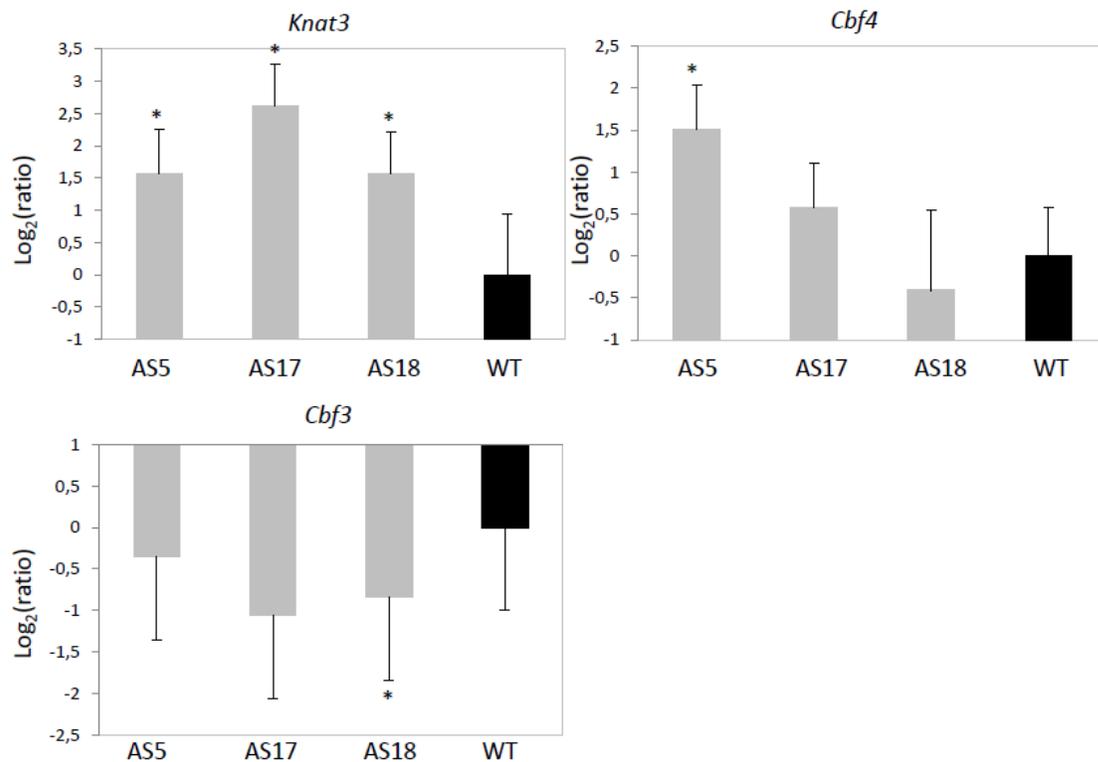


Figura 3.15. Niveles del ARNm de genes relacionados con estrés: factores de transcripción asociados a estrés. Las mediciones fueron realizadas por *qPCR* en un experimento independiente al de los microarreglos. Las barras representan los niveles del ARNm del gen de interés en frutos de las líneas relativos a los niveles del ARNm en las plantas WT, ambos normalizados por los niveles del ARNm del gen de referencia (*18S rRNA*) (*ratio*). Las barras de error representan el error estándar. El asterisco representa resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$) por la prueba de permutación. $N=3-5$.

Con respecto a los genes involucrados en las vías de transducción de señales de estrés, *Lrr* (*Leucine-rich repeat/extensin*) mostró incrementos en los niveles del ARNm en las líneas AS5 y AS17 y *Eix1* (*ethylene-inducing xylanase1*) en la línea AS5 de manera significativa (figura 3.16). *Eds1* (*enhanced disease susceptibility 1*), por otro lado, mostró niveles estadísticamente menores en la línea AS18.

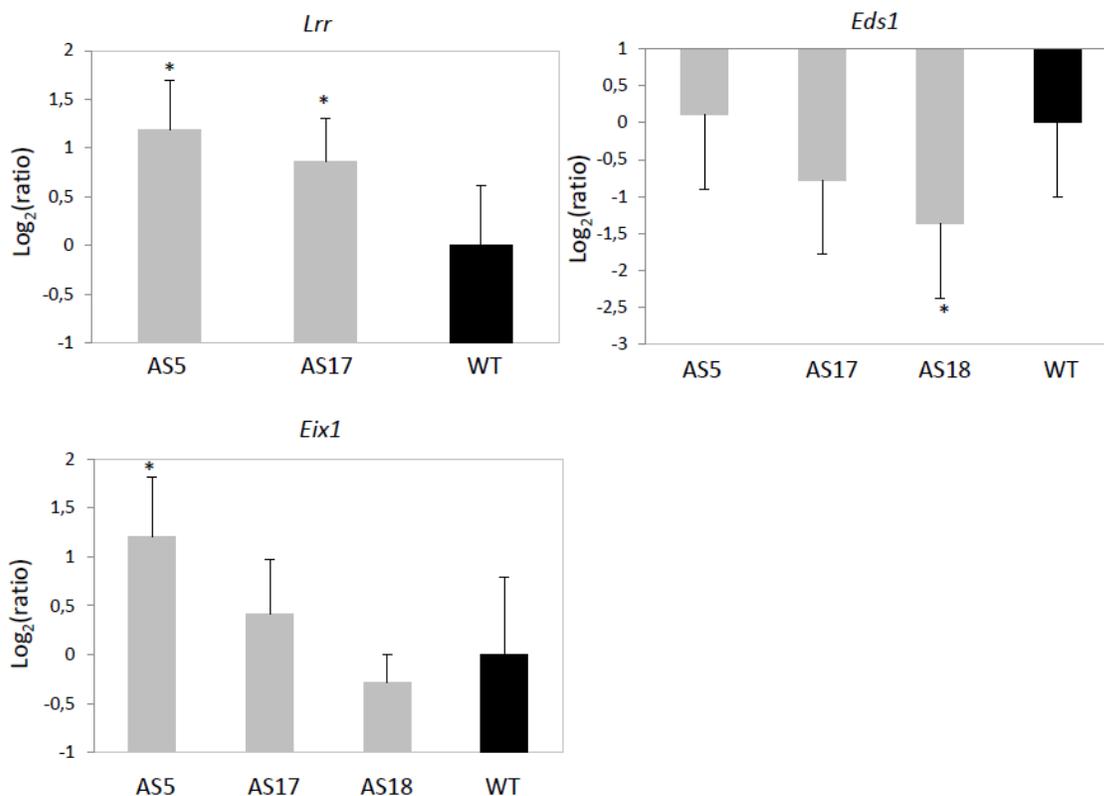


Figura 3.16. Niveles de ARNm de genes relacionados con estrés: genes que codifican para proteínas involucradas en la transducción de señales de estrés. Las mediciones fueron realizadas por *qPCR* en un experimento independiente al de los microarreglos. El análisis estadístico empleado fue la prueba de permutación. Las barras representan los niveles del ARNm del gen de interés en frutos de las líneas relativos a los niveles del ARNm en las plantas WT, ambos normalizados por los niveles del ARNm del gen de referencia (*18S rRNA*) (*ratio*). Las barras de error representan el error estándar. El asterisco representa resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$). N=3-5.

Los niveles de expresión de los genes codificantes para enzimas asociadas a estrés aparecen en general aumentados en las plantas AS. *Atb2* (*oxidoreductase*), *Nadp or* (*Nadp oxidoreductase*) y *Pr3* (*Pathogenesis related 3*) tuvieron niveles aumentados del ARNm en las líneas AS2 y AS17, mientras que *Pr4* (*Pathogenesis related 4*) tuvo niveles del ARNm aumentados de manera significativa en la línea AS17 (figura 3.17). En cambio, *Gstu8* (*Glutathione-S-transferase 8*) tuvo los niveles del ARNm disminuidos en la línea AS18.

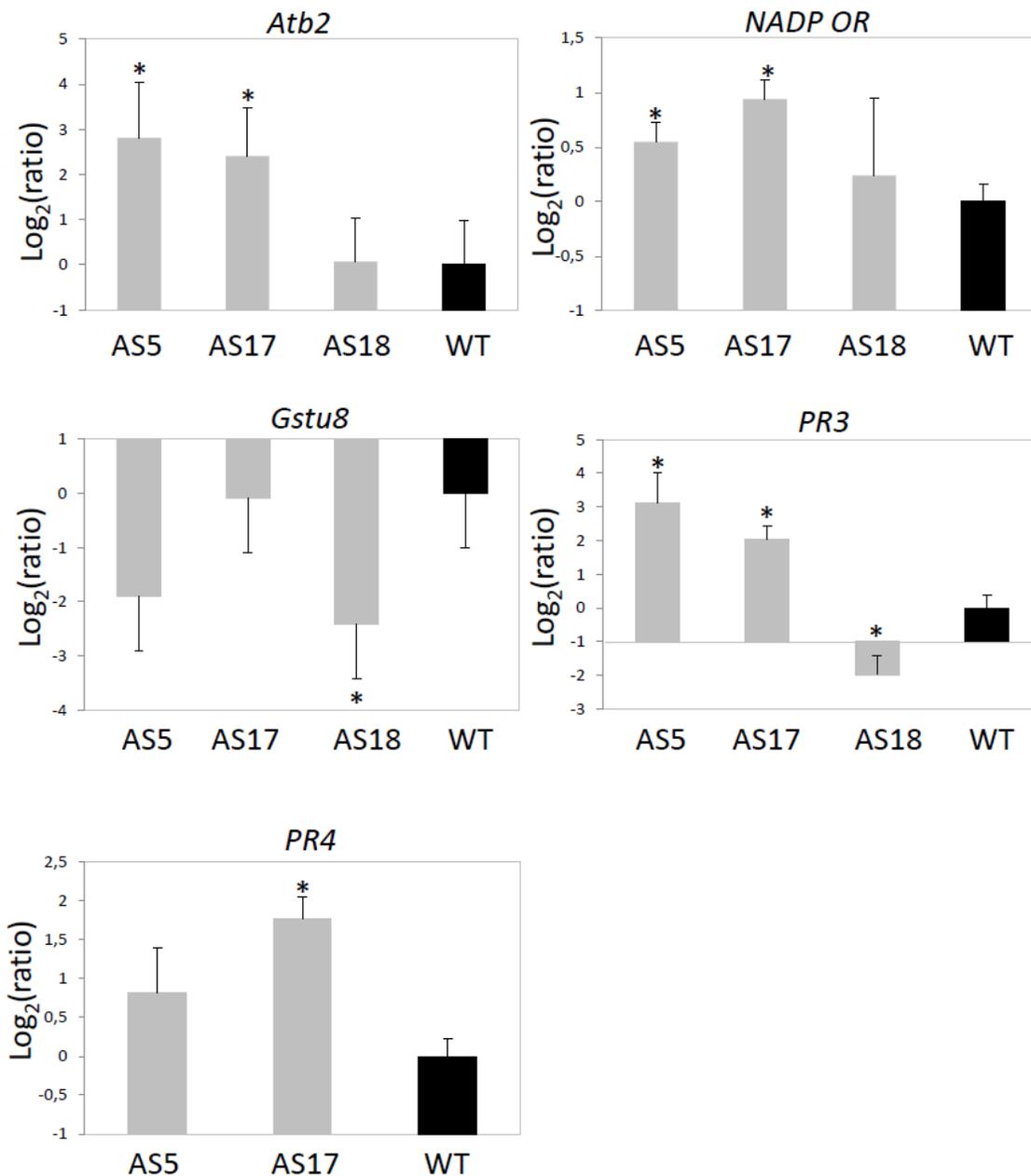


Figura 3.17. Niveles de ARNm de genes relacionados con estrés: enzimas asociadas a estrés. Las mediciones fueron realizadas por *qPCR* en un experimento independiente al de los microarreglos. El análisis estadístico empleado fue la prueba de permutación. Las barras representan los niveles del ARNm del gen de interés en frutos de las líneas relativos a los niveles del ARNm en las plantas WT, ambos normalizados por los niveles del ARNm del gen de referencia (*18S rRNA*) (el *ratio*). Las barras de error representan el error estándar. El asterisco representa resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$). N=3-5.

Al mismo tiempo, *Prl* (*Prolifera*) y *tubulina 8*, asociados al ciclo celular y la replicación del ADN, mostraron niveles significativamente aumentados en la línea AS5 y AS17, respectivamente (figura 3.18).

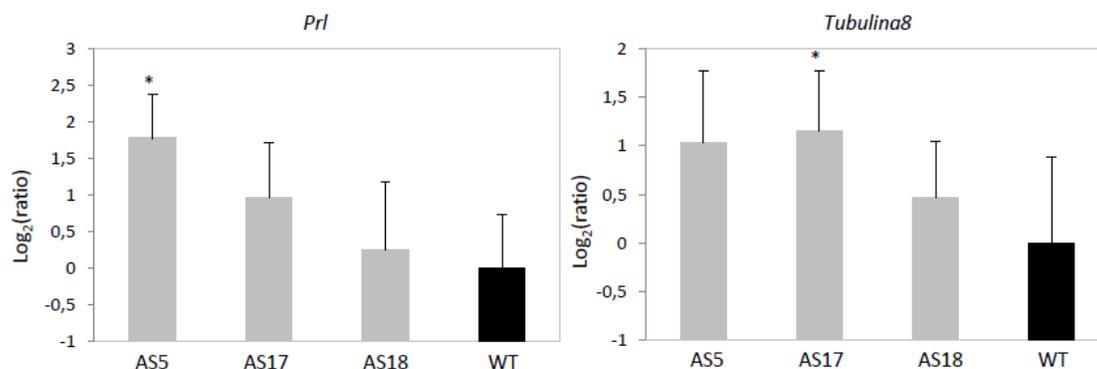


Figura 3.18. Niveles de ARNm de genes del análisis de los microarreglos relacionados con el ciclo celular y la replicación del ADN medidos por *qPCR* en un experimento independiente. El análisis estadístico empleado fue la prueba de permutación. Las barras representan los niveles del ARNm del gen de interés en frutos de las líneas relativos a los niveles del ARNm en las plantas WT, ambos normalizados por los niveles del ARNm del gen de referencia (*18S rRNA*) (*ratio*). Las barras de error representan el error estándar. El asterisco representa resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$). N=3-5

Finalmente, *Bgal1* (*beta-galactosidase*) estuvo disminuido en la línea AS17, mientras que *Cab* (*chlorophyll a/b binding protein*, asociado a la fotosíntesis), *Aco1* (*aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase*, enzima involucrada en el metabolismo del etileno) y *Fadb* (*fatty acid desaturase*, metabolismo de lípidos) estuvieron aumentados en la línea AS5 (figura 3.19).

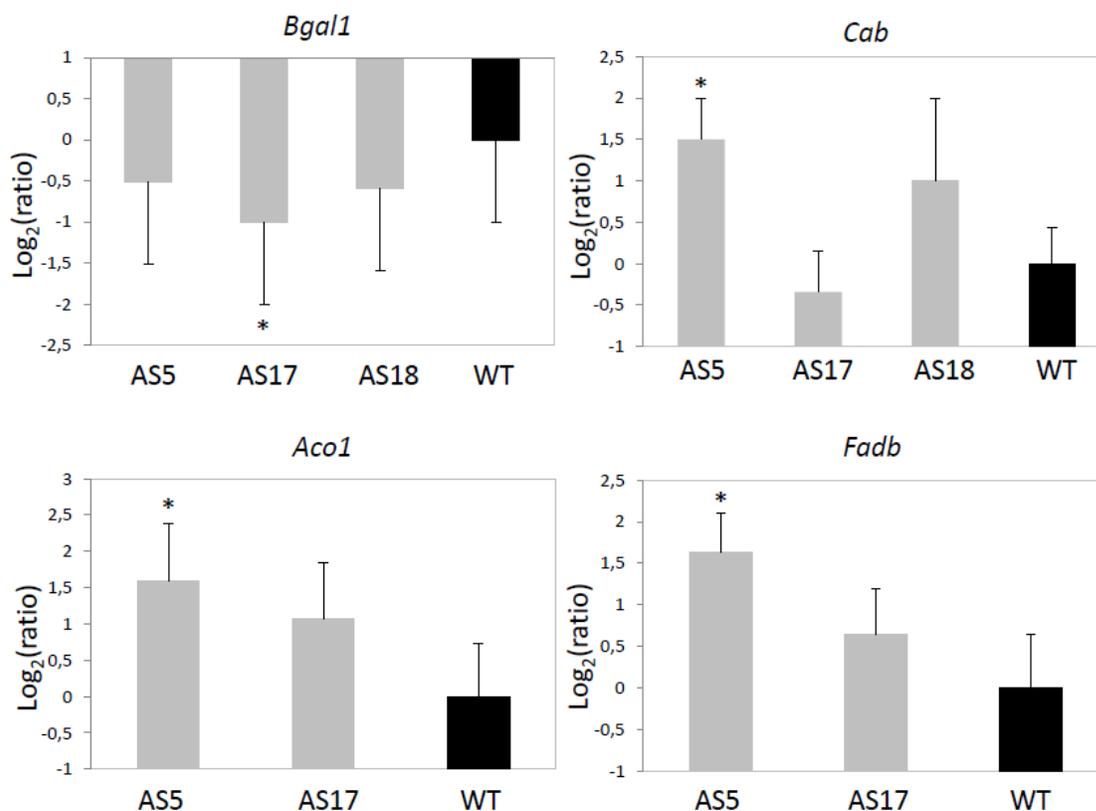


Figura 3.19. Niveles de ARNm de genes relacionados con otras funciones. Las mediciones fueron realizadas en un experimento independiente al de los microarreglos medidos por *qPCR*. El análisis estadístico empleado fue la prueba de permutación. Las barras representan los niveles del ARNm del gen de interés en frutos de las líneas relativos a los niveles del ARNm en las plantas WT, ambos normalizados por los niveles del ARNm del gen de referencia (*18S rRNA*) (*ratio*). Las barras de error representan el error estándar. El asterisco representa resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$). N=3-5.

3.2.6. Identificación de motivos sobrerrepresentados en las secuencias regulatorias de los genes analizados en los microarreglos

Para profundizar en el análisis de las vías en las que ASR1 actuaría, se realizó una búsqueda *de novo* de motivos conservados que podrían estar actuando como elementos regulatorios en *cis* (*CREs*, de sus siglas en inglés) en las regiones regulatorias (750 pb antes del inicio del codón ATG) de los genes que mostraron niveles significativamente alterados de su ARNm en el análisis de los microarreglos. Se hallaron cinco *CREs* sobrerrepresentados (p -valor $< 0,001$) en las regiones regulatorias de los genes con niveles disminuidos de su ARNm (tabla 3.4A). El único *CRE* encontrado con función descrita es el motivo de unión del factor de transcripción ARR1, que promueve la transcripción de genes de respuesta a las citoquininas (Taniguchi *et al.*, 2007; Ross *et al.*, 2004; Sakai *et al.*, 2000) (motivo 1; tabla 3.4A). Los demás no tienen una función descrita en las bases de datos

empleadas (motivos 2 a 5; tabla 3.4A). En las regiones regulatorias de los genes que mostraron niveles aumentados de su ARNm se encontraron 5 CREs sobrerrepresentados (tabla 3.4B), que se nombrarán motivos 6 a 10 para facilitar su identificación. El CRE 6 muestra homología con los sitios de unión descritos para las proteínas regulatorias ASF-2 [motivo conservado en todos los genes *Cab* (*light-harvesting Chlorophyll-a/b*) asociados a la fotosíntesis; Rubio-Somoza *et al.*, 2006; Reyes *et al.*, 2004; Lam y Chua, 1989], MYB1 (Yu *et al.*, 2000; Baranowskij *et al.*, 1994) y PHR1 (*phosphate starvation response 1*) (presente en genes de respuesta al déficit de fosfatos; Rubio *et al.*, 2001; Schunmann *et al.*, 2004 a y b). El motivo 7 muestra homología con los sitios de unión descritos para las proteínas regulatorias *Dof* (asociadas a la expresión de múltiples genes involucrados en el metabolismo del carbono en maíz; Yanagisawa y Schmidt, 1999; Yanagisawa, 2000), para la nodulina (asociado a genes de la nodulación en leguminosas; Sandal *et al.*, 1987; Stougaard *et al.*, 1990) y con una secuencia consenso característica de promotores activados en células infectadas con *Rhizobium* de nódulos de maíz (Vieweg *et al.*, 2004; Fehlberg *et al.*, 2005). El motivo 8 fue encontrado en la región regulatoria de la fosfoenolpiruvato carboxilasa de *Flaveria trinervia* (Gowik *et al.*, 2004). El motivo 9 tiene homología con un motivo hallado en la región regulatoria del gen *Napin* de *Brassica napus* (Ellerstrom *et al.*, 1996), con el motivo *H-box*, que es el sitio de unión del complejo KAP-2 (originalmente encontrado en la secuencia regulatoria de la *chalcona sintasa*; Lindsay *et al.*, 2002; Terzaghi y Cashmore, 1995; Yu *et al.*, 1993; Loake *et al.*, 1992) y con el motivo de unión de una proteína *homeodomain* (HD) en la región regulatoria de PR2 (Korfhage *et al.*, 1994). El último motivo encontrado (10) no tiene función descripta aún (tabla 3.4B).

Tabla 3.4. Motivos sobrerrepresentados en las regiones regulatorias de los genes con expresión estadísticamente disminuida (**A**) o aumentada (**B**) en las líneas transgénicas silenciadas AS5 y AS17 para *Asr1* bajo el promotor 35S. Se buscaron los motivos sobrerrepresentados con el programa DRIM (Eden *et al.*, 2007). Luego se empleó la base de datos PLACE (Higo *et al.*, 1998) para encontrar similitud con motivos ya descritos. Condiciones del análisis en DRIM: secuencias analizadas: 750 pb precedentes al codón de inicio ATG; p-valor significativo: <0,001; longitud del motivo: 7 pb. N=A, T, C o G. Y=C o T. R=A o G.

A

Identificación del motivo en genes con expresión disminuida	Secuencia del motivo semilla	p-valor	Resultado de la búsqueda de los motivos sobrerrepresentados en base de datos (PLACE)
1	GAAATCA	3,1e-005	NGATT (reversa complementaria de AATCN): elemento de unión de ARR1 en arabidopsis (Sakai <i>et al.</i> , 2000; Ross <i>et al.</i> , 2004).

2	AAGTTTA	5,8e-005	Desconocido
3	AATAGCT	9,9e-005	Desconocido
4	CACAAAA	2,3e-004	Desconocido
5	GCTGCAA	7,3e-004	Desconocido

B

Identificación del motivo en genes con expresión aumentada	Secuencia del motivo semilla	p-valor	Resultado de la búsqueda de los motivos sobrerrepresentados en base de datos (PLACE)
6	ATATCCC	3,6e-005	<p>GATA (reversa complementaria de TATC): sitio de unión del factor de transcripción ASF2 (Rubio-Somoza <i>et al.</i>, 2006; Reyes <i>et al.</i>, 2004; Lam y Chua, 1984).</p> <p>GGATA (reversa complementaria de TATCC): motivo central de unión de MYB1 en papa (Baranowskij <i>et al.</i>, 1994).</p> <p>GNATATNC (reversa complementaria de ATATNC): secuencia de unión de PHR1 (phosphate starvation response 1) (Rubio <i>et al.</i>, 2001; Schunmann <i>et al.</i>, 2004 a y b).</p>
7	AAAGATG	1,5e-004	<p>AAAG: sitio central requerido para la unión de proteínas Dof de maíz (Yanagisawa y Schmidt, 1999; Yanagisawa, 2000).</p> <p>AAAGAT: secuencia consenso putativa de unión de la nodulina (Sandal <i>et al.</i>, 1987; Stougaard <i>et al.</i>, 1990).</p> <p>AAAGAT: secuencia consenso característica de promotores activados en células infectadas de nódulos de maíz (Vieweg <i>et al.</i>, 2004; Fehlberg <i>et al.</i>, 2005).</p>
8	CCAAGTA	1,6e-004	<p>YACT (reversa complementaria de AGTR): motivo encontrado en la región regulatoria de la fosfoenolpiruvato carboxilasa en <i>Flaveria trinervia</i> (Gowik <i>et al.</i>, 2004).</p>

9	TTAGGAA	1,7e-004	CNAACAC (reversa complementaria de GTGTTNG): motivo en la región regulatoria del gen <i>Napin</i> en <i>Brassica napus</i> (Ellerstrom <i>et al.</i> , 1996). CCTACCNNNNNNNCT (reversa complementaria de AGNNN, de NNNGG y de TAGG): motivo H-box. Sitio de unión del complejo Kap-2, que tiene similitud con una subunidad del autoantígeno Ku mamífero (Lindsay <i>et al.</i> , 2002; Yu <i>et al.</i> , 1993). CTAATTGTTTA (reversa complementaria de TAAACAATTAG): motivo de unión de una proteína <i>homeodomain</i> (HD) en la región regulatoria de PR2 (Korfhage <i>et al.</i> , 1994).
10	GCTACAA	4,9e-004	Desconocido

Con el objetivo de conocer si algunas de estas proteínas regulatorias y sus genes blancos se hallaban alterados en las líneas transgénicas AS 35S::*Asr1* en comparación con las plantas controles, se midieron los niveles de los ARNm por *qPCR* de algunos genes seleccionados en muestras de frutos maduros obtenidos del experimento III. *H-box* fue uno de los motivos hallados en las regiones regulatorias de los genes con niveles aumentados de ARNm en las líneas AS (motivo 9; tabla 3.4 B). Es el sitio de unión del complejo transcripcional KAP-2 (Lindsay *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 1993). KAP-2 tiene similitud con una subunidad del autoantígeno Ku de mamífero (Lindsay *et al.*, 2002) y está formado por las subunidades KU70 y KU80 (Lindsay *et al.*, 2002). Los niveles del ARNm de *Ku70* mostraron aumentos significativos en los frutos de las plantas AS5 y AS17 (figura 3.20 A), mientras que *Ku80* no mostró cambios estadísticamente significativos. Se buscaron en los microarreglos los genes con niveles aumentados de ARNm que portaban este motivo en sus regiones regulatorias y la mayoría de estos tuvieron funciones relacionadas al metabolismo de pared celular (figura 3.20 B y tabla 19 del anexo). Se midieron los niveles del ARNm de los siguientes genes: *Cnd70* (*chloroplast nucleoid DNA-binding protein-related*), *expansina A3*, *expansina A15* y *PI8* (*pectate lyase 8*), que se encontraron aumentados estadísticamente en las líneas AS5 y AS17 (figura 3.20 C). Además, se midieron los niveles del ARNm del gen que codifica para la *chalcona sintasa* (*chs*), ya que en la bibliografía está propuesto como un blanco directo de KAP-2 (Lindsay *et al.*, 2002). Sin embargo, no se detectó alteración de los niveles del ARNm de este gen en las líneas AS (tabla 18 del anexo). Considerando estos resultados, se buscó la presencia del *core* del motivo de unión de ASR1 (GCCCA; Ricardi *et al.*, 2014) en las regiones regulatorias de los

genes medidos por *qPCR*. Se encontró que el promotor del gen *Ku70* posee este motivo repetido tres veces en las posiciones -133-138, -1001-1006 y -1351-1356 antes del codón ATG. Esta información permite postular un modelo de regulación en el cual se propone que ASR1 activaría la transcripción de la subunidad *Ku70* de KAP-2 y que el complejo KAP-2 estimularía a su vez la transcripción de los genes *Cnd70*, *expansina A3*, *expansina A15* y *Pl8* (figura 3.20D). De esta forma se propone que ASR1 estaría involucrado en la regulación de genes asociados a la pared celular a través de *Ku70*. No obstante estos resultados, la medición de la textura de los frutos de las líneas silenciadas en un experimento de postcosecha no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre los frutos de las líneas AS y los de las plantas controles (figura 3.20E).

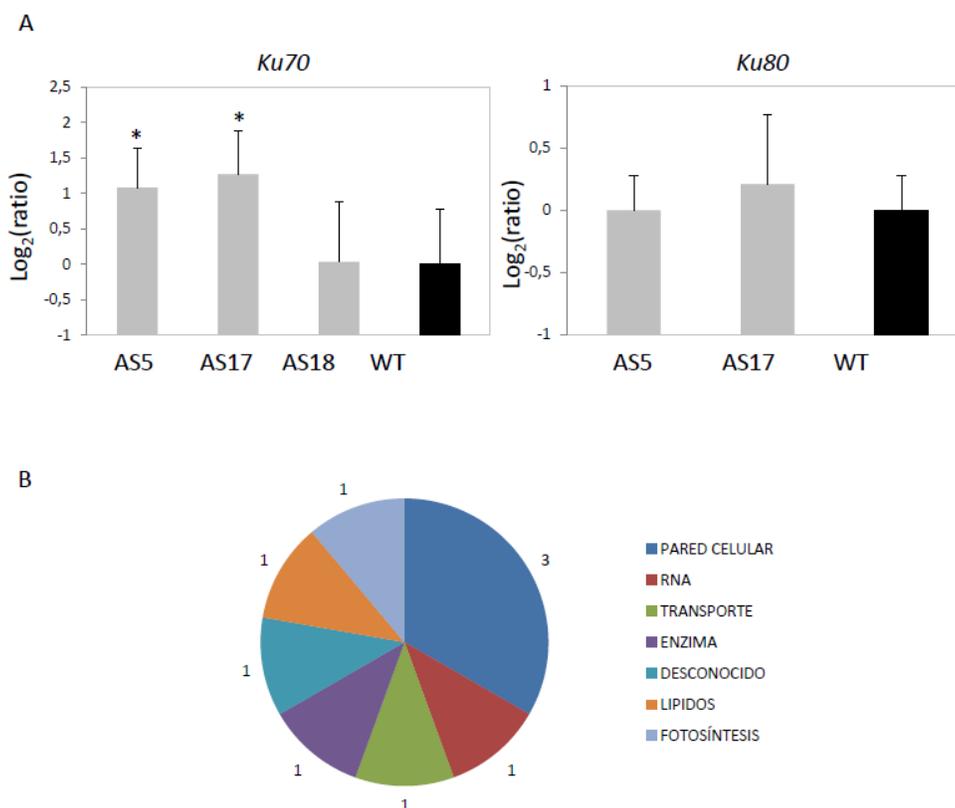


Figura 3.20. Análisis del motivo **ttagga** (motivo 9; tabla 3.4B) sobrerrepresentado en las regiones regulatorias de los genes sobreexpresados de las plantas silenciadas. **A.** Niveles de ARNm de las subunidades (*ku70* y *ku80*) del complejo transcripcional KAP-2, que se une al motivo H-box (cctacc(n)7ct), cuantificadas por *qPCR* en un experimento independiente de los microarrays. **B.** Gráfico de torta con las categorías Mapman de los genes sobreexpresados en los microarrays en la línea AS5 y/o en la línea AS17 que tienen el motivo H-box en sus regiones regulatorias. Continúa en el siguiente gráfico.

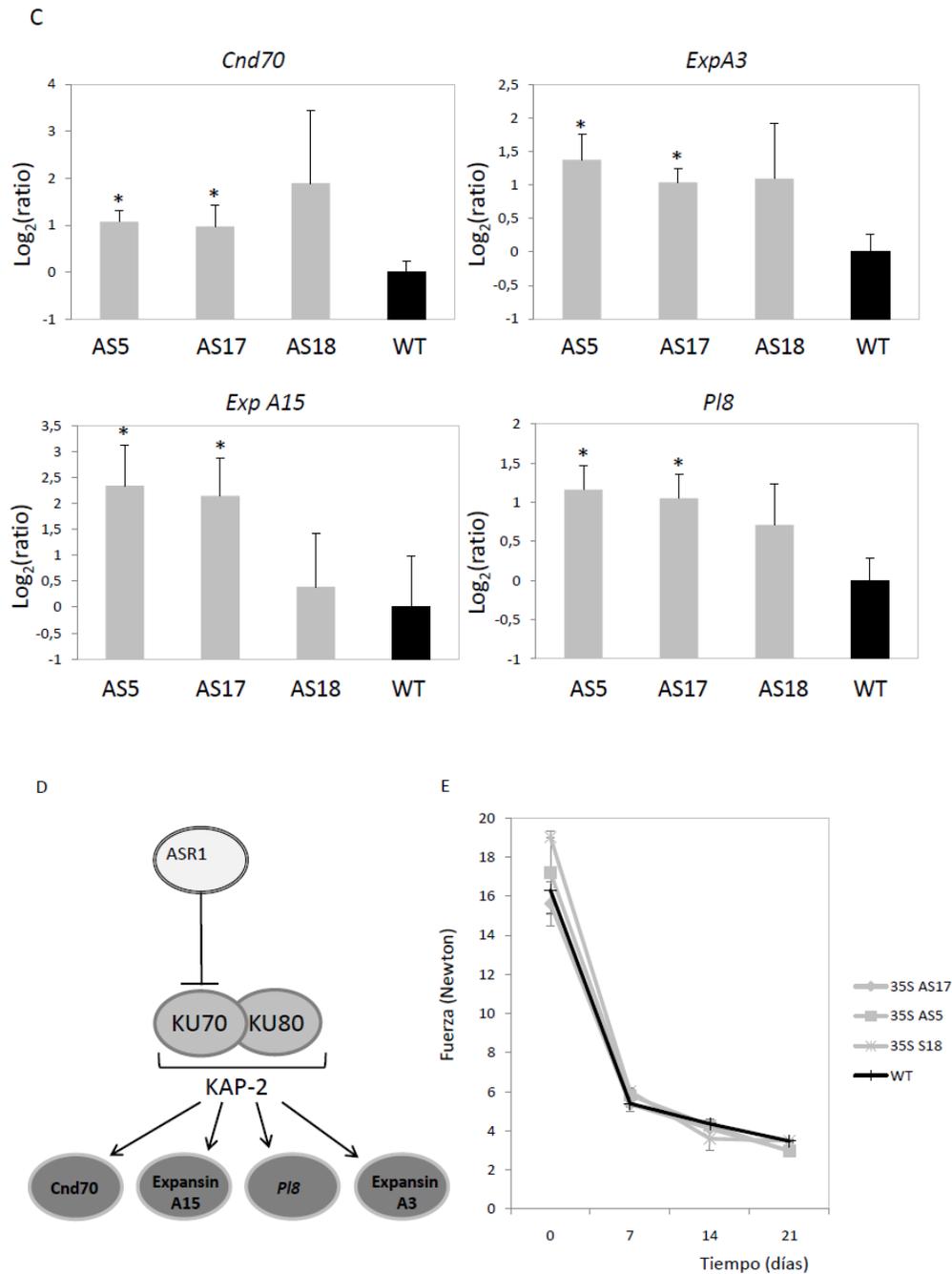


Figura 3.20 (continuación). Análisis del motivo **ttagga** (*H-box*; motivo 9; tabla 3.4B) sobrerrepresentado en las regiones regulatorias de los genes sobrexpresados de las plantas silenciadas. **C.** Niveles del ARNm de genes que contienen al motivo H-box en sus regiones regulatorias en un experimento independiente de los microarrays. Las barras representan el logaritmo en base dos de los *ratios*, es decir de los niveles del ARNm del gen de interés en las líneas relativos a los niveles del ARNm en las plantas WT, ambos normalizados por los niveles del ARNm del gen de referencia (*18S rRNA*). Las barras de error representan el error estándar. El asterisco representa resultados estadísticamente significativos por la prueba de permutación ($p < 0,05$). $N = 3-5$. **D.** Modelo propuesto de la vía a través de la cual ASR1 estaría involucrado en la regulación de la expresión

de los genes con el motivo H-box. **E.** Medida de la textura de los frutos, que se encuentra afectada por la pared celular, a cuatro tiempos distintos luego de su cosecha (considerada tiempo 0). Los frutos de las líneas silenciadas y controles fueron conservados en una cámara de cría en condiciones controladas (temperatura 19°C, humedad 85%) desde su cosecha y hasta su medición. El análisis estadístico empleado fue ANOVA y las barras de error representan el error estándar. No hubo diferencias significativas. N=4-6.

Por otro lado, el motivo de unión de *Arr1* (*Arabidopsis response regulator1*) se encontró sobrerrepresentado en las regiones regulatorias de los genes con niveles disminuidos de ARNm en las plantas AS (motivo 1, tabla 3.4 A). Los niveles del ARNm de *Arr1* resultaron aumentados en las líneas AS5 y AS17 durante el experimento III (figura 3.21 A). Se buscaron los genes que portaran este motivo en sus regiones regulatorias entre los genes que tuviesen sus niveles de ARNm disminuidos en los microarreglos. La mayoría de ellos resultaron de función desconocida aunque la segunda categoría de genes más abundantes se encontraban asociados a la síntesis y/o estructura de la cromatina (figura 3.21 B y tabla 20 del anexo). Se midió la expresión de algunos de los genes que contienen a este motivo en sus regiones regulatorias (tablas 18 y 20 del anexo). Llamativamente, el gen codificante para Histone3 se encontró aumentado en las líneas AS5 y AS18 mientras que el codificante para *Hta6* (*Histone H2A.1*) se encontró aumentado en la línea AS5 (figura 3.21 C). El resto de los genes medidos [*Gstu7* (Glutathione S-transferase tau 7), *Mod1* (*mosaic death 1*), *Ohp2* (*one-helix protein 2*), *Rbcs* (*RuBisCO small subunit 2B*)] no mostraron diferencias significativas entre las líneas silenciadas AS y el control (tabla 18 del anexo). Además se midieron los niveles del ARNm de *Nshb* (*hemoglobin 1*), que de acuerdo a la bibliografía es directamente regulado por ARR1 (Ross *et al.*, 2004) y que estaba estadísticamente disminuido en los microarreglos de la línea AS17 (tabla 15 del anexo), aunque no se hallaron diferencias significativas (tabla 18 del anexo). Por otro lado, el motivo de unión de ASR1 (Ricardi *et al.*, 2014), no está presente en las regiones regulatorias de los genes *Arr1*, *Histone3* y *Hta6*. Se propone entonces un modelo a través del cual ASR1 estaría involucrado en la regulación de los genes con este motivo en sus regiones regulatorias (figura 3.21 D) a través de su interacción con otros factores de transcripción o proteínas regulatorias, que modificarían los niveles del ARNm de ARR1 y esta proteína a su vez regularía de manera directa y positiva los niveles del ARNm de *Histone3* y *Hta6*.

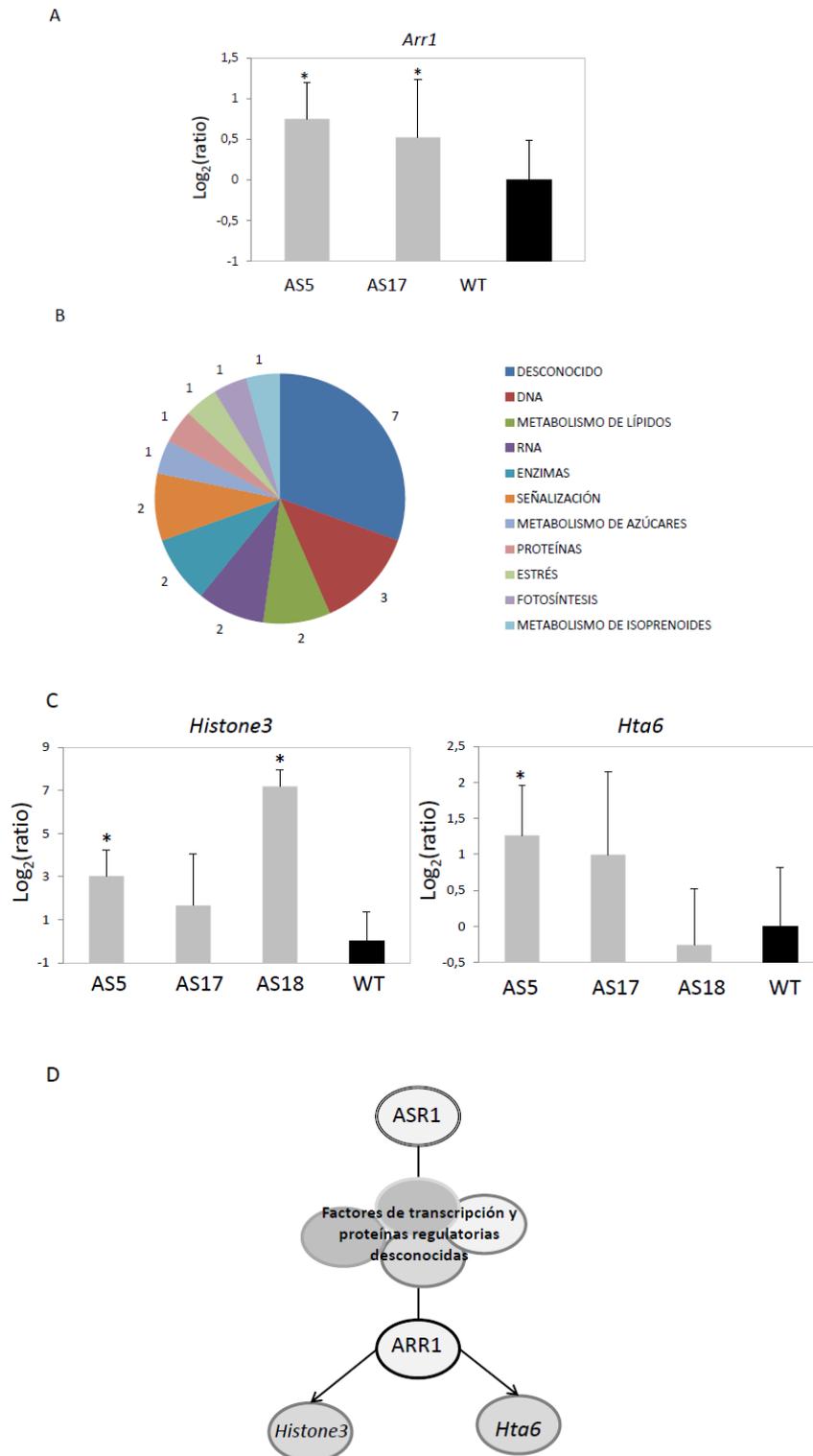


Figura 3.21. Análisis del motivo *gaaatca* (motivo 1; tabla 3.4A) sobrerrepresentado en las regiones regulatorias de los genes con niveles de expresión disminuidos de las plantas silenciadas. **A.** Niveles del ARNm del factor de transcripción ARR1 que se une al motivo *ngatt*, medidos por *qPCR* en un experimento

independiente de los microarreglos. **B.** Gráfico de torta de las categorías Mapman de los genes con niveles de expresión disminuidos en los microarreglos en la línea AS5 y/o AS17 que contienen al motivo gaaatca en sus regiones regulatorias. **C.** Niveles de ARNm de genes que contienen al motivo gaaatca en sus regiones regulatorias en un experimento independiente al de los microarreglos. **D.** Esquema del modelo propuesto de la vía a través de la cual ASR1 estaría involucrado en la regulación de los genes con el motivo gaaatca en sus regiones regulatorias. Las barras representan los niveles del ARNm del gen de interés en las líneas relativos a los niveles del ARNm en las plantas WT, ambos normalizados por los niveles del ARNm del gen de referencia (*18S rRNA*) (*ratio*). Las barras de error representan el error estándar. Los asteriscos representan resultados estadísticamente significativos por la prueba de permutación ($p < 0,05$). N=3-5.

Asimismo, se realizaron análisis de genes relacionados con otros motivos. Del motivo 6 se midió los niveles del factor de transcripción *Asf-2* (*activating sequence factor-2*; o *Acs2*) (Lam y Chua, 1989) aunque no se hallaron diferencias estadísticamente significativas (tabla 18 del anexo). Sin embargo, los niveles del ARNm de su gen blanco, *Cab* (*chlorophyll a/b binding protein*) (Lam y Chua, 1989), resultaron aumentados en la línea AS5 de manera estadísticamente significativa (tabla 18 del anexo). Como este motivo también tiene homología con el sitio de unión de un factor de transcripción MYB (*myeloblastosis*; Baranowskij *et al.*, 1994) se midieron sus niveles aunque no resultaron estadísticamente alterados (tabla 18 del anexo). Respecto del motivo 9, además de haberse medido las subunidades de KAP-2, se midieron los niveles del ARNm del gen *Pathogenesis-related homeodomain protein-like*, aunque sus niveles no se encontraron alterados (tabla 18 del anexo).

3.2.7. Análisis integrado de metabolitos y transcriptos

Una vez obtenidos los datos de los perfiles transcripcionales y metabolómicos para las líneas silenciadas bajo el promotor 35S AS5 y AS17 durante el experimento I, se procedió al análisis integrado de los datos. En primer lugar, se utilizó el programa Mapman (Thimm *et al.*, 2004) para visualizar gráficamente las vías metabólicas para las cuales se identificaron metabolitos por GC-MS (figura 3.11) y las vías donde se detectaron transcriptos con cambios estadísticamente significativos en los experimentos de microarreglos (figura 3.14). En los gráficos mostrados en las figuras 3.22A (línea 35S::*Asr1* AS5) y 3.22B (línea 35S::*Asr1* AS17) es posible observar que algunas vías mostraron alteraciones comunes en ambas líneas transgénicas. El gen de la *Celulosa sintasa* y la 4-hidroxi-prolina (ambos incrementadas) están asociadas al metabolismo de la pared celular. Por otro lado, la beta-Alanina (aumentada) y el ARNm del gen *Dut1* (*Dutp-pyrophosphatase-like 1*; disminuido) están asociados al metabolismo de los nucleótidos. En relación con la vía de los nucleótidos, en la línea AS5 el gen *Tso2* (*ribonucleotide reductase small subunit*) mostró disminuciones en su ARNm, mientras que en la línea AS17, el gen *TK1A* (*thymidine kinase 1a*) mostró niveles incrementados de su ARNm.

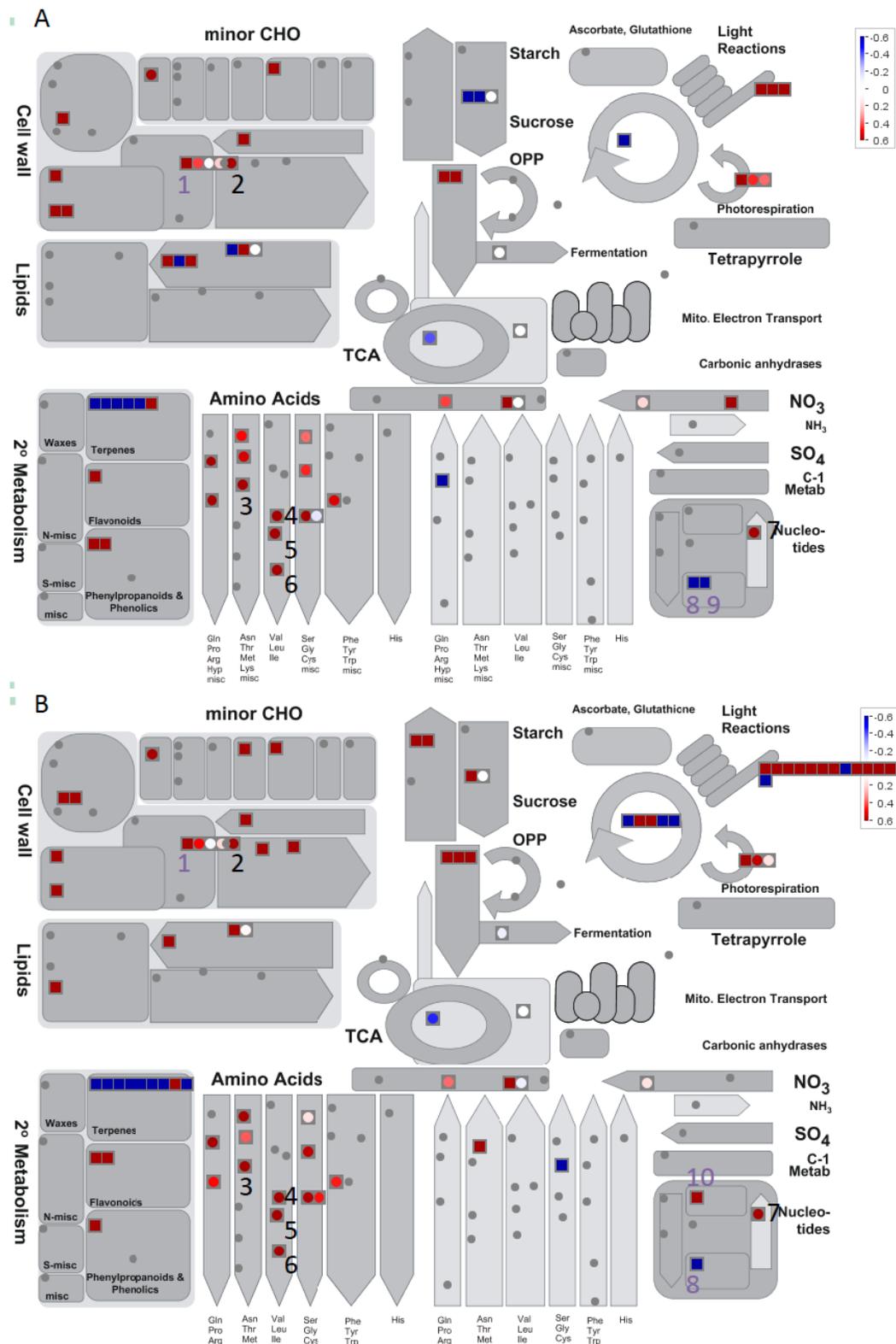


Figura 3.22. Mapeo de los transcritos y metabolitos de frutos maduros de las líneas silenciadas bajo el promotor 35S en un esquema del metabolismo primario. El mapeo se realizó con los datos obtenidos de las

figuras 3.11 y 3.14 de las líneas AS5 (A) y AS17 (B) con el programa Mapman (Thimm *et al.*, 2004). Los transcritos están representados con cuadrados y los metabolitos con círculos. Todos los transcritos están diferencialmente expresados pero sólo los metabolitos con un número lo están. A la derecha arriba se encuentra la escala de color que indica los niveles de cambio del transcritos o metabolito en relación con la planta control WT (azul: disminución; rojo: aumento). Se indican los nombres de los metabolitos estadísticamente significativos (numerados en negro en el gráfico) y de los transcritos que pertenecen a la misma vía (numerados en violeta en el gráfico): **1.** Celulosa sintasa (Solyc07g043390.2.1). **2.** 4-Hidroxi-prolina. **3.** Metionina. **4.** Leucina. **5.** Isoleucina. **6.** Valina. **7.** beta-Alanina. **8.** *Dut1* (SGN-U577318). **9.** *Tso2* (SGN-U586318). **10.** *Tk1A* (SGN-U577123). Las vías involucradas son: *cell wall* (pared celular), *amino acids* (aminoácidos), *nucleotides* (nucleótidos), *minor CHO* (metabolismo de hidratos de carbono minoritarios).

Por otro lado, se detectaron cambios metabólicos significativos que no están, en principio, asociados con alteraciones en los genes involucrados en sus vías. En este sentido, se hallaron cambios significativos en los niveles de metionina, leucina, isoleucina y valina (aminoácidos) sin cambios a nivel transcripcional de genes asociados. Del mismo modo, hubo cambios estadísticamente significativos en transcritos pero sin modificaciones en metabolitos asociados a las mismas vías. Por ejemplo, en la fotorrespiración, en la vía de la sacarosa, en el metabolismo de lípidos y en el ciclo de Krebs.

Como análisis complementario se realizó la integración de los datos de expresión de genes y variación de metabolitos en los frutos de las plantas AS 35S::*Asr1* utilizando un modelo de redes neuronales utilizando el programa *omeSOM (Milone *et al.*, 2010) (figuras 3.9 y 3.11 y tablas 10, 15 y 16 del anexo). Brevemente, el programa identifica variaciones coordinadas en los datos y los agrupa de acuerdo a las distancias euclídeas de las variaciones detectadas. Cada conglomerado está representado por una neurona y agrupa los datos con mayor similitud entre sí y menor similitud con otros conglomerados. El objetivo es representar datos multidimensionales complejos en una matriz de dos dimensiones que mantenga las relaciones de proximidad entre los datos. El programa considera tanto las relaciones directas como las opuestas entre los transcritos y metabolitos, por ende la mitad de las neuronas presentarán el mismo patrón que la otra mitad pero en sentido contrario (datos con signo invertido). En la figura 3.23 se muestra el esquema general de la red neuronal en un sentido. En el esquema, cada neurona de la red está representada por un anillo. El color del anillo indica los tipos de objetos (transcritos, metabolitos o ambos) que se agruparon en dicha neurona, es decir, que presentaron una variación coordinada entre los ARNm y los metabolitos. La lista de objetos que se agruparon en cada neurona se presenta en la tabla 21 del anexo. El diámetro de cada neurona es proporcional a su cohesión, es decir, a la concisión del agrupamiento (a menor diámetro mayor concisión y mejor calidad del agrupamiento).

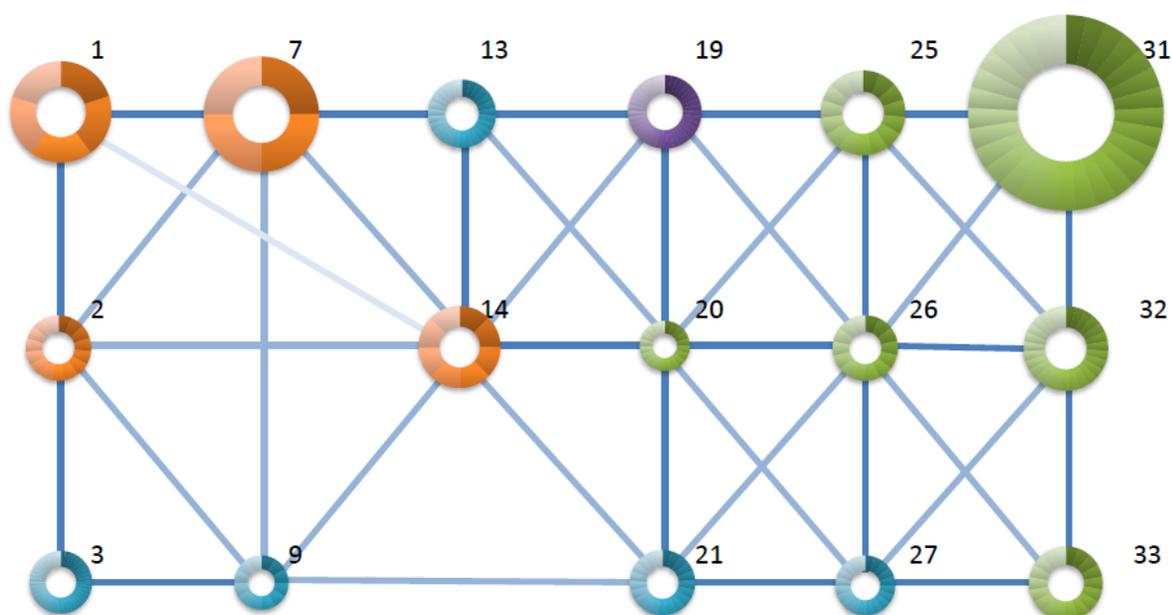


Figura 3.23. Red de concurrencia de niveles de expresión de genes y de niveles de acumulación de metabolitos. Se presenta un agrupamiento de transcritos y metabolitos basado en un modelo de red neuronal aplicado mediante el uso del programa *omeSOM (Milone *et al.*, 2010). Se integraron los datos de los transcritos diferencialmente expresados en frutos maduros de las líneas silenciadas para *Asr1* bajo el control del promotor 35S (AS5 y AS17) (tablas 15 y 16 del anexo) y de metabolitos medidos en los mismos frutos y en hojas fuente de las mismas plantas (figuras 3.9 y 3.11). **A.** Diagrama de la red neuronal (sólo se muestran los patrones en un sentido). Cada anillo representa una neurona con un número de identificación a la derecha. Los distintos colores de cada neurona indican: naranja: metabolitos medidos en hojas fuente y transcritos medidos en frutos maduros; azules: metabolitos medidos en hojas fuente y frutos maduros y transcritos medidos en frutos maduros; violetas: transcritos medidos en frutos maduros solamente; verdes: metabolitos y transcritos medidos en frutos maduros. Los distintos tonos dentro de cada neurona representan a cada uno de los transcritos o metabolitos agrupados en esa neurona (la lista detallada de los mismos está en la tabla 21 del anexo). El diámetro de cada neurona es proporcional a su cohesión. Las neuronas faltantes (8 y 15) no agruparon a ningún metabolito o transcritos.

En la figura 3.24 se muestra a modo de ejemplo la estructura de la neurona 7. Esta neurona contiene 4 objetos (*calistegina B2*, *Mee66* (*maternal effect embryo arrest 66*), *Aco1* (*Acc oxidase 1*) y *dreb1a* (*Dehydration response element B1a*)) representados en 4 tonos distintos en la neurona (representada a su vez por el anillo). Debajo de la neurona se muestra en forma de red las relaciones entre los 4 objetos que mostraron variaciones coordinadas: esta red muestra que todos los elementos en la neurona están relacionados entre sí y que la distancia que los separa es similar. Lo que nos señala este gráfico es que *calistegina B2*, *Mee66*, *Aco1* y *dreb1a* tienen variaciones similares en las dos líneas silenciadas, lo cual sugeriría que existiría algún grado de coregulación entre estos genes y

los niveles de calistegina B2. Además calistegina B2 y *dreb1a* se relacionan de manera inversa a *Mee66* y *Aco1* (tabla 21 del anexo).

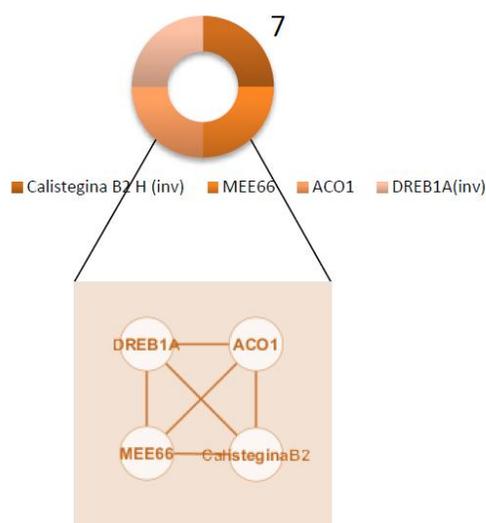


Figura 3.24. Descomposición de la neurona 7. Se observa al anillo que representa a la neurona 7 en la red neuronal. La red que emerge de la neurona muestra la relación entre cada metabolito y transcripto dentro de esa neurona empleando el valor de la cohesión de la neurona como valor de la distancia entre los elementos.

En primer lugar, analizamos aquellos genes y metabolitos que pertenecen a la misma vía de acuerdo a los gráficos de Mapman (figura 3.22). La *Celulosa sintasa* (CSLG1) y la 4-hidroxi-prolina, pertenecientes a la vía de la pared celular, se agruparon en neuronas diferentes (neuronas 32/5 y 31/6, respectivamente) (tabla 21 del anexo). Sin embargo, estas neuronas son adyacentes en el mapa (figura 3.23), lo que indica un cierto grado de covariación. Por otro lado, la beta-alanina y los transcriptos de *Dut1* (*Dutp-pyrophosphatase-like 1*), pertenecientes a la vía del metabolismo de los nucleótidos, se agruparon en las neuronas 32/5 de manera inversa (tabla 21 del anexo). Es decir, podría existir una correulación inversa entre ellos. En cambio, *Tso2* (*ribonucleotide reductase small subunit*) se agrupó en las neuronas 9/28 y *Tka1a* (*thymidine kinase 1a*) se agrupó en las neuronas 19/18 (tabla 21 del anexo y figura 3.23), con lo cual la variación de estos genes (que también pertenecen a la vía de los nucleótidos; figura 3.21A y B) con la beta-alanina y *Dut1* no sería tan estrecha en esta vía.

Los metabolitos de hojas que resultaron estadísticamente alterados en las líneas AS5 y AS17 se agruparon en las neuronas 21/16 (ácido 2-aminoadípico y noradrenalina), 14/23 (ácido cis-3-cafeoilquínico) y en las 2/35 (beta-alanina) (tabla 21 del anexo y figura 3.23). Esto sugiere que solamente en los casos del ácido 2-aminoadípico y la noradrenalina podría existir algún tipo de correulación. El resto de los metabolitos se agruparon en las neuronas 3, 9, 13 y 27, junto a metabolitos y transcriptos detectados en los frutos de estas plantas, y en las neuronas 1 y 7 (junto a transcriptos detectados en los frutos) (tabla 21 del

anexo y figura 3.23). Esto sugiere que las variaciones en los contenidos de estos metabolitos en las hojas tienen alguna relación con los metabolitos y transcritos de los frutos.

Respecto de los genes que fueron validados por *qPCR* (tabla 18 del anexo y figuras 3.15 a 3.23) en términos generales agruparon en neuronas que contenían transcritos y metabolitos de frutos. Por ejemplo, *Knat3* y *expansina A3* agruparon en las neuronas 25/12 y se coexpresan siguiendo patrones similares a las variaciones en los contenidos del ácido eritrónico (tabla 21 del anexo y figura 3.23). *Atb2* y *Nadp or*, por otro lado, se agruparon en las neuronas 31/6 y covariaron junto con los niveles de valina, isoleucina, leucina, ácido 3-isopropilmálico, metionina y 4-hidroxiprolina y también con los metabolitos asparagina, glicina y guanidina (tabla 21 del anexo y figura 3.23). *Pr3* y *Cnd70* se agruparon en las neuronas 33/4 junto al ácido hexadecanoico y la serina (tabla 21 del anexo y figura 3.23). *Hta6* e *histone 3* se agruparon en las neuronas 32/5 junto a la beta-alanina y al ácido aspártico, prolina, ácido piroglutámico, treonina y asparagina (tabla 21 del anexo y figura 3.23). *Expansina A15* se agrupó en las neuronas 27/10 junto a metabolitos del fruto (sacarosa, ácido glicólico, ácido decanoico, mioinositol, fenilalanina, ácido pirúvico) y de las hojas (metionina y ácido decanoico) (tabla 21 del anexo y figura 3.23). Solamente *P18* se agrupó en una neurona exclusiva de transcritos (19/18) (tabla 21 del anexo y figura 3.23).

Con respecto a los transcritos que habían sido incluidos en el modelo de la vía en la cual participaría ASR1 a través de su acción sobre *ku70* (figura 3.22D), ninguno de ellos se agruparon en las mismas neuronas (*Cnd70*: 33/4; *expansina A3*: 25/12; *expansina A15*: 27/10; *P18*: 19/18) (tabla 21 del anexo y figura 3.23). Por el contrario, los transcritos del modelo de la vía en la cual ASR1 participaría a través de su acción sobre ARR1 (figura 3.23D), *Hta6* e *histone 3*, se agruparon juntos en las neuronas 32/5 junto a la beta-alanina, ácido aspártico, prolina, ácido piroglutámico, treonina y asparagina (tabla 21 del anexo y figura 3.23).

3.3. DISCUSIÓN

3.3.1. Niveles de expresión de *Asr1* en los clones de tomate cultivados en los distintos experimentos

Las plantas transgénicas T1 *sense* (S) y *antisense* (AS) con el promotor 35S y con el promotor B33 fueron seleccionadas por sus niveles de expresión utilizando diversas técnicas moleculares (figuras 3.3 y 3.7). Luego fueron propagadas vegetativamente para los distintos experimentos. En cada experimento se volvieron a corroborar los niveles de expresión de *Asr1* por *qPCR* (figuras 3.4 y 3.7). Sólo las plantas *antisense* bajo el promotor 35S presentaron un silenciamiento constante en todos los experimentos (figura 3.4). En el caso de las plantas S tanto bajo el promotor 35S como bajo el promotor B33, la sobreexpresión observada en las generaciones T0 y/o T1 por *Northern blot* y/o por *Western blot* no fue observada en el análisis por *qPCR* (figura 3.4 y 3.7). Si bien estas plantas no mostraron silenciamiento de los niveles del ARNm de *Asr1* en comparación con los controles, existen trabajos en los cuales plantas transgénicas preparadas para sobreexpresar un gen homólogo silencian su expresión por el mecanismo de PTGS (*post-transcriptional gene silencing*; Vaucheret *et al.*, 2001), aunque estos casos son más comunes en plantas que poseen más de una copia del transgén (Matzke y Matzke, 1995).

Con respecto a las líneas S de tomate bajo los promotores 35S y B33, fueron inicialmente seleccionadas aquellas que mostraron una segregación de tipo 3:1 respecto de la resistencia al antibiótico selectivo kanamicina, lo cual sugiere que poseen una única copia del transgén. Además, el análisis de los metabolitos (figuras 3.9 a 3.12) mostró que hubo cambios en los mismos metabolitos en al menos dos líneas en frutos y en hojas de las plantas con los dos tipos de promotores en cada experimento independiente. Esto sugiere que esos cambios están asociados a la sobreexpresión de *Asr1* en sí misma y que no serían consecuencia de un efecto de la posición en la cual se insertó el transgén, dado que si fuese así se esperaría que las alteraciones en los metabolitos de todas las líneas fuesen distintas. Igualmente, el ensayo de desafío a estrés por sequía mostró que las líneas S se comportan diferente a las plantas controles (figura 3.1). Por otro lado, se observaron cambios en los niveles de algunos parálogos de *Asr* (figura 3.5), lo cual sugiere que la sobreexpresión de *Asr1* tiene un impacto sobre la expresión de esta familia de genes en las líneas S por algún mecanismo desconocido. Como las líneas sobreexpresantes muestran un fenotipo que podría ser consecuencia de la sobreexpresión del transgén (figuras 3.1, 3.5, 3.9 a 3.12) y como no tienen los niveles del ARNm de *Asr1* silenciados sino que no se detectó la sobreexpresión, una posible explicación para los niveles del ARNm de *Asr1* detectados durante los experimentos (figuras 3.4 y 3.7) es que la expresión de los transgenes suele darse como mosaico celular y muchas veces no es posible

determinar si la transcripción reducida refleja una disminución uniforme en todas las células o una completa inactivación en algunas células y una alta actividad trascricional en otras (Matzke y Matzke, 1995). También se ha sugerido que las variaciones en los niveles de expresión de un transgén en un mismo tejido podrían darse por diferencias en los niveles de factores de transcripción en el tejido (van Leeuwen *et al.*, 2001). Por otro lado, el fenómeno de silenciamiento no suele mostrar un rango de niveles de expresión génica sino que parece ser a *todo o nada* (van Leeuwen *et al.* 2001). Entonces, dadas las características de las plantas S y sus niveles de expresión, el hecho de no detectar sobreexpresión por *qPCR* podría ser consecuencia de una expresión no uniforme en el tejido, con zonas de alta expresión y otras con disminución en la misma, que podría deberse al silenciamiento en algunas células o a diferencias en la expresión de factores de transcripción.

Por su lado, las plantas AS B33::*Asr1* mostraron silenciamiento en la selección inicial y en el segundo experimento. No obstante, en el tercero, el silenciamiento no pudo ser detectado (figura 3.7). Una de las causas podría ser que el silenciamiento mediado por ARN *antisense* se da a través de dos mecanismos: por un lado degradación del ARNm y por otro lado impidiendo la traducción (Li *et al.*, 2011). Si prevalece este último mecanismo en el tercer experimento, entonces esa sería la causa por la cual no se observarían alteraciones en los niveles del ARNm de *Asr1*.

Con respecto a los parálogos, existe una correlación positiva entre los niveles de *Asr1* y *Asr2* en las plantas empleadas (tabla 3.1). De hecho, los niveles de *Asr2* están disminuidos en las plantas silenciadas en dos experimentos (figura 3.5), lo cual sugiere que existirían mecanismos de coregulación entre *Asr1* y *Asr2*. Además este resultado sugiere que puede existir un efecto conjunto de *Asr1* y *Asr2* en las plantas transgénicas silenciadas.

3.3.2. Interacciones genotipo x ambiente se evidencian en las líneas transgénicas *Asr1*

3.3.2.1. Análisis fenotípicos

El análisis estadístico de estos datos se realizó a través de análisis univariado (anova; tabla 1 del anexo y figura 3.8) y multivariado (prueba basada en conglomerados DGC; tabla 3.3). Estos representan dos enfoques distintos en el análisis estadístico. El univariado consiste en el análisis de una sola variable mientras que en el análisis multivariado se examinan dos o más variables. Cuando se analizan varias características de un mismo individuo, esas variables suelen estar correlacionadas. En el análisis univariado se ignoran esas interdependencias entre las variables mientras que en el análisis multivariado se contemplan, con lo cual resultan análisis complementarios (García, 2008).

Se observaron algunas diferencias fenotípicas entre las líneas transgénicas en comparación con las plantas controles. Las líneas AS bajo el promotor 35S mostraron diferencias en el peso total y número de frutos maduros durante el experimento I (figura 3.8 y tabla 1 del anexo) mientras que las líneas 35S S mostraron un fenotipo distinto a los controles (tabla 3.3). Esto indica que hay diferencias entre las plantas 35S AS y las S en comparación con los controles, aunque estas diferencias dependen de las condiciones ambientales dado que fueron distintas en los tres experimentos independientes llevados a cabo.

3.3.2.2. Las líneas transgénicas no muestran alteraciones en los niveles de azúcares solubles

Contrariamente a lo esperado (ver capítulo 2) no se encontraron diferencias significativas en los niveles de los azúcares mayoritarios del fruto de tomate (glucosa, fructosa y sacarosa) ni en las hojas de ninguna de las líneas transgénicas analizadas (tablas 3 y 4 del anexo). Las especies en las cuales se encontraron niveles alterados de hexosas asociadas a alteraciones en los niveles de *Asr1* fueron en hojas de tabaco (glucosa aumentada en líneas silenciadas; capítulo 2), en tubérculos de papa (glucosa disminuida en las líneas sobreexpresantes y aumentada en las líneas silenciadas; Frankel *et al.*, 2007), y en hojas de maíz que sobreexpresan *Asr1* (glucosa disminuida; Virilouvet *et al.*, 2011). Además, plantas de arábido, que no poseen a ningún miembro de la familia *Asr*, y que sobreexpresan *Asr1* de plátano mostraron niveles de glucosa aumentados en hojas (Dai *et al.*, 2011). Una explicación posible es que un parálogo de la familia *Asr* supla la función de *Asr1* en el caso de las plantas de tomate silenciadas, dado que este fenómeno ocurre en ocasiones (Hanada *et al.*, 2011). En este sentido, existen evidencias que *Asr3* de arroz estaría involucrado en la vía de las hexosas ya que se observó que este gen no sólo tiene en sus regiones regulatorias motivos asociados a hexosas sino que su expresión aumenta con un tratamiento con glucosa y sacarosa en dicha especie (Joo *et al.*, 2013; Pérez-Díaz *et al.*, 2013). En las líneas analizadas no hubo evidencias de una alteración estadísticamente significativa de los niveles de *Asr3/5* (figura 3.5) y sólo en uno de los tres experimentos hubo una correlación significativa entre los niveles de *Asr1* y *Asr3/5* (tabla 3.1), lo cual sugiere que podría haber una compensación a nivel traduccional o postraduccional. También existe la posibilidad de redundancia de genes no homólogos (Pickett y Meeks-Wagner, 1995) que compensen la actividad de ASR1.

Por otro lado, los niveles del ARNm del transportador de hexosas *Ht1*, que fue descrito como blanco de ASR1 en uva (Çakir *et al.*, 2003) y que presumiblemente contribuye a la alteración de los niveles de glucosa en tabaco y papa, no se encontraron alterados en las líneas silenciadas en dos experimentos independientes (tablas 15, 16 y 18 del anexo).

Tampoco se encontraron evidencias de que ASR1 de tomate interactúe con las regiones regulatorias de *Ht1* en un ensayo de ChIP realizado recientemente (Ricardi *et al.*, 2014). Sin embargo, no es posible descartar completamente la regulación de *Ht1* por *Asr1* en tomate considerando lo que se discute anteriormente respecto de algún mecanismo de compensación mediado por *Asr3/5* o por un gen no homólogo a *Asr1*. Por otro lado, evidencias aisladas han mostrado correlaciones negativas significativas entre los niveles del ARNm de *Asr1* y de los genes de *Ht* en el desarrollo del fruto de tomate en experimentos de microarreglos (Carrari *et al.*, 2006; <http://bti.cornell.edu/CGEP/CGEP.html>).

3.3.2.3. Las líneas transgénicas muestran alteraciones en el metabolismo de aminoácidos en los frutos

En el caso de las hojas, los metabolitos que se encontraron alterados en las plantas transgénicas fueron distintos en cada experimento realizado, lo cual sugiere que ASR1 interactúa con las condiciones ambientales y genera respuestas diferenciales en función de las mismas. Sin embargo, se pudo observar que algunos intermediarios de vías metabólicas distintas que participan en las mismas funciones fisiológicas mostraron cambios (figuras 3.9 y 3.10). Por ejemplo, las plantas S 35S::*Asr1* mostraron alteraciones en metabolitos asociados a estrés (Mondolot *et al.*, 2006; Mukherjee *et al.*, 2014; Swiedrych *et al.*, 2004; Obata y Fernie, 2012) durante el experimento I (el ácido 3-cafeoilquínico y la noradrenalina estaban disminuidos) y otros metabolitos también asociados a estrés durante el experimento II (la 5-hidroxitriptamina y la prolina estaban aumentada y disminuida, respectivamente). Por otro lado, las plantas AS 35S::*Asr1* mostraron disminuciones en los niveles de noradrenalina. Sin embargo, no se encontraron cambios en otros experimentos. Las diferencias observadas están en línea con los cambios en los niveles de prolina en hojas de líneas de tabaco que sobreexpresaban *Asr1* (Kalifa *et al.*, 2004b).

En el caso de los frutos también se observó que en general los cambios en los metabolitos estuvieron asociados a cada experimento en particular (figura 3.11 y 3.12). A diferencia de las hojas, se pudo observar que en los frutos las vías de los aminoácidos se encuentran alteradas aun con diferencias erráticas que probablemente reflejen las condiciones ambientales de los distintos experimentos. Virlouvét *et al.* (2011) observaron que en hojas de maíz que sobreexpresan ASR1 los niveles de diez aminoácidos se hallan disminuidos y postularon que ASR1 impacta negativamente en el contenido de estos metabolitos en hojas de maíz. Por otro lado, plantas de tabaco que sobreexpresan *Asr1* acumulan menos prolina en las hojas luego de ser sometidas a estrés salino (Kalifa *et al.*, 2004b) mientras que tubérculos que silencian *Asr1* presentan disminuciones significativas en los contenidos

de glutamina, fenilalanina, beta-alanina, treonina, serina y valina y tubérculos que sobreexpresan *Asr1* muestran disminución en GABA, treonina y serina (Frankel *et al.*, 2007). La complejidad de la relación de ASR1 con el metabolismo de los aminoácidos también se reflejó en el análisis metabólico de los frutos de tomate, habiéndose obtenido resultados en principio contradictorios entre las distintas líneas.

En los frutos de las plantas AS B33::*Asr1* se observaron disminuciones en aminoácidos en dos experimentos independientes (II y III) mientras que el resto de las líneas en los mismos experimentos no mostraron alteraciones (figuras 3.11, 3.12 y 3.13). Esto sugiere que ASR1 activa la vía de síntesis de algunos aminoácidos en los frutos de tomate de estas líneas. Si bien hay un transporte específico de aminoácidos desde y hacia los tejidos fuentes y destinos (Lalonde *et al.*, 2003), este mecanismo no parecería explicar en principio las diferencias en los niveles de aminoácidos entre las plantas silenciadas bajo el promotor B33 y bajo el promotor 35S dado que no se observaron diferencias en los niveles de los aminoácidos en las hojas. Además, en las plantas AS 35S::*Asr1* esos aminoácidos medidos en frutos no se agruparon en las neuronas con los mismos aminoácidos medidos en hojas (tabla 21 del anexo), lo cual sugiere que el efecto de ASR1 sobre los niveles de los mismos lo ejercería de manera diferencial en los frutos respecto de las hojas. Sin embargo, la síntesis primaria de aminoácidos y la captación de nitrógeno orgánico se produce en las raíces y la distribución y reciclado se produce tanto por el floema como por el xilema desde y hacia tejidos fuentes y destinos, lo cual genera una intrincada red regulatoria (Okumoto y Pilot, 2011). Esto indica que existen otros tejidos involucrados en el metabolismo de aminoácidos que pueden estar influyendo en los resultados obtenidos. Por otro lado, los frutos de las plantas S 35S::*Asr1* mostraron un aumento en los niveles de aminoácidos de las mismas vías durante el experimento I, lo cual favorece la idea de que ASR1 estimula la vía de síntesis de aminoácidos bajo ciertas condiciones. A su vez, estos aminoácidos se agruparon en una única neurona, lo cual sugiere que sus niveles están corregulados en las líneas AS 35S::*Asr1* (tabla 21 del anexo). Además, estos aminoácidos se agruparon en las neuronas con los genes *Nadp or* (*NADP-dependent oxidoreductase*) y *Atb2* (*oxidoreductase*), ambos involucrados en vías generales de respuesta a estrés, lo cual sugiere que se corregulan y que estos genes podrían estar involucrados en la misma vía que los aminoácidos alterados. Tanto NADP OR como ATB2 son oxidorreductasas asociadas a NAD(P) que actúan en situaciones de estrés (Babiychuk *et al.*, 1995; Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2008). Si bien no existen ensayos funcionales de la NADP OR ni de ATB2, los niveles de NADP/NADPH afectan el metabolismo durante situaciones de estrés (Hashida *et al.*, 2009) y podrían entonces afectar la síntesis de aminoácidos.

Los aminoácidos cumplen dos roles fundamentales en el fruto. Por un lado, la fenilalanina, la isoleucina y la leucina son precursores de compuestos volátiles involucrados en el sabor y aroma de los frutos (Klee y Giovanonni, 2011). Si bien es necesario demostrarlo experimentalmente, podría postularse que ASR1 contribuiría a la determinación de estos caracteres bajo ciertas condiciones. Por otro lado, los aminoácidos también tienen un rol preponderante en la respuesta frente a condiciones de estrés. Sin embargo, las alteraciones en las concentraciones de los aminoácidos dependen del tipo y nivel de estrés, del tejido y de su fase de desarrollo (Obata y Fernie, 2012). Por ejemplo, en estrés por sequía severo se observó un aumento en los niveles de aminoácidos en hojas de *Arabidopsis* mientras que en el mismo tipo de estrés pero leve se observó una disminución (Obata y Fernie, 2012). La cuestión es todavía más compleja si hay una combinación de distintos tipos de estreses. Es decir que no es posible predecir el rol de ASR1 en estrés en frutos a partir del análisis de sus aminoácidos, en particular si se considera su participación en distintos tipos de estreses en otras especies. En los microarreglos no hubo cambios significativos en los genes relacionados con la vía de los aminoácidos de cadena lateral ramificada y sus vías relacionadas (entre ellos, la acetohidroxiácido sintasa, la aminotransferasa de cadena ramificada, la dihidroxiácido deshidratasa, la isopropilmalato deshidrogenasa, la isopropilmalato isomerasa, la isopropilmalato sintasa, la cetoácido-reducto isomerasa y la treonina deaminasa; tablas 15 y 16 del anexo). Sin embargo, un transportador general de aminoácidos neutros y ácidos (SGN-U574120) y un gen codificante para una prolina oxidasa (SGN-U578070) resultaron aumentado y disminuido, respectivamente, y podrían explicar parcialmente los cambios en los niveles de aminoácidos. No obstante, Virilouvet *et al.* (2011) encontraron que los cambios en los niveles de las enzimas de biosíntesis de aminoácidos en plantas de maíz que sobreexpresan ASR1 eran a nivel del contenido de las proteínas y sugieren que ese efecto proviene de la actividad tipo chaperona de ASR1.

Al igual que en tabaco, papa y maíz, los resultados de esta Tesis muestran que ASR1 está involucrado en el metabolismo de varios aminoácidos en tomate. En aquellas especies, donde además se observaron alteraciones en los contenidos de azúcares, se sugirió que las alteraciones observadas en los aminoácidos eran secundarias a las alteraciones en los contenidos de azúcares. Sin embargo, los resultados de esta Tesis sugieren que en frutos de tomate la alteración de los niveles de aminoácidos es el principal efecto metabólico de ASR1. El efecto de ASR1 podría ser a nivel transcripcional pero no se pueden descartar efectos en otros niveles de regulación, por ejemplo, a nivel traduccional y postraduccional, principalmente al tener en cuenta el rol de chaperona de esta proteína, demostrado *in vitro* (Konrad y Bar-Zvi, 2008). No obstante, las vías regulatorias donde actúa ASR1 parecen ser complejas y altamente dependientes de las condiciones ambientales y de la

presencia de otras proteínas regulatorias. ASR1 podría estar involucrado en la determinación del aroma y de la resistencia a estrés en los frutos a través de su efecto sobre el metabolismo de aminoácidos.

3.3.3. *Asr1* media la regulación de genes de respuesta a estreses en los frutos de tomate

Durante el desarrollo y la maduración de los frutos se expresan un número importante de genes relacionados con estreses abióticos, lo cual indicaría que poseen una función fisiológica importante (Srivastava *et al.*, 2010; Fujisawa *et al.*, 2012; Leng *et al.*, 2014). El patrón de expresión de estos genes es complejo y depende de la fase del desarrollo y maduración del fruto (Srivastava *et al.*, 2010; Zegzouti *et al.*, 1999). Por ejemplo, el gen *hsp70* (*heat shock protein 70*) es inhibido durante la maduración del fruto por el etileno mientras que el gen que codifica para una catalasa es inducido por la misma hormona (Zegzouti *et al.*, 1999). En el caso de las plantas AS 35S::*Asr1* los genes que mostraron alteraciones en el ARNm pertenecen a distintas vías de respuesta a estrés abiótico y en su mayoría se encontraron sobreexpresados. Esto sugiere que ASR1 tiene un rol represivo sobre la expresión de estos genes en los frutos, a diferencia de lo observado en otros tejidos y especies. Por otro lado, Sanchez-Bel *et al.* (2012) informaron que los niveles de ASR1 disminuyen en frutos de tomate bajo estrés por frío. Esta observación sugiere que ASR1 no favorecería los mecanismos de tolerancia a estrés en frutos. *Cbf4* (*c-repeat-binding factor 4*), un factor de transcripción involucrado en estrés por sequía (Haake *et al.*, 2002), aumentó en las líneas silenciadas. Los niveles del ARNm de *Nadp or* (*NADP-dependent oxidoreductase*) y *Gstu8* (*Glutathione S-transferase 8*) mostraron un aumento y disminución, respectivamente. Estas dos proteínas son componentes de la cascada de respuestas a estrés oxidativo (Babiychuk *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 2002). *Cbf3* (*c-repeat-binding factor 3*) es un factor de transcripción relacionado con daño mecánico (Zhang *et al.*, 2004) y también mostró niveles de ARNm disminuidos en las líneas AS 35S::*Asr1*. Se encontraron asimismo genes involucrados en estrés salino cuyos niveles estuvieron aumentados en las líneas transgénicas, tales como *Knat3* (*Knotted1-like homeobox gene 3*) y *Atb2* (oxidoreductasa) (Liu *et al.*, 2013; Sarry *et al.*, 2006; Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2008). En relación con este tipo de estrés, plantas de tabaco que sobreexpresan *Asr1* mostraron incrementos en los ARNm de genes relacionados a respuestas a estrés salino en las hojas (Kalifa *et al.*, 2004b). Dos de estos genes, una peroxidasa (SGN-U579493) y *Cab21* (*chlorophyll a/b binding protein 21*; SGN-U580356), se encontraron aumentados en el análisis de microarreglos de los frutos de las plantas silenciadas (tabla 21). Estos datos sugieren que ASR1 reprime en frutos de tomate las mismas vías que activa en hojas de tabaco. Por otro lado, la diversidad de genes analizados en ese trabajo refleja que el rol de ASR1 en tabacos también involucra muchas vías distintas (Kalifa *et al.*, 2004b). Sin

embargo, en los frutos de las líneas silenciadas de tomate no se hallaron alterados los niveles de acuaporinas, que recientemente se describieron como blancos directos de ASR1 en hojas de tomate (Ricardi *et al.*, 2014). A pesar del rol represivo que ASR1 parecería cumplir en los frutos de tomate, el rol de ASR1 en tejidos vegetativos de tomate tendría la misma función en estrés que en otras especies. De hecho, la respuesta de *Asr1* al estrés y al ácido abscísico siempre fue observada en tejidos vegetativos (Iusem *et al.* 1993; Amitai-Zeigersona *et al.*, 1995; Maskin *et al.*, 2001). En este sentido, las mismas plantas analizadas en esta Tesis fueron desafiadas a restricciones de disponibilidad de agua (Golan *et al.*, datos no publicados; figura 3.1). Tanto las plantas AS como los controles sin transformar presentaron una tasa de supervivencia cercana al 25%. En tanto que en las plantas sobreexpresantes ese parámetro se incrementó a valores mayores al 65%. Estos resultados están en relación con la literatura que indica que *Asr1* aumenta la tolerancia de las plantas frente a condiciones de estrés (Kalifa *et al.*, 2004b; Virilouvet *et al.* 2011; Joo *et al.*, 2013). Dado el rol dual propuesto para ASR1 (factor de transcripción y proteína tipo chaperona), se podría especular con que el mecanismo a través del cual las plantas sobreexpresantes aumentan la tolerancia a estrés por sequía no sólo se deba a regulaciones a nivel transcripcional sino también por el aumento de la actividad de ASR1 como proteína tipo chaperona (Konrad y Bar-Zvi, 2008).

En las líneas silenciadas también se encontraron alterados genes de respuestas a patógenos como *Lrr*, *Pr3* y *Pr4* (Navarro *et al.*, 2004; Hamamouch *et al.*, 2011; Bertini *et al.*, 2009). La mayoría de esos genes mostraron aumentos en los niveles del ARNm. Al igual que ocurrió con los genes de respuesta a estrés abiótico, ASR1 parecería reprimir los genes de respuesta a estrés biótico en términos generales. Es un hecho conocido que los frutos maduros son más susceptibles a las enfermedades y la descomposición que los frutos inmaduros (Cantu *et al.*, 2008; Cantu *et al.*, 2009). En condiciones naturales, la degradación del pericarpio, facilitada por microorganismos, facilita la dispersión de las semillas maduras. El hecho de que en las plantas AS 35S::*Asr1* se hayan encontrado alteraciones en los niveles del ARNm de genes de respuesta a patógenos permite postular que ASR1 interviene en la maduración de los frutos aumentando su susceptibilidad y favoreciendo la dispersión de las semillas, una función distinta de lo que se postula para *Asr1* en tejidos vegetativos.

ASR1 cumpliría un rol represivo en el control de las vías de respuesta a estreses abióticos y bióticos en los frutos. Sin embargo, la información sobre los niveles de estos genes en las líneas silenciadas puede no ser suficiente para predecir el efecto sobre los frutos dada la complejidad de la respuesta frente a condiciones de estrés. De hecho el aumento en la

tolerancia al estrés por sequía en las plantas *S 35S::Asr1* (figura 3.1) sugiere que en tejidos vegetativos de tomate la función de *Asr1* es similar a la observada en otras especies.

3.3.4. ASR1 está involucrado en la vía de las citoquininas mediada por LRR1 y en la vía del metabolismo de la pared celular mediada por KAP-2 en los frutos de tomate

El estudio de la sobrerrepresentación de motivos regulatorios en *cis* (CRE) en los genes con niveles alterados en las plantas silenciadas (tabla 3.4) permitió generar hipótesis acerca de las vías en las cuales está involucrado ASR1. Uno de los CRE analizados en detalle fue el motivo H-box (tabla 3.4), al cual se une el complejo KAP-2 (Lindsay *et al.*, 2002). KAP-2 está formado por dos subunidades, KU70 y KU80 (Lindsay *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 1993). Los niveles del ARNm de *ku70* están alterados en las líneas silenciadas (figura 3.20). KU70 y KU80 tienen capacidad de unirse al ADN y están involucrados en la reparación del ADN durante la fase G del ciclo celular (Riha *et al.*, 2002). En mamíferos, además forman parte de un complejo con actividad de factor de transcripción (Willis *et al.*, 2002). En plantas la función no está definida completamente pero se ha visto que plantas de *Arabidopsis* con déficit en KU70 son hipersensibles al tratamiento con irradiación, aunque en condiciones estándares de crecimiento no muestran alteraciones evidentes (Riha *et al.*, 2002). Se validaron varios genes con el motivo H-box en sus regiones regulatorias, todos relacionados con la pared celular: *cnd70*, *expansin A3*, *expansin A15* y *PI8* (figura 3.20C). *Expansin A15* y *Expansin A3* son expansinas con actividad de endoglucanasa (Wieczorek *et al.*, 2006) que participan en el metabolismo de la pared celular. *Cnd70* es una proteína de apoplasto que actúa como endopeptidasa, aunque de función fisiológica desconocida (Beers *et al.*, 2004). *PI8* es una enzima involucrada en la despolimerización de la pared celular (Sun y van Nocker, 2010). Ninguno de los genes validados con el motivo H-box se agruparon en la misma neurona en el análisis de redes (tabla 21 del anexo). Esto sugiere que están siendo regulados asimismo por otros factores en las líneas silenciadas. En Ricardi *et al.* (2014) se ha establecido que una de las categorías de genes sobrerrepresentada a las cuales se une ASR1 es la del metabolismo de la pared celular y que el gen glucan endo-1,3- β -glucosidase 1, asociado a la pared celular, está directamente regulado por ASR1. Por otro lado, la chalcona sintasa es regulada por KAP-2 en el poroto, pero además requiere otros factores de transcripción (Loake *et al.*, 1996), lo que podría ser la causa por la cual sus niveles no están alterados en los frutos (tabla 18 del anexo). En este trabajo se propone una vía a partir de la cual ASR1 regularía genes relacionados con la pared celular. Esta modulación estaría dada por la regulación directa de ASR1 sobre *Ku70* (figura 3.20). En el caso del fruto del tomate, la textura del fruto refleja al menos en parte la constitución de la pared celular (Seymour *et al.*, 2002). En este caso, no hubo diferencias en la textura de los frutos silenciados, lo cual

se podría deber a que existen otros genes con función redundante, un fenómeno que se ha comprobado en los genes relacionados con el metabolismo de la pared celular del fruto (McAtee *et al.*, 2013) o porque la magnitud de los cambios en la pared no es suficiente como para alterar el fenotipo de textura (figura 3.20E).

El otro motivo analizado con mayor profundidad fue el motivo de unión de ARR1, sobrerrepresentado en los genes con niveles de ARNm disminuidos en las líneas silenciadas. Esta proteína es un factor de transcripción que activa la expresión de genes primarios de la vía de las citoquininas (Taniguchi *et al.*, 2007; Ross *et al.*, 2004; Sakai *et al.*, 2000). Las histonas *hta6* (*Histone H2A.1*) e *histone3*, componentes mayoritarias de la cromatina e involucradas en la regulación transcripcional (Okada *et al.*, 2005; Yi *et al.*, 2006), no sólo tienen este motivo, sino que los niveles de sus ARNm resultaron aumentados en las líneas silenciadas durante el experimento III (figura 3.21). Esta observación permite relacionar a estas dos histonas con la vía de las citoquininas en frutos de tomate. El conocimiento actual de la relación de la vía de las citoquininas y las histonas no es muy profundo pero algunos trabajos señalan que existiría una relación en algunos niveles de regulación. La citoquinina oxidasa CK2, que afecta la señalización de las citoquininas y promueve el crecimiento del endosperma de *Arabidopsis*, es afectada por la metilación de la histona H3 (Li *et al.*, 2013). Furuta *et al.* (2011) encontraron que el remodelado de la cromatina y la desacetilación de las histonas está íntimamente relacionado con el crecimiento inducido por citoquininas en callos de *Arabidopsis*. Por otro lado, los niveles del ARNm de *histone3* y *hta6* mostraron disminuciones en el experimento I (microarreglos, tabla 15 del anexo), mientras que el resto de los genes medidos por *qPCR* que presentaban este motivo no resultaron estadísticamente alterados en el experimento III (figura 3.21 y tabla 18 del anexo), aunque lo estaban en el experimento I (microarreglos, tabla 15 del anexo). Esto indicaría que la modulación de la expresión de los genes con este motivo en estas líneas estaría regulada fuertemente por otros factores además de ARR1. Un modelo sencillo surge de estos datos, donde *histone3* y *hta6* serían directamente regulados por ARR1 y este sería regulado por otros factores. Estos factores tendrían relación con ASR1 y en conjunto responderían a cambios ambientales sutiles (figura 3.21). La modulación por ASR1 podría darse a nivel de la generación de la señal para activar a los receptores de citoquininas, a nivel de los receptores o a nivel de las proteínas transductoras de la señal. Por ejemplo, los niveles de *Ahp1* (*HISTIDINE-CONTAINING PHOSPHOTRANSMITTER 3*; SGN-U574117), que es un regulador positivo de la vía de señalización de las citoquininas (Kieber y Schaller, 2014), resultaron disminuidos en los análisis de microarreglos (tabla 15 del anexo). Las citoquininas están involucradas a nivel fisiológico en la división celular durante el desarrollo del fruto del tomate (Matsuo *et al.*, 2012). Las líneas silenciadas mostraron menor peso total de frutos maduros y menor

número de frutos maduros por planta en el experimento I, lo cual podría estar asociado a alteraciones en el metabolismo o contenido de estas hormonas. Más aun, este fenotipo no se observó en el experimento III, donde los niveles de ARR1 estaban aumentados (figura 3.21). Además, algunos genes relacionados con la vía de las citoquininas mostraron alteraciones en los análisis de microarreglos (tablas 15 y 16 del anexo). Por ejemplo, los niveles del ARNm del mencionado *Ahp1* (*HISTIDINE-CONTAINING PHOSPHOTRANSMITTER 3*; SGN-U574117), que es un regulador positivo de la vía de señalización de las citoquininas, estaban disminuidos en los microarreglos mientras que otros genes involucrados en la transducción de señales de la vía de las citoquininas estaban aumentados tales como *Cdk1* (*CELL DIVISION CONTROL 2*; SGN-U572518; Brenner y Schmülling, 2012), *Cycd3;2* (*CYCLIN D3;2*; SGN-U581093; Dewitte *et al.*, 2007) y *Knat3* (*KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN GENE 3*; SGN-U571927), siendo este último un factor de transcripción también involucrado en estrés (Truernit *et al.*, 2006) y validado en un experimento independiente (figura 3.15). La función de las citoquininas durante la maduración del fruto no está clara pero las mutantes *rin* de tomate, que no maduran, tienen altos niveles de auxinas y citoquininas y en frutos de naranja y uva se observa una disminución de los niveles de estas hormonas antes de la maduración (McAtee *et al.*, 2013). Si bien se ha determinado que *Asr1* participa en las vías de las hormonas ABA y giberelinas (Amitai-Zeigersona *et al.*, 1995; Maskin *et al.*, 2001; Joo *et al.* 2013; capítulo 2 de esta Tesis), no hay información acerca de su participación en otras vías hormonales. A la luz de los resultados aquí descritos, podría proponerse entonces que *Asr1* participaría en la maduración del fruto a través de la vía de las citoquininas modulando los niveles de ARR1 y que este modularía, a su vez, la expresión de histonas entre otros genes. En estos frutos, el contenido de azúcares y la textura (tabla 3 del anexo y figura 3.20) indicarían que no existen alteraciones fenotípicas en la maduración y que habría otras vías compensadoras.

Estos modelos proponen dos vías a partir de las cuales ASR1 participaría en la maduración de los frutos a través de su efecto sobre factores de transcripción relacionados con el ciclo celular. Por un lado, en relación con la vía de las citoquininas a través de ARR1 y por otro lado en relación con genes de la pared celular a través de KU70. No obstante, no se observaron fenotipos evidentes en los frutos de las plantas transgénicas aquí analizadas. Esto podría deberse a la existencia de vías alternativas que compensen el déficit de ASR1. Incluso es posible que otro parálogo de la familia *Asr* supla parcialmente la función de *Asr1*, dado que todos se expresan en frutos maduros (Golan *et al.*, datos no publicados). En relación con la participación de ASR1 en el ciclo celular y la replicación de ADN se encontraron otros dos genes involucrados con esas funciones celulares que estaban estadísticamente alterados en una línea en el experimento III, *Prl* (*prolifera*) y *tubulina8*.

Prl (SGN-U573875) está involucrado en el inicio de la replicación del ADN y se localiza en el núcleo durante las fases G1, S y G2 del ciclo celular (Springer *et al.*, 2000). *Tubulina8* (SGN-U564009) está involucrada en la organización del citoesqueleto y movimiento basado en los microtúbulos (Snustad *et al.*, 1992). Estos datos, además de apoyar la hipótesis enunciada previamente, indican que ASR1 estaría involucrado en el ciclo celular a través de varios mecanismos distintos.

Durante el análisis de los motivos sobrerrepresentados surgieron otros CREs que podrían permitir explicar otras vías en las cuales interviene ASR1 (tabla 3.4). Entre ellos la mayoría fueron motivos relacionados con el metabolismo, tales como el motivo 6 de unión del factor de transcripción *Asf-2* (*activating sequence factor-2*) que regula genes de la fotosíntesis (Rubio-Somoza *et al.*, 2006) y/o de PHR (*phosphate starvation response 1*) que regula genes del metabolismo de fosfato (Schunmann *et al.*, 2004), el motivo 7 de unión del factor de transcripción *Dof* (*DNA-binding with one finger*) que regula genes involucrados en el metabolismo del carbono en maíz (Yanagisawa, 2000) y el motivo 8 que fue encontrado en la región regulatoria de la fosfoenolpiruvato carboxilasa en *Flaveria trinervia* (Gowik *et al.*, 2004). Si bien los niveles del factor de transcripción *Asf-2* no variaron significativamente (tabla 18 del anexo), su blanco *Cab* (*chlorophyll a/b binding protein*; Lam y Chua, 1989; Solyc02g070950) estuvo aumentado en la línea AS5 de manera estadísticamente significativa en un experimento independiente al de los microarreglos (tabla 18 del anexo y figura 3.19), lo cual sugiere que ASR1 estaría relacionado en su modulación. Además, de manera independiente a estas vías se encontraron otros genes relacionados con el metabolismo que estaban alterados de manera significativa en el experimento III, *Bgal1* (*beta-galactosidase*; SGN-U578846) y *Fadb* (*fatty acid desaturase*; SGN-U569117) (tabla 18 del anexo y figura 3.19), siendo *Bgal1* una galactosidasa y *fadb* una enzima involucrada en la síntesis de ácidos grasos. Estos datos sugieren que existen otras vías metabólicas en las cuales interviene ASR1, que involucrarían al metabolismo del carbono, del fosfato y de los ácidos grasos.

3.3.5. ASR1 media la regulación del metabolismo de nucleótidos

Con el objetivo de conocer las relaciones entre transcritos y metabolitos se realizaron distintos análisis de integración de datos. Utilizando la clasificación y visualización que ofrece el programa Mapman (Thimm *et al.*, 2004) se observó que un gen que codifica una celulosa sintasa (Solyc07g043390.2.1) y la 4-hidroxiprolina pertenecen a la vía de la pared celular (figura 3.22). Esto está en línea con lo informado por Ricardi *et al.* (2014) a través de un análisis de CHIP, donde establecieron que uno de los genes a los cuales se une ASR1 es una celulosa sintasa (Solyc08g082650.2.1). Esto reafirma la relación de ASR1 con el metabolismo de pared celular discutida previamente. La celulosa sintasa genera celulosa a

partir de UDP-glucosa. La matriz de la pared celular está formada por glucósidos de hidroxiprolina (Taylor *et al.*, 2011). En el análisis de redes neuronales la celulosa sintasa y la hidroxiprolina se agruparon en neuronas vecinas (tabla 21 del anexo), lo cual sugiere que sus niveles podrían tener un cierto grado de correulación mediado de alguna manera por ASR1. En raíces de cebada se observó que frente a condiciones de estrés salino aumentan los niveles de prolina y de hidroxiprolina en la pared celular y que esto está en relación con un aumento en la expresión de genes de metabolismo de la pared celular, incluyendo una celulosa sintasa (Ueda *et al.*, 2007). La disminución de los niveles de ASR1 en las plantas silenciadas lleva a un aumento de la celulosa sintasa y de la 4-hidroxiprolina. Esto sugiere, nuevamente, una función represora de ASR1. Dado que el mantenimiento de la pared celular es esencial para enfrentar situaciones de estrés (Zagorchev *et al.*, 2014), los frutos de las plantas silenciadas serían menos tolerantes a estrés, lo que está en línea con el aumento en la expresión de genes de respuesta a estrés biótico y abiótico en las líneas silenciadas descrito previamente. Sin embargo, otros genes asociados a la pared celular mencionados con anterioridad tales como la expansina A15 y la expansina A3 están aumentados en las líneas silenciadas y producen el efecto opuesto, es decir, ablandamiento de la pared celular. Es decir que ASR1 reprime en frutos la expresión de genes de pared celular, algunos de los cuales favorecen la síntesis de pared (celulosa sintasa) y otros la degradación de la misma (expansina A3 y A15). Esto podría ser otras de las causas por las cuales no se observó diferencias en la textura de los frutos de las plantas silenciadas.

Por otro lado, la beta-alanina y el gen *Dut1* (*Dutp-pyrophosphatase-like 1*) pertenecen a la vía de los nucleótidos (figura 3.22). En las plantas silenciadas se observó que la beta-alanina se encuentra aumentada y los niveles del ARNm de *Dut1* disminuidos. De hecho, se agruparon en la misma neurona en el análisis de redes de manera inversa (tabla 21 del anexo). Es decir, existiría una correulación inversa entre ellos a través de una vía en la cual participa ASR1. DUT1 pertenece a la familia de las deoxiuridina-5'-trifosfatohidrolasas y es esencial para evitar la incorporación de uracilos en la replicación del ADN (hidroliza el dUTP a dUMP) (Dubois *et al.*, 2010). Su silenciamiento en arábidopsis genera un aumento de la recombinación homóloga como medida protectora frente a la inestabilidad del ADN (Dubois *et al.*, 2010). La beta-alanina forma parte de la vía de síntesis de nucleótidos: la degradación de uracilo y timina generan beta-alanina, CO₂, NH₃ y gamma-aminoisobutirato (Coxon *et al.*, 2005). También participa en la síntesis del pantotenato (vitamina B5), que a su vez interviene en la síntesis de CoA (Coxon *et al.*, 2005). Una hipótesis plausible es que ASR1 aumente los niveles de expresión de *Dut1*, lo cual favorecería la replicación del ADN a través de la disminución de dUTP y el aumento de la síntesis de dTTP (Dubois *et al.*, 2010), y como consecuencia disminuya la

acumulación de la beta-alanina, cuya síntesis requiere uracilos. La disminución de beta-alanina llevaría a una disminución del pantotenato y del CoA. El CoA y el acetilCoA están asociados a un aumento del crecimiento vegetativo y reproductivo además de aumentar la resistencia a estrés osmótico y salino (Rubio *et al.*, 2008), con lo cual ASR1 al disminuir la beta-alanina aumentaría la susceptibilidad al estrés en los frutos (a diferencia de lo que ocurre en las hojas). Por otro lado, en la línea AS5 el gen *Tso2* (*ribonucleotide reductase small subunit*), que forma parte del complejo ribonucleótido reductasa que cataliza uno de los pasos de la producción de deoxirribonucleótidos necesarios para la replicación y reparación del ADN (Wang y Liu, 2006), está disminuido. En la línea AS17 el gen *Tk1a* (*thymidine kinase 1a*), que forma parte de una vía de rescate de deoxirribonucleótidos (Clausen *et al.*, 2012), se encuentra aumentado. Ni *Tso2* ni *Tk1a* agruparon en las mismas neuronas que *Dut1* y beta-alanina, lo cual sugiere que no hay coregulación entre ellos (tabla 21 del anexo). ASR1 entonces estaría estimulando la transcripción de genes involucrados en la replicación del ADN durante la maduración del fruto y favoreciendo la síntesis *de novo* de deoxirribonucleótidos y desfavoreciendo la producción de beta-alanina.

Por otro lado los genes *Hta6* e *histone3* agruparon en la misma neurona que *Dut1* y beta-alanina (tabla 21 del anexo). Si bien no se encontraron motivos sobrerrepresentados en común entre estos genes (excepto entre *Hta6* e *histone3*), el hecho de que todos estén involucrados en la replicación del ADN sugiere que podrían formar parte de una vía común. Otros metabolitos que se agruparon en esta neurona y podrían estar involucrados en la misma vía son el ácido aspártico, la prolina, el ácido piroglutámico y la treonina.

3.4. CONCLUSIONES

Los niveles del ARNm de *Asr1* son inducidos en respuesta al tratamiento con ABA y bajo condiciones de estrés. Plantas de tomate que silencian *Asr1* mostraron alteraciones en los niveles de expresión de genes relacionados con vías de estrés biótico y abiótico en sus frutos. En general, el silenciamiento provocó un aumento en los niveles del ARNm de estos genes, lo cual sugiere que ASR1 reprime las respuestas a estrés en frutos. Esto podría tener un correlato con el aumento de la susceptibilidad a microorganismos durante la maduración del fruto para favorecer la dispersión de las semillas. Sin embargo, las plantas en fase vegetativa que sobreexpresan ASR1 mostraron un aumento a la tolerancia a estrés por sequía, lo cual sugiere que en tejidos vegetativos de tomate, *Asr1* media la tolerancia al estrés. Estos datos indican que ASR1 podría actuar tanto como regulador transcripcional positivo como negativo en las vías de estrés, lo cual dependería del tejido en el cual se expresa.

Además, se propusieron dos vías a partir de las cuales ASR1 participaría en la maduración de los frutos a través de su efecto sobre factores de transcripción relacionados con el ciclo celular. Por un lado, en relación con genes de la pared celular a través de KU70 y por otro lado en relación con la vía de las citoquininas a través de ARR1. A su vez, ASR1 actuaría reprimiendo genes del metabolismo de la pared celular, algunos de los cuales median su síntesis (celulosa sintasa) y otros favorecen su degradación (expansinas).

A nivel metabólico, los resultados obtenidos no favorecen la hipótesis de que ASR1 esté involucrado en el transporte de hexosas en tomate. Sin embargo, existe la posibilidad de que haya un efecto de redundancia génica que impida observar cambios en los niveles de hexosas así como también otras alteraciones fenotípicas en las plantas silenciadas. Por otro lado se observaron modificaciones significativas en los niveles de aminoácidos en las líneas transgénicas, lo cual representa el principal cambio metabólico en los frutos. Este hallazgo agrega una nueva dimensión al papel de ASR1 en la regulación de la fisiología del fruto de tomate.

Capítulo 4

Consideraciones finales

4.1. Antecedentes de estudios funcionales de ASR1 en plantas transgénicas

Este trabajo de Tesis se centró en el estudio funcional del factor de transcripción ASR1 en dos especies de Solanáceas, tabaco y tomate. Como se discute anteriormente, hasta la fecha solamente dos trabajos previos han abordado el análisis funcional de este gen utilizando plantas transgénicas en especies de *Solanaceae*. Por un lado, Kalifa *et al.* (2004b) observaron aumentos de la tolerancia a estrés salino en plántulas de tabaco por sobreexpresión de ASR1. Por otro lado, Frankel *et al.* (2007) probaron fisiológicamente la relación entre ASR1 y el contenido de hexosas en plantas de papa transgénicas que sobreexpresan constitutivamente ASR1 de tomate. Asimismo, existe otro trabajo que aborda el análisis funcional en plantas de maíz que sobreexpresan ASR1, en las cuales observaron cambios en los niveles de aminoácidos en las hojas y mejoras en la producción en condiciones de estrés por sequía (Virlovet *et al.*, 2011).

4.2. ASR1 está involucrado en el metabolismo de azúcares de manera diferencial de acuerdo a la especie y al tejido

Los estudios funcionales de ASR1 con plantas transgénicas de distintas especies con niveles alterados de esta proteína muestran que las alteraciones metabólicas observadas dependen no sólo de la especie sino también del tejido. Los niveles de ASR1 parece estar inversamente relacionados con los niveles de glucosa en hojas de tabaco (capítulo 2) y maíz (Virlovet *et al.*, 2011). En las plantas silenciadas de tabaco estudiadas en esta Tesis se observó que los niveles del ARNm del transportador de hexosas *Ht1* están disminuidos. Esto sugiere que ASR1 induce la expresión de *Ht1* en hojas y de esta manera regularía la captación de glucosa desde el apoplasto hacia las células acompañantes del floema. Por el contrario, en hojas de papa (Frankel *et al.*, 2007) y tomate (capítulo 3) no se observaron alteraciones en los niveles de glucosa. Esta aparente contradicción podría explicarse por la presencia de homólogos funcionales de ASR1. Más aun, otros parálogos de ASR1 se expresan en hojas de tomate, especialmente *Asr4* (Golan *et al.*, datos no publicados). Sin embargo, en tubérculos de papa se detectaron disminuciones y aumentos de glucosa en plantas sobreexpresantes y silenciadas, respectivamente (Frankel *et al.*, 2007). A nivel de los transportadores de hexosas en los tubérculos, *Ht1* está aumentado en una línea silenciada y otro transportador llamado *Ht2* está disminuido en las líneas sobreexpresantes. Esto sugiere que ASR1 reprime la expresión de transportadores de hexosas en tubérculos, a diferencia de lo observado en hojas. Es posible que la dualidad en el efecto de ASR1 sobre los transportadores de hexosas se deba a la capacidad de interacción de ASR1 con otros factores que regulan la expresión de genes. Estos resultados apuntan a que ASR1 podría tener efectos antagónicos a nivel del metabolismo de azúcares en tejidos destinos y tejidos fuentes. A diferencia de lo observado en papa, en

frutos de tomate no se observaron alteraciones en los niveles de glucosa y este hecho quizás también se deba a la presencia de homólogos funcionales de ASR1 (capítulo 3). Aunque *Asr1* es el parólogo que mayormente se expresa en frutos, *Asr2* y *Asr3/5* también tienen altos niveles de expresión en estos tejidos (Golan *et al.*, datos no publicados).

4.3. ASR1 está involucrado en el metabolismo de aminoácidos en distintas especies y tejidos

En esta Tesis se observó que las principales alteraciones metabólicas en frutos de tomates se produjeron en la vía de síntesis de aminoácidos (capítulo 3). Este resultado está en línea con lo observado en otras especies. Las plantas de maíz que sobreexpresan *Asr1* tienen niveles disminuidos de varios aminoácidos en las hojas (Virilouvet *et al.*, 2011). En ese trabajo encontraron que los niveles proteicos de algunas de las enzimas de la vía de síntesis de aminoácidos se hallan alterados pero no así sus niveles de transcriptos, lo cual sugiere que el mecanismo de acción de ASR1 sobre el metabolismo de aminoácidos en hojas de maíz podría ser a través de su función de proteína tipo chaperona. Asimismo, en las plantas de papa que sobreexpresan y silencian *Asr1* los niveles de distintos aminoácidos se encuentran también significativamente disminuidos en los tubérculos (Frankel *et al.*, 2007). No obstante, en las plantas transgénicas de tomates las alteraciones en los niveles de aminoácidos resultaron altamente dependientes de los experimentos en los cuales se midieron (capítulo 3). No fue evidente que las diferencias en las líneas de tomate con distintos promotores se deban a una alteración en el transporte de los aminoácidos y/o a una retroalimentación en la regulación entre los frutos y las hojas, dado que no existen alteraciones en las hojas que lo sugieran. Sin embargo, otros tejidos como las raíces influyen fuertemente en el metabolismo de los aminoácidos y podrían ejercer un efecto en los niveles de aminoácidos de los frutos. El mecanismo de la alteración de los aminoácidos en las líneas transgénicas de tomate podría ser una combinación del efecto de ASR1 sobre la expresión de genes tales como la del transportador general de aminoácidos y la función de ASR1 como proteína tipo chaperona. Además, existe una modulación ejercida por el ambiente que afectaría la expresión de otros genes que intervienen en las mismas vías. Por otro lado, en las hojas de las mismas plantas de tomate se observaron distintos patrones de metabolitos en los distintos experimentos, lo cual también refleja que los mecanismos donde opera ASR1 son altamente dependientes del ambiente.

4.4. ASR1 está involucrado en las vías de las hormonas ABA, giberelinas y citoquininas

La relación de *Asr1* con el ABA está descripta desde el inicio de los estudios sobre este gen y un alto número de trabajos dan cuenta del aumento de la transcripción de *Asr1* frente al

tratamiento con ABA en distintas especies (Amitai-Zeigersona *et al.*, 1995; Maskin *et al.*, 2001; Cakir *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2011; Joo *et al.*, 2013). En este trabajo de Tesis se pudo establecer que en las plantas de tabaco silenciadas los niveles de giberelinas y ABA están alterados. Además, los niveles de ASR1 aumentan frente al tratamiento con GA3 en hojas de tabaco. Dadas las alteraciones en los niveles de glucosa en las hojas de las líneas silenciadas, se confirmó que ASR1 es un factor de transcripción involucrado en la vía de señalización de azúcares y hormonas y que esta vía es específica de las hojas de tabaco. Además, se encontraron alteraciones en los niveles del ARNm de la hexoquinasa 1 y *SnRk1.1*, lo cual sugiere que son las moléculas señales que participan en la interface de las vías de señalización de los azúcares y las hormonas en esas plantas. A su vez, en los frutos de las líneas silenciadas de tomate se encontraron alterados los niveles del ARNm del factor de transcripción ARR1, que activa genes primarios de la vía de las citoquininas. Igualmente, dos histonas cuyos niveles de expresión están alterados en las líneas silenciadas portan el motivo de unión de ARR1 en sus regiones regulatorias, lo cual sugiere que son sus blancos directos. De esta manera, se confirmó la relación de *Asr1* con las vías hormonales, que no sólo incluiría al ABA sino también a las giberelinas y las citoquininas y se logró diseñar un modelo del mecanismo de acción de ASR1 sobre la vía de las citoquininas a través de ARR1.

4.5. ASR1 media vías de estreses generales y de maduración de los frutos

Los datos presentados en esta Tesis respecto de la regulación a nivel del ARNm en frutos de tomate también indican que la función de ASR1 difiere en los distintos tejidos. La mayoría de los genes validados en frutos de tomate pertenecen a distintas vías de respuesta frente a distintos tipos de estreses y se encontraron aumentados en los frutos de las líneas silenciadas. Esto sugiere que ASR1 reprime a los genes de respuesta a estrés en frutos. Este efecto represivo en frutos es contrario a lo que ocurre en hojas tanto de tomate como de tabaco, en los cuales ASR1 favorece la expresión de genes de respuesta a estrés (Ricardi *et al.*, 2014; Kalifa *et al.*, 2004b). Más aun, algunos genes asociados a estrés como peroxidasa y *Cab21* (*chlorophyll a/b binding protein 21*) se encuentran aumentados en hojas de plantas de tabaco que sobreexpresan *Asr1* (Kalifa *et al.*, 2004b) y a su vez su expresión está aumentada en los frutos de los tomates silenciados (capítulo 3). Es decir que ASR1 tendría un rol dual en cuanto al control de la transcripción de genes asociados a estrés, que dependería del tejido. Por otro lado, las plantas de tomate que sobreexpresan *Asr1* bajo el promotor 35S muestran un aumento de la tolerancia a estrés por sequía (Golan *et al.*, datos no publicados), lo cual sugiere que ASR1 en plantas de tomate en fase vegetativa aumenta la tolerancia a estrés tal como fue descrito en tabaco (Kalifa *et al.*, 2004b). Además, ASR1 facilitaría la dispersión de las semillas en los frutos maduros

mediante la represión de los genes de tolerancia a estrés biótico, lo cual favorece el ataque por microorganismos y la subsecuente facilitación de la dispersión. Sin embargo, ASR1 también estaría involucrado en la maduración de los frutos a través de otros mecanismos. Mediante el análisis de los motivos sobrerrepresentados en los genes alterados de los frutos se propone un modelo en el cual ASR1 regularía la transcripción de *Ku70*, que formaría parte de un complejo transcripcional que regularía la expresión de genes de la pared celular en los frutos. Asimismo, se encontraron otras evidencias de la participación de ASR1 en el metabolismo de la pared celular ya que la 4-hidroxiprolina y la celulosa sintasa se encontraron alteradas en los frutos de las líneas 35S::AS. Finalmente, también se hallaron evidencias que ASR1 participaría en el metabolismo de nucleótidos a través de *Dut1* y la beta-alanina.

4.6. Conclusiones finales

En este trabajo de Tesis se estudió el rol funcional de la proteína ASR1 en plantas de tabaco y tomate. La hipótesis del trabajo fue que las proteínas ASR son parte de un complejo de regulación transcripcional que controla la expresión de transportadores de azúcares y consecuentemente el tráfico de asimilados en aquellos tejidos donde se expresan y cuyas señales son los azúcares y el ABA. El estudio de ASR1 en tabaco permitió rechazar la hipótesis nula planteada. Además, se identificaron a la hexoquinasa 1 y a SnRK1 como los probables mediadores en la interface de las vías de señalización de los azúcares y las hormonas en esas plantas. Más aun, se pudo establecer que ASR1 no sólo está involucrado en la vía del ABA sino que también está involucrado en la vía de las giberelinas en hojas de tabaco. Contrariamente, el estudio de ASR1 en tomate no permitió rechazar la hipótesis nula planteada. Sin embargo, el estudio del transcriptoma y el metaboloma de plantas de tomate transgénicas permitieron generar nuevas hipótesis acerca de la función de ASR1. De esta manera, se propone que ASR1 en frutos de tomate tiene un rol antagónico al que ejerce en las hojas a nivel del control de la expresión de genes de respuesta a estrés. Además, ASR1 estaría involucrado en la maduración del fruto a través del control de la expresión de genes de estrés biótico, de genes del metabolismo de la pared celular y de su relación con la vía de las citoquininas. Por otro lado, el estudio metabólico de las plantas transgénicas sugirió que ASR1 está asociado al metabolismo de aminoácidos en frutos de tomate. Esta relación es atractiva desde un punto de vista biotecnológico dado que los niveles de aminoácidos impactan en el metabolismo secundario de los frutos, incluyendo a aquellos compuestos que aportan al aroma.

Capítulo 5

Materiales y métodos

Para mejor claridad, los Materiales y Métodos empleados en esta Tesis se describen en el mismo orden en el que se presentan los Resultados.

5.1. Condiciones de cultivo y crecimiento de las plantas de tabaco

Para cada experimento llevado a cabo se crecieron entre 6 y 10 réplicas biológicas de cada genotipo en un invernáculo en condiciones controladas (80% de humedad relativa, 200 mmol PAR s⁻¹m⁻², 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad). Las plantas se crecieron en macetas de 8 litros con sustrato (50% turba, 30% pino, 10% tierra, 10% perlita) y se fertilizaron con 20 ml de Hakaphos® (1,4 g/l) 3 veces por semana. Se rociaron con pesticidas cada 15 días (Penconazole: 1,5 ml/l; Triadimefon: 1 g/l; Pyriprofixen: 2 ml/l).

5.2. Selección de las plantas transgénicas de tabaco

Se obtuvieron plantas homocigotas de tabaco de una línea silenciada (AS2) y de una línea sobreexpresante (S22) a través de sucesivas autofecundaciones: se cubrieron las flores para que se produjese la autofecundación, se colectaron las semillas, se germinaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con kanamicina 200 mg/l, las plantas resistentes se trasladaron al invernáculo hasta la floración y los pasos se repitieron hasta la generación T4 homocigota. De cada una de las líneas se obtuvieron dos sublíneas, es decir plantas T4 de la misma línea pero provenientes de distintas semillas T1, llamadas AS2-2 y AS2-4 a las silenciadas y S22-2 y S22-3 a las sobreexpresantes. Las semillas obtenidas fueron almacenadas en una cámara a 10°C y 30% de humedad relativa. Se corroboró el silenciamiento y la sobreexpresión de *Asr1* en la generación T4 a través de PCR cuantitativas, empleando oligonucleótidos específicos para *Asr1* (tabla 22 del anexo). Los oligonucleótidos empleados para la detección de *Asr1* fueron diseñados sobre la secuencia del ARNm de tomate. El gen de referencia empleado fue el *factor de elongación 1 alfa (EF-1- α)*, diseñado sobre la secuencia del ARNm de papa (tabla 22 del anexo y punto 5.7). Para la realización de las PCR cuantitativas se realizó una extracción de ARN total a partir de 100 mg de tejido foliar congelado y molido (punto 5.3), luego la síntesis del ADN copia (punto 5.4) y la PCR cuantitativa propiamente dicha (punto 5.6). En este caso las PCR cuantitativas se realizaron con una mezcla de reacción comercial de QIAGEN.

5.3. Extracción del ARN total

El ARN total fue extraído con Trizol® (Gibco) a partir de un protocolo basado en las especificaciones del fabricante. En el caso de hojas de tabaco o tomate se partió de 100 mg de tejido congelado y molido. En el caso de frutos de tomate se partió de 200 mg de tejido congelado y molido. Se homogeneizó el tejido con 1 ml de Trizol. Se incubó la

muestra 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de una centrifugación a 12000 rpm durante 10 segundos, se recuperó el sobrenadante y se agregaron 200 μ l de cloroformo, se agitó con vórtex durante 15 segundos y se dejó reposar unos minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 15 minutos a 2-8°C a 12000 rpm. Se recuperó la fase acuosa superior y se repitió la extracción con cloroformo. Se agregó 600 μ l de isopropanol y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 10 minutos a 2-8°C a 12000 rpm. Se removió el sobrenadante y se lavó el *pellet* dos veces con etanol 80% a 4°C. Se secó bajo campana y se resuspendió en agua por incubación durante 10 minutos a 55-60°C. La cantidad y calidad del ARN extraído se midieron en un espectrofotómetro *nano-drop*, que permite evaluar las relaciones de absorbancias de las muestras a 260 nm/280 nm (entre 1,8 y 2,1) y a 260 nm/230 nm (mayor a 2). Si las muestras no poseían la cantidad y/o la calidad necesarias se precipitaron con CLi 2,5M. Para ello, se agregó 1/3 del volumen de CLi y se dejó reposar a -80°C toda la noche. Se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos y se lavó el precipitado con etanol 80 % por lo menos dos veces y se dejó secar bajo campana. Finalmente para evaluar la integridad del ARN se corrieron geles de agarosa 2%-TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1mM), en los cuales se sembraron 1 μ g del ARN total de cada muestra empleando un *loading buffer* comercial (Gel Loading Buffer II; Invitrogen).

5.4. Síntesis del ADN copia

Se emplearon 1 μ g de ARN total por muestra para la síntesis del ADN copia. Previamente, el ARN fue tratado con DNase I (Invitrogen) para evitar las contaminaciones con ADN que pudiesen contener las muestras. A 1 μ g de ARN se le adicionó 1 μ l del buffer de reacción (10X) de la enzima DNaseI, 1 U de DnaseI (Invitrogen) y agua hasta 10 μ l finales. Se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y se inactivó la DnaseI con 1 μ l de EDTA 25 mM e incubando 10 minutos a 65°C. Para verificar que efectivamente no existían trazas de ADN se realizó una PCR a tiempo final (punto 5.5) con oligonucleótidos que amplifican al gen de actina (tabla 22 del anexo) diseñados sobre dos exones de manera tal de poder distinguir los productos de distinta masa molecular según incluyesen el intrón intermedio o no. La síntesis del ADN copia se realizó con la enzima M-MLV (Invitrogen). Al ARN tratado con DNaseI se le agregó 50 ng de oligonucleótidos diseñados al azar (Invitrogen), 1 μ l de una mezcla de nucleótidos 10 mM y agua hasta 12 μ l. Luego se incubó a 65°C durante 5 minutos y se colocó en hielo. Se agregaron 4 μ l del buffer *First Strand* 5X (Invitrogen), 2 μ l de DTT 0,1 M y 1 μ l de RNase OUT (Invitrogen). Se mezcló y se incubó a 37°C durante 2 minutos. Se agregó 1 μ l de M-MVL y se incubó 10 minutos a 25°C. Finalmente se incubó 50 minutos a 37°C y se inactivó la reacción a 70°C durante 15 minutos.

5.5. PCR a tiempo final

Todas las mezclas de reacción para PCR a tiempo final se realizaron empleando el siguiente protocolo básico: 2 μ l de buffer de reacción 10X, 0,4 μ l de mezcla de dNTP (10 mM cada uno), 0,6 μ l de CIMg (50 mM), 0,2 μ l de Taq polimerasa (5 U/ μ l), oligonucleótidos a la concentración óptima para ese par (100-400 nM, ver tabla 22 del anexo), agua hasta 20 μ l. Todos los reactivos empleados fueron de Invitrogen. El programa básico de ciclado empleado fue: 1 ciclo de 1 minuto a 95°C y 35-40 repeticiones de un ciclo de 1 minuto a la temperatura de *annealing* de los oligonucleótidos y un ciclo de 1 minuto a 72°C. Las corridas se realizaron en termocicladores Bio-Rad o Eppendorf. Los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa 0,8-2% (dependiendo del tamaño del amplicón) en buffer TAE 1X con Bromuro de Etidio (0,25 μ g/ml).

5.6. PCR cuantitativas o en tiempo real (*qPCR*)

Las PCR cuantitativas se realizaron empleando una mezcla de reacción comercial así como también utilizando una mezcla de reacción casera. En ambos casos se midió la expresión relativa de un gen entre dos tratamientos con el empleo del colorante fluorescente SYBR Green I. A continuación se describen ambos protocolos. Las corridas en el equipo (Applied Biosystems 7500) y el análisis posterior de los datos son iguales en ambos casos y se describen más adelante.

Para la realización de la PCR cuantitativa con la mezcla de reacción comercial (Qiagen o Applied Biosystem), se empleó el siguiente protocolo: 10 μ l de la mezcla comercial 2X (HotStarTaq DNA Polymerase, QuantiTect SYBR Green PCR Buffer, dNTP mix, SYBR Green I dye, ROX), oligonucleótidos a la concentración óptima para ese par (100-400 nM, tabla 22 del anexo), agua hasta 20 μ l. Para la realización de la PCR cuantitativa con la mezcla de reacción casera se empleó el siguiente protocolo: 1,2 μ l de MgCl (50 mM), 2 μ l de buffer de PCR 10X, 0,4 μ l de dNTP (10 mM cada uno), 0,4 μ l de ROX (carboxi-X-rodamina) (25 μ M), 0,4 μ l de SYBR Green I 10X, 0,1 μ l de Taq Platinum (5 U/ μ l), oligonucleótidos a la concentración óptima para ese par (100-400 nM, tabla 22 del anexo), agua hasta 20 μ l. Todos los reactivos empleados fueron de Invitrogen.

El programa de ciclado básico que se empleó fue el siguiente: un ciclo de 95°C durante 5 minutos, 45 repeticiones de un ciclo de 95°C durante 15 segundos y de un ciclo a la temperatura de *annealing* de los oligonucleótidos durante 1 minuto. La temperatura de *annealing* se determinó para cada par de oligonucleótidos (entre 58°C y 62°C, tabla 22 del anexo). Al finalizar el programa se realizó una curva de disociación para verificar la

especificidad de la PCR (95°C durante 15 segundos, 60°C durante 15 segundos seguido de una rampa hasta 95°C).

La puesta a punto de una PCR en tiempo real implica encontrar aquellas condiciones que permitan la amplificación del gen de interés y que evite la amplificación inespecífica. Se buscaron esas condiciones para cada par de oligonucleótidos empleados. Se partieron de condiciones estándares (concentración de oligonucleótidos 200 nM y temperatura de *annealing* 60°C) y luego se fueron modificando hasta hallar la condición ideal para cada juego de oligonucleótidos. Se empleó la curva de disociación para verificar que la amplificación del control negativo (sólo oligonucleótidos sin templado) no coincida con la de las muestras. Si fue necesario se corrieron los productos de las PCR en tiempo real en geles de agarosa 2% para resolver los casos equívocos.

Los resultados obtenidos en las corridas fueron analizados en primer lugar con el programa LinRegPCR (Ruitjter *et al.*, 2009). Este programa calcula la eficiencia de cada par de oligonucleótidos y el valor de Ct para cada muestra. El análisis estadístico de los datos se realizó a través de la prueba de permutación (no asume supuestos de distribución muestral) (Pfaffl *et al.*, 2001) y para ello se utilizó el programa FgStatistics (Di Rienzo, 2009). En todos los casos se emplearon entre 3 y 6 réplicas biológicas por tratamiento y entre 2 y 3 réplicas técnicas de cada réplica biológica. Las comparaciones siempre se realizaron con las plantas no transformadas o *wild-type*.

5.7. Diseño de oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos se realizó con el programa Primer 3.0 (Untergrasser *et al.*, 2012) a partir de las secuencias de cada gen tomadas de las bases de datos Pubmed o Sol Genomics Network.

5.8. Caracterización fenotípica de las plantas de tabaco

La caracterización fenotípica de las líneas transgénicas y los controles WT incluyó: altura, longitud del tallo entre los entrenudos cuarto a octavo, peso fresco de hojas, tallos y raíces y tiempo de floración (medido como número de hojas presentes en la planta al momento de la aparición del botón floral). Todas las mediciones se llevaron a cabo durante la fase vegetativa de las plantas cuando tenían entre 9-10 hojas expandidas en total. El análisis estadístico se realizó por la prueba t de Student.

5.9. Medición de H₂O₂ en hojas de tabaco

Se detectó la presencia de H₂O₂ en hojas de las líneas transgénicas de tabaco y sus controles con DAB (3,3'-diaminobencidina) (Sigma). Las mediciones se llevaron a cabo en la tercera o cuarta hoja expandida durante la fase vegetativa de las plantas, cuando tenían entre 9-10 hojas expandidas en total. Las muestras se tomaron en el momento del día de máxima irradiancia (entre las 11:00 y las 14:00). La solución de DAB (DAB 0,1 % p/v en buffer Tris-HCl pH 6,5) se infiltró en las hojas inmediatamente después de ser cosechadas con vacío durante 5 minutos. Las hojas fueron incubadas durante 18 horas en la oscuridad a temperatura ambiente. Luego fueron iluminadas hasta la aparición de manchas marrones y lavadas con etanol 100 % v/v para una mejor visualización de las manchas. Finalmente, las hojas fueron escaneadas y las manchas fueron cuantificadas por el número de píxeles usando el programa Photoshop 6.0. Los resultados se expresaron como el porcentaje de manchas por área total de hojas. El análisis estadístico se realizó por la prueba t de Student.

5.10. Medición de la asimilación de CO₂, transpiración y conductancia estomática en plantas de tabaco

Se realizaron curvas de respuesta a la luz de parámetros fotosintéticos (asimilación de CO₂, transpiración y conductancia estomática) para cada línea homocigota y las plantas controles sin transformar (WT) a irradiancias crecientes (0, 50, 100, 300, 700, 1200, 1500, y 1700 mol s⁻¹ m⁻²) con un sistema de intercambio gaseoso portable (LI-COR 6400). Las mediciones se llevaron a cabo en la tercera o cuarta hoja expandida durante la fase vegetativa de las plantas, cuando tenían entre 9-10 hojas expandidas en total. Se emplearon de 4 a 8 réplicas biológicas por genotipo. Las mediciones se realizaron entre las 11:00 y las 14:00. El análisis estadístico se realizó por la prueba t de Student.

5.11. Análisis de proteínas totales en hojas de tabaco

Las proteínas totales fueron extraídas de hojas congeladas y trituradas de las líneas transgénicas y de las plantas controles con un *buffer* de extracción general de proteínas (glicerol 10%, Tris 25 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, DTT 10 mM, PVPP 2% p/v, DMSF 2 mM). Luego de adicionar el *buffer* se mezclaron con vórtex durante 30 segundos y se centrifugaron durante 2 minutos a 12000 rpm. El sobrenadante se volvió a centrifugar a la misma velocidad durante 10 minutos. Se midió el contenido de proteínas totales por el método de Bradford (Bio-Rad), para lo cual se emplearon 200 µl del reactivo comercial diluido 1/5 y 2 µl de la muestra. El valor de la absorbancia se interpoló en una curva de calibración de proteínas preparada con albúmina bovina sérica (Bio-Rad), con un rango de

concentraciones entre 0 y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se corrieron 40 μg de proteínas totales por réplica biológica individual en un gel de poliacrilamida desnaturante al 15% que se tiñó con el colorante Azul Brillante R (Sigma). El protocolo del SDS-PAGE fue adaptado de Sambrook *et al.* (1989). Se corrieron tres réplicas independientes por genotipo.

5.12. Medición de azúcares en hojas de tabaco

Se realizó una curva diurna de acumulación de azúcares de las hojas fuente de las plantas de tabaco. Se muestrearon 3 discos de hoja por planta (aproximadamente 30 mg) cada 4 horas durante un período de 24 horas. Se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta su uso.

Las muestras se molieron y luego los azúcares solubles se extrajeron en forma sucesiva con 250 μl de etanol 80%, 250 μl de etanol 80% y 150 μl de etanol 50%. Se calentaron a 80°C durante 20 minutos y se centrifugaron 5 minutos a 14000 rpm luego de cada adición de etanol. Los sobrenadantes de cada extracción se mezclaron y se emplearon para la medición de azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) por el método enzimático (Ferne *et al.*, 2001). El principio de este método es la medición de la absorbancia creciente a 340 nm que se produce al generarse NADPH durante reacciones sucesivas en las cuales se miden los azúcares. Se agregaron 50 μl del extracto etanólico obtenido de cada muestra a 180 μl de la solución I y se procedió a medir la absorbancia a 340 nm cada un minuto en un espectrofotómetro de placa. La solución I contiene 480 μl de solución de ATP (60 mg/ml, Sigma), 480 μl de solución de NADP^{+} (36 mg/ml, Sigma) y 80 μl de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (98%, Sigma) en buffer HEPES 1/10 (HEPES/KOH 1M, MgCl_2 30mM, pH 7,0). Una vez que la medición de la absorbancia se estabilizó, se agregó 1 μl de hexoquinasa (60 μl de la suspensión enzimática de Sigma disuelta en 200 μl de buffer HEPES 0,1M) a la reacción y se midió el aumento de la misma a intervalos de 1 minuto hasta el *plateau* de la reacción. La hexoquinasa cataliza la siguiente reacción: hexosa + ATP \rightarrow hexosa-6-fosfato + ADP. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa presente en la solución I cataliza la siguiente reacción: Glucosa-6-Fosfato + $\text{NADP}^{+} \rightleftharpoons$ 6-fosfogluconolactona + NADPH. De este modo, el aumento de la absorbancia por el NADPH generado es directamente proporcional al contenido de glucosa en la muestra. Luego se adicionó 1 μl de fosfoglucoisomerasa (60 μl de la suspensión enzimática 2 mg/ml de Sigma disuelta en 200 μl de buffer HEPES 0,1M), que cataliza la reacción: fructosa-6-fosfato \rightleftharpoons glucosa-6-fosfato. La glucosa-6-fosfato es degradada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa presente en la reacción, pero como en este punto la glucosa-6-fosfato sólo proviene de la fructosa, entonces el aumento de la absorbancia es directamente proporcional al contenido de fructosa en la muestra. Finalmente se adiciona 1 μl de invertasa (suspensión saturada de enzima en buffer HEPES 0,1M), que cataliza la reacción: sacarosa \rightarrow glucosa +

fructosa. Tanto la glucosa como la fructosa recién formadas reaccionan con las enzimas presentes en la mezcla de reacción. En este caso, a diferencia de las reacciones anteriores, se generan 2 moles de NADPH por cada mol de sacarosa. Se obtuvieron los valores de las absorbancias al llegar las reacciones al *plateau* y se calculó el ΔA (*plateau* menos base), que se interpoló en una curva de calibración realizada con glucosa (Sigma), con valores de 0 a 12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. El análisis estadístico se realizó por la prueba t de Student.

El precipitado obtenido de la extracción de azúcares solubles se empleó para la medición de almidón. Se resuspendió en 400 μl de KOH 0,2M y se incubó a 95°C durante una hora. Luego, se agregaron 70 μl de ácido acético 1M y se centrifugó a 13900 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se recuperó y se empleó para las determinaciones, que se llevaron a cabo con un juego para la medición de almidón (Sigma). A 12,5 μl del sobrenadante diluido 1:3 se le adicionó 25 μl de la solución I del juego para la medición de almidón (que contiene amiloglucosidasa). La amiloglucosidasa degrada el almidón según: almidón + agua \rightarrow glucosa. La mezcla se incubó 45 minutos a 56°C y luego se le adicionó 250 μl de la solución II del juego (reactivo para la medición de glucosa, que contiene hexokinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa). La solución II contiene los reactivos necesarios para catalizar las siguientes reacciones: glucosa + ATP \rightarrow glucosa-6-fosfato + ADP (reacción catalizada por la hexoquinasa) y glucosa-6-fosfato + NAD⁺ \rightarrow NADH + 6-fosfogluconolactona (reacción catalizada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa). El principio entonces es el mismo que para la medición de glucosa libre. La mezcla se dejó enfriar y se midió la absorbancia a punto final a 340 nm. La cantidad de almidón se expresó como moles de glucosa/g de peso fresco de hoja. El análisis estadístico se realizó por la prueba t de Student.

5.13. Obtención y análisis del exudado floemático de hojas de tabaco

La tercera o cuarta hoja expandida de las plantas transgénicas de tabaco y del correspondiente control se cortó por la base del pecíolo bajo agua. Se analizó una hoja por planta y cinco plantas por línea. Las hojas se pesaron al comienzo del experimento y los pecíolos se colocaron en una solución de EDTA 5mM (pH 6) durante una hora, luego se transfirieron a una solución fresca y se incubaron durante 16 horas más. Las incubaciones de las hojas escindidas se realizaron en una cámara de cría bajo condiciones controladas (humedad relativa 60%, temperatura 23°C, luz continua 200 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$). Los exudados fueron liofilizados y resuspendidos en 1 ml de agua. El contenido de azúcares se determinó por el método enzimático como se describió anteriormente. El protocolo fue adaptado de Leggewie *et al.* (2003). El análisis estadístico de los datos se realizó por la prueba t de Student.

5.14. Medición de ABA y de giberelinas en hojas de tabacos

Se midieron el contenido de ácido abscísico (ABA) y distintas giberelinas (GAs) en las hojas de las plantas transgénicas de tabaco y los controles a través del servicio de medición de hormonas vegetales del Danford Plant Science Center. Las mediciones se realizaron por HPLC-MS/MS a través de un sistema de cromatografía líquida Shimadzu con un autosampler LEAP CTC PAL acoplado a un sistema de espectrometría de masa Applied Biosystems 4000 QTRAP, equipado con una fuente de iones Turbolon Spray. Las hojas fuente se muestrearon entre las 11:00 y las 13:00 y luego se liofilizaron. El método de extracción y detección de ABA fue similar a lo publicado por Forcat *et al.* (2008). 100 mg del tejido liofilizado se mezcló con una solución con metanol 10% y ácido acético 1% junto con el estándar interno [6-D]ABA. Se emplearon 50 μ l del extracto para la corrida en el HPLC-MS/MS. La separación se realizó por gradiente: el pasaje de la solución A del 100% (94,9% H₂O: 5% CH₃CN: 0,1% CHOOH) a la B al 100% (5% H₂O: 94,9% CH₃CN: 0,1% CHOOH) se realizó en 20 minutos a un flujo de 200 μ l/min. El método de extracción y detección de giberelinas es similar a lo descrito por Varbanova *et al.* (2007). A 200 mg del tejido liofilizado y molido se le adicionó 10 ml de acetona (100%) junto a la mezcla de los estándares de giberelinas (500 pg de cada uno). El análisis incluyó los siguientes estándares de giberelinas: 8/ 29/ 23/ 3/ 1/ 6/ 5/ 19/ 13/ 20/ 44/ 34/ 53/ 51/ 7/ 4/ 24/ 15/ 9/ 12. La mezcla se concentró hasta sequedad y luego de sucesivos pasos de purificaciones se disolvieron en 20 μ l de agua y se inyectaron en la columna. Las separaciones en el LC se realizaron en un flujo de 200 μ l/min usando dos solventes, el A (agua) y el B (acetonitrilo 0,05%). Se realizó un gradiente lineal de B del 3% al 65% durante 20 minutos.

5.15. Ensayo de sensibilidad a ácido giberélico (GA3) de las plantas de tabaco

Se rociaron a saturación las plantas de tabaco transgénicas y sus controles con una solución de GA3 10 μ M (Sigma) disuelto en etanol 0,002 % v/v dos veces por semana y otro grupo idéntico de plantas se roció simultáneamente con una solución que sólo contenía etanol 0,002 % v/v. Ambos grupos fueron tratados desde la emergencia de las plántulas hasta la floración. Se midieron los azúcares solubles (glucosa, fructosa, sacarosa) y se registró el fenotipo (altura en el tiempo, peso fresco de tallos, hojas y raíces y tiempo a la floración) como se describieron en los puntos 5.8 y 5.12. El análisis estadístico se realizó por la prueba t de Student. Por otro lado, la proteína ASR1 fue detectada con un *Western blot* en las hojas de las plantas *wild-type* con y sin tratamiento con GA3 como se describe en los puntos 5.11 y 5.16.

5.16. Detección de ASR1 a través de *Western blot*

La presencia de la proteína ASR1 se detectó mediante *Western blots* tanto en tejido de tabaco como de tomate. La extracción de proteínas se realizó como se describió en el punto 5.11 y en el caso de los frutos de tomate las muestras fueron liofilizadas previamente a la extracción. Los extractos se cuantificaron con el método de Bradford como se describió previamente y se corrieron en geles de acrilamida: bisacrilamida 15% desnaturizante con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) para verificar la integridad de las proteínas como se describió en el punto 5.11. El protocolo para *Western blot* se adaptó de Sambrook *et al.* (1989). Para la detección de ASR1 se diluyeron 60 µg de proteínas totales en buffer de siembra 3X (Tris-HCl 60 mM pH 6,8, SDS 2% p/v, glicerol 10% v/v, 0,7 M 2-β-mercaptoetanol y azul de bromofenol 0,1% p/v) y se llevó a ebullición durante 1 minuto. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Hybond ECL; GE Healthcare) por transferencia semihúmeda durante 30 minutos a 65 mA. La correcta transferencia de las proteínas se chequeó tiñendo la membrana con una solución de Rojo Ponceau S 0,1 % p/v (Sigma). Las proteínas inmovilizadas en las membranas se bloquearon durante 1 hora a 4°C con una solución de bloqueo (leche descremada 5% p/v, Tween 20 0,1% v/v, *buffer* PBS) con agitación. Las membranas se incubaron con un suero anti-ASR1 (Maskin *et al.*, 2007) durante toda la noche a 4°C con agitación. Luego se realizaron 3 lavados con una solución de lavado (Tween 20 0,1% v/v, *buffer* PBS) durante 10 minutos cada uno. Se incubaron las membranas con un suero que posee anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con fosfatasa alcalina. Se volvieron a realizar los lavados solo con *buffer* PBS. Las membranas se revelaron utilizando los reactivos NBT (nitroazul de tetrazolio, Promega) y BCIP (5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato, Promega) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

5.17. Medición de la expresión de genes de transportadores y sensores de azúcares a través de *PCR* cuantitativas en hojas de tabaco transgénicas

Se realizaron las extracciones de ARN total, la síntesis de ADN copia y las *PCR* cuantitativas de acuerdo a lo descrito en los puntos 5.3 a 5.7 en hojas de las líneas transgénicas de tabaco y de los controles WT. Se midieron los niveles del ARNm de los transportadores de azúcares *Ht*, *Sut2*, *Vgt* y *Tmt3*, y de los sensores de azúcares *hexoquinasa* y *SnRK1.1*. Los detalles de los oligonucleótidos empleados se encuentran en la tabla 22 del anexo.

5.18. Generación de plantas transgénicas de tomate con *Asr1* en sentido y en antisentido

A continuación se describe los materiales y metodología utilizados para producir líneas transgénicas de tomate (cv Money Maker) con construcciones que portan al gen *Asr1* de *Solanum lycopersicum* (cv. Money Maker) en orientación sentido y antisentido bajo el control del promotor constitutivo 35S (proveniente del virus del mosaico del coliflor) y bajo el control del promotor específico de fruto B33 (promotor de la patatita de la papa, Rocha-Sosa *et al.*, 1989).

5.18.1. Clonado de *Asr1*

Las 348 pares de bases de la región codificante de *Asr1* de tomate (GenBank U86130.1) se clonaron en el sitio de clonado múltiple del vector pBINAR (Liu *et al.*, 1990) con las enzimas *XbaI* y *KpnI* entre el promotor CaMV35S y el terminador OCS (octopina sintasa de *Agrobacterium*). Luego, el fragmento lineal de *Asr1* fue digerido de ese mismo plásmido con las mismas enzimas y se empleó la enzima Klenow para generar extremos romos. Este fragmento fue subclonado en el sitio HindIII del vector pBIN-AR B33 (Rocha Sosa *et al.*, 1989) entre el promotor B33 y el terminador OCS. En ambos casos las construcciones portan el gen de selección *NptII* (provee resistencia a la kanamicina). Se seleccionaron clones en orientación sentido para generar las líneas sobreexpresantes y en antisentido para generar las líneas silenciadas. El ADN de los plásmidos se purificó con el *kit* de QIAGEN Miniprep Kit y los insertos fueron secuenciados por el método de Sanger en un secuenciador automatizado ABI3700 (Applied Biosystems). Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas fueron DH5 α , las que se cultivaron en condiciones estándares a 37°C.

5.18.2. Transformación de plantas de tomate

Las construcciones obtenidas fueron utilizadas para transformar cotiledones de tomate cv Money Maker vía *Agrobacterium tumefaciens* a través de un protocolo adaptado de Nunes-Nesi *et al.* (2005). Para transformar las células de *A. tumefaciens* (cepa GV2260) se agregó 1 μ g de plásmido a 100 μ l de bacterias competentes (mantenidas a -80 °C en una solución de CaCl₂ 20 mM y de glicerol 10 %) y se incubó 30 minutos en hielo. Luego se congelaron las bacterias en nitrógeno líquido durante 2 minutos e inmediatamente se transfirieron a 28 °C por 5 minutos. Se volvieron a colocar las bacterias en el hielo y se les adicionó 1ml de medio YEB (triptona 5 g/l, extracto de levadura 1g/l, caldo nutritivo 5 g/l, sacarosa 5 g/l, MgSO₄.7H₂O 0,49 g/l). Se incubó el cultivo a 28 °C durante 2 horas con agitación. Se cultivaron las bacterias transformadas durante 48 horas en placas con medio YEB (ágar) que contenían los antibióticos correspondientes y se seleccionaron los clones

transformados. Cuando se realizó el ensayo de transformación de las plantas se prepararon cultivos de las agrobacterias transformadas en medio YEB a 28 °C con agitación y se emplearon para la transformación cuando la absorbancia a 600 nm se situó entre 0,4 y 0,9.

Se obtuvieron cotiledones germinando semillas estériles de tomate cv Money Maker durante 5 a 6 días a 22 °C en una estufa. Se cortaron los cotiledones y se transfirieron a medio CIM [medio 3X MS -Murashige y Skoog-, tiamina 1 mg/l, 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) 1 mg/l, kinetina 0,2 mg/l] a 22 °C durante 24 horas. Se sumergieron los cotiledones en la suspensión de agrobacterias transformadas durante 10 minutos y agitando manualmente. Se dejaron secar los cotiledones y se transfirieron nuevamente a medio CIM suplementado con acetosiringona 200 mM. Se colocaron las placas a 22 °C durante 2 días y luego se transfirieron los cotiledones a medio SIM I [medio MS 3X, tiamina 1 mg/l, zeatina 2 mg/l, β -bactyl (250 mg/l), claforan (125 mg/ml), kanamicina (100 mg/ml)]. Se repicaron cada 14 a 18 días en medio SIM II [medio MS 3X, tiamina 1 mg/l, zeatina 1-1,5 mg/l, ácido giberélico 0,3-0,5 mg/l, β -bactyl (250 mg/ml), claforan (125 mg/ml), kanamicina (100 mg/ml)]. Se cortaron los callos verdes y los brotes emergentes y se transfirieron a medio AM [medio MS 0,5X, sacarosa 20 g/l, ANA (ácido naftaleno acético) 0,2 mg/l, β -bactyl 250 mg/l, kanamicina 50 mg/l)]. Luego de 8 a 12 días (cuando desarrollaron raíces) se transfirieron a medio 2 MS (medio MS con sacarosa 20 g/l, clorafan 125 mg/l, β -bactyl 250 mg/l, kanamicina 80 mg/l) hasta que estuvieron en condiciones de ser transferidos a invernáculo. Se realizaron simultáneamente dos controles: un control positivo (control de regeneración: se transfirieron cotiledones cortados a medio CIM sin agrobacterias durante tres días y luego se traspasaron a medio SIM I sin kanamicina) y un control negativo (se transfirieron cotiledones cortados sin agrobacterias a medio CIM durante tres días y luego a medio SIM I con kanamicina).

5.18.3. Selección de las plantas transgénicas

Una vez obtenidas las líneas T0 (cada una originada de un evento de transformación independiente), fueron transferidas al invernáculo para la obtención de semillas T1. En el caso de las plantas transformadas con el vector que contenía al promotor 35S se realizó una primera selección de las líneas T0 a través de *Northern blots* (punto 5.18.3.1) para reducir el número de líneas candidatas. Se eligieron tres líneas *sense* y tres líneas *antisense* de acuerdo a sus niveles de ARNm para caracterizar el crecimiento de sus plantas T1 en medio MS con kanamicina 100 mg/l. En el caso de las plantas T0 transformadas con el vector que contenía al promotor B33 se transfirieron directamente al invernáculo para la obtención de semillas T1 y su evaluación en medio MS con kanamicina 100 mg/l. De cada línea T0 de cada una de las construcciones empleadas se

sembraron 20 semillas T1 en medio MS con kanamicina 100 mg/l y se seleccionaron 3 líneas de cada construcción que presentaron resistencia a kanamicina en una proporción 3:1. La resistencia a kanamicina se visualiza como un desarrollo normal de las plántulas a diferencia de las no resistentes que no pueden desarrollar raíces secundarias ni hojas. Las líneas T1 seleccionadas de este modo fueron transferidas al invernáculo para evaluar los niveles de expresión del transgén (puntos 5.18.3.2 y 5.18.3.3).

5.18.3.1. *Northern blot* de *Asr1* en hojas de líneas 35S::*Asr1-sense* y 35S::*Asr1-antisense*

Alrededor de 20 líneas T0 con *Asr1* en sentido y otras tantas líneas con *Asr1* en antisentido fueron evaluadas por *Northern blot*. Para ello se extrajo ARNm de hojas de plantas con 6 hojas expandidas por el método de Trizol como se describió en el punto 5.3. Se corrieron geles con cantidades equivalentes de ARN total. Se transfirió el ARN a una membrana de nylon siguiendo un protocolo estándar (Sambrook *et al.*, 1989). Las membranas que contenían el ARN de las líneas *sense* fueron hibridadas durante una noche completa con una sonda generada por *random primer labeling* (Rediprime Kit, Amersham) utilizando el ADNc completo del gen como templado. Luego fueron lavadas sucesivamente en solución I (SSC 2x, SDS 0,1%), solución II (SSC 0,5X, SDS 0,1%) y en solución III (SSC 0,1X, SDS 0,1%) durante 20 minutos a 65 °C cada vez. Las membranas fueron expuestas durante toda la noche a filmes de rayos X (Xomat, Kodak). En el caso de las plantas *antisense* las membranas fueron hibridadas con una ribosonda generada por transcripción *in vitro* del gen *Asr1* en orientación antisentido con respecto al promotor T3 de un plásmido pBlueScript empleando RiboScribe RNA Probe Synthesis kit (Epicentre Technologies Corp) para detectar el gen endógeno específicamente. Las membranas fueron hibridadas toda la noche a 42 °C en solución IV (formamida 50%, NaPO₄ 0,25M pH 7,2, EDTA 1 mM, SDS 7%). Luego fueron lavadas 5 minutos a temperatura ambiente en solución I, dos veces durante 15 minutos a 60 °C en solución V (NaPO₄ 0,25 M pH 7,2, SDS 2%, EDTA 1 mM), dos veces durante 15 minutos a 60 °C en solución VI (NaPO₄ 0,04M pH 7,2, SDS 1%, EDTA 1 mM) y una vez durante 15 minutos a temperatura ambiente en solución I con RnaseA 1 µg/ml. Finalmente, las membranas fueron lavadas durante 30 minutos a 50 °C en solución III y expuestas a filmes de rayos X durante 4 a 6 días. Los filmes se escanearon con el escáner UMAX y la intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría con el NHI *image software*. Se seleccionaron 3 líneas silenciadas y tres líneas sobreexpresantes para la obtención de plantas T1.

5.18.3.2. Evaluación de los niveles de expresión del transgén en las líneas 35S::*Asr1-sense* y 35S::*Asr1-antisense*

Se seleccionaron tres líneas 35S::*sense* T1 llamadas S12, S16 y S31, cuyos niveles de expresión de ASR1 en hojas fueron evaluados a través de *Western blots*, de la manera que se realizaron en los puntos 5.11 y 5.16. Se evaluaron los niveles de ASR1 en la 3° o 4° hoja expandida de quince a veinte plantas por línea. Se seleccionaron dos a tres plantas por línea que luego fueron propagadas vegetativamente para experimentos posteriores. Asimismo, se seleccionaron inicialmente dos líneas silenciadas T1 llamadas AS5 y AS17, cuyos niveles de expresión de *Asr1* fueron evaluados en la 3° o 4° hoja expandida a través de *qPCR*, tal como se describió en los puntos 5.3 a 5.7, empleando una mezcla de reacción comercial Qiagen y utilizando como gen de referencia a *18S rRNA* (ver el punto 5.19 acerca de cómo se realizó la elección del gen de referencia en las líneas de tomate). Se evaluaron los niveles de *Asr1* de quince a veinte plantas por línea. Se seleccionaron dos a tres plantas por línea que luego fueron propagadas vegetativamente para experimentos posteriores. Luego, se seleccionó una tercera línea silenciada T1 llamada AS18, con niveles del ARNm de *Asr1* disminuidos en el *Northern blot* y que mostró segregación 3:1 en medio MS con kanamicina 100 mg/l. Los niveles de expresión de *Asr1* en AS18 T1 fueron evaluados por *qPCR* en los experimentos realizados junto a las demás líneas (ver punto 5.20).

5.18.3.3. Evaluación de los niveles de expresión del transgén en las líneas B33::*Asr1-sense* y B33::*Asr1-antisense*

Se seleccionaron plántulas T1 (a partir del cultivo de semillas T0 en medio MS con kanamicina 100 mg/l): las plantas de tres líneas *sense* llamadas S3, S12 y S21 y tres líneas *antisense* llamadas AS17, AS27 y AS28 se transfirieron posteriormente a macetas y se cultivaron en condiciones de invernáculo como se describe en el punto 5.20. Luego se evaluaron los niveles de expresión de ASR1 en frutos maduros a través de *Western blots* de la manera descrita en los puntos 5.11 y 5.16. Además se evaluaron los niveles de expresión de ASR1 en la 3° o 4° hoja expandida por *Western blot*. En todos los casos se evaluaron cinco a seis plantas por línea. Se seleccionaron dos a tres plantas por línea que luego fueron propagadas vegetativamente para experimentos posteriores.

5.19. Elección del gen de referencia en plantas de tomate

Para la elección de genes referencia, se evaluó en las líneas de tomate empleadas en los ensayos el comportamiento de los transcritos propuestos por Expósito-Rodríguez *et al.* (2008): *CAC* (*clathrin adaptor complex medium subunit*; SGN-U314153), *TIP41* (*Tap42-*

interacting protein; SGN-U321250), EXPRESSED (*unknown expressed protein*; SGN-U346908), SAND (nombre dado a la familia de genes *Sp100*, *Aire-1*, *Nucp41/75*, *Deaf-1*; SGN-U316474) y *18S rRNA* (*18S ribosomal RNA*; X98800). Se seleccionó a *18S rRNA* como el mejor gen de referencia para el sistema mediante tres programas diseñados para este propósito: GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), NormFinder (Andersen *et al.*, 2004) y BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004). Los resultados se muestran en la tabla 5.1. Las características de los oligonucleótidos se muestran en la tabla 22 del anexo.

Tabla 5.1. Elección del gen de referencia con tres programas distintos. A. Programa BestKeeper. El coeficiente de correlación representa la correlación de cada gen de referencia con el índice BestKeeper. Aquellos genes que son estables muestran una alta correlación y un p-valor menor a 0,05 (Pfaffl *et al.*, 2004). B. Programa geNorm. El par de genes candidatos con menor valor de M es el recomendado como el par óptimo de genes de referencia (Vandesompele *et al.*, 2000). C. Programa NormFinder. Bajos valores de desvío estándar (DE) representan una alta estabilidad génica (Andersen *et al.*, 2004). En todos los casos se marcaron en gris los dos mejores genes de referencia.

A.

BestKeeper vs.	<i>Expressed</i>	<i>18s rRNA</i>	<i>Sand</i>	<i>Cac</i>	<i>Tip41</i>
Coefficiente de correlación (r)	0,901	0,848	0,843	0,870	0,377
p-valor	0,001	0,001	0,001	0,001	0,04

B.

Nombre del gen	M-Valor
<i>Tip41</i>	1,023
<i>Sand</i>	0,631
<i>Expressed</i>	0,560
<i>Cac</i>	0,497
<i>18s rRNA</i>	0,497

C.

Nombre del gen	DE
<i>18s rRNA</i>	0,145
<i>Cac</i>	0,151
<i>Expressed</i>	0,254
<i>Sand</i>	0,738
<i>Tip41</i>	1,412

5.20. Condiciones de medición de las plantas de tomate y niveles de *Asr1* durante los experimentos realizados

Para cada experimento llevado a cabo se crecieron entre 6 y 10 réplicas biológicas de cada genotipo en un invernáculo en condiciones controladas (80% de humedad relativa, 200 mmol PAR s⁻¹m⁻², 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad). Las plantas se crecieron en macetas de 8 litros con sustrato (60% turba, 20% pino, 10% tierra, 10% perlita) y se fertilizaron una vez al día por fertirriego con dos soluciones en proporciones iguales (Solucion A: CaNO₃ 1,5 g/l; solucion B: KNO₃ 0,6 g/l; MgSO₄ 0,6 g/l; NH₄H₂PO₄ 0,3 g/l; micronutrientes 0,05g/l que contienen Mg 2%; Fe quelatada con EDTA 9,3%; Boro 0,4%; Zinc 0,2%; Molibdeno 0,1% y Cobre 1,5%). Se rociaron con pesticidas cada 15 días (Penconazole: 1,5ml/l; Triadimefon: 1g/l; Pyriprofixen: 2ml/l). Se realizaron tres experimentos independientes llamados I, II y III. Los experimentos I, II y III fueron

realizados en invernáculo durante los meses de abril-noviembre, diciembre-marzo y julio-noviembre, respectivamente. En cada uno de los experimentos realizados se midieron los niveles de expresión de *Asr1* y sus parálogos (*Asr2*, *Asr3/5* -son 96% homólogos y no se pueden diseñar oligonucleótidos para diferenciarlos- y *Asr4*) en los frutos maduros de todas las líneas transgénicas con el promotor 35S y el control WT por PCR cuantitativa de la manera descrita anteriormente (puntos 5.3 a 5.7 y 5.19). Luego se realizó una correlación de Pearson con los valores de Ct obtenidos para cada parálogo utilizando el programa Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2008). En el caso de las plantas con el promotor B33 también se midieron los niveles de *Asr1* en frutos maduros y además en la 3° o 4° hoja expandida por PCR cuantitativa en los dos experimentos en los cuales se analizaron (II y III) de la manera descrita en los puntos 5.3 a 5.19. Las mediciones que se llevaron a cabo durante la fase vegetativa se realizaron en la 3° o 4° hoja expandida cuando las plantas tenían 6 a 8 hojas expandidas en total. En el caso de los frutos, las muestras se obtuvieron exclusivamente del pericarpio de los mismos. Las muestras de todos los tejidos fueron congeladas a -80°C hasta su uso, a menos que se indique lo contrario.

5.21. Caracterización fenotípica de las plantas de tomate

La caracterización fenotípica de las líneas transgénicas y los controles se realizó en tres experimentos independientes (I, II y III). En cada uno de ellos se midió el número total de frutos maduros producidos por planta, el peso total de frutos maduros producidos por la planta y el peso promedio de los frutos producidos por cada planta. Además se midieron los grados Brix de los frutos con un brixómetro manual. Para ello se trituraron los pericarpios de los frutos frescos, se centrifugaron suavemente y se midieron los grados Brix del sobrenadante obtenido. El análisis estadístico de los datos se realizó por ANOVA. Además se realizó un análisis multivariado de los datos fenotípicos a través de la prueba de conglomerados DGC (Di Rienzo, Guzmán y Casanoves) implementada en el paquete Infostat (condiciones: nivel de significación 0,05; matriz de varianza desestructurada; método promedio).

5.22. Medición de la conductancia estomática en plantas de tomate

Se realizaron tres medidas independientes durante el experimento I en las plantas controles (WT), *anti-sense* (AS5, AS17 y AS18) y *sense* (S12, S16 y S31) en fase vegetativa (6 a 8 hojas expandidas). Las mediciones se realizaron entre las 11:00 y las 13:00 con un porómetro SC-1 de Decagon Devices Inc. El análisis estadístico se realizó por ANOVA. El número de réplicas biológicas por genotipo fue de 4 a 6.

5.23. Medición de azúcares solubles en hojas y frutos de tomate

Se midieron entre 3 y 6 réplicas biológicas de hojas fuentes (tercera o cuarta hoja expandida cuando las plantas todavía se hallaban en fase vegetativa) y de frutos maduros de tomate de todas las líneas empleadas en los tres experimentos llevados a cabo (I, II y III). Las extracciones de azúcares de frutos se realizaron a partir de aproximadamente 50 mg (peso fresco) de frutos. Las extracciones de azúcares de hojas se realizaron a partir de aproximadamente 100 mg (peso fresco) de hojas. Tanto las extracciones como las mediciones se realizaron del mismo modo que para las muestras de tabaco (punto 5.12). El análisis estadístico de los datos se realizó por ANOVA.

5.24. Medición de metabolitos en hojas y frutos de tomate por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS)

Se realizaron análisis de metabolitos primarios de hojas fuentes y frutos maduros de las líneas transgénicas de tomate y sus controles WT por GC-MS. Se evaluaron los metabolitos en los tres ensayos realizados y en todas las líneas empleadas [35S:*Asr1-sense* (S12, S16, S31), 35S:*Asr1-antisense* (AS5, AS17, AS18), B33:*Asr1-sense* (S3, S12, S21), B33:*Asr1-antisense* (AS17, AS27, AS28) y los controles (WT)]. Se emplearon entre 3 y 5 réplicas biológicas y el análisis estadístico se realizó por ANOVA con el método de comparación de Duncan. Se empleó el programa Infostat para todos los análisis estadísticos (Di Rienzo *et al.*, 2008).

Las extracciones de metabolitos se realizaron con los protocolos desarrollados por Roessner *et al.* (2000) y Lisec *et al.* (2006). Se registró el peso exacto de las muestras congeladas y molidas. Para las extracciones de frutos de tomate se partió de aproximadamente 250 mg de tejido molido y congelado y se agregaron 2 ml de metanol 100% y 120 μ l del estándar interno ribitol (0,2 mg/ml) y se incubaron las muestras durante 15 minutos a 70°C. Se agregó 1,5 ml de agua y se centrifugó 15 minutos a 4000 rpm. Se tomaron alícuotas de 50 μ l de la fase superior para correr. Se secaron las muestras en un *speed-vac* durante al menos 3 horas. Para las extracciones de hojas de tomate se partió de aproximadamente 100 mg de tejido molido y congelado, a los cuales se les agregó 1,4 ml de metanol 100% y 60 μ l de ribitol (0,2 mg/ml). Se incubaron 15 minutos a 70°C y se centrifugaron 10 minutos a 14000 rpm. Se agregaron 750 μ l de cloroformo y 1,5 ml de agua y se homogeneizó con vórtex cada muestra durante 15 segundos. Se centrifugaron 15 minutos a 4000 rpm. Se tomaron 150 μ l de la fase superior para correr. Las muestras se secaron en un *speed-vac* durante al menos 3 horas.

Para realizar las corridas los residuos liofilizados se disolvieron con 60 μ l de una solución de hidroxilcloruro de metoxiamina al 3% disuelto en piridina 20 mg/ml (primer derivatizante). Se agitaron durante 2 horas a 37°C y se centrifugaron brevemente a máxima velocidad. Se agregaron 120 μ l de una mezcla de MSTFA (N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida; segundo derivatizante) y FAMES (*fatty acids methyl esters*; mezcla de estándares internos). Se agitaron 30 minutos a 37°C y se transfirieron a viales para la corrida. Las muestras fueron inyectadas en modo *split* (para cuantificar compuestos muy abundantes como los azúcares) y en modo *splitless* (para el resto de los metabolitos). El sistema empleado para las corridas fue un cromatógrafo gaseoso (GC 6890N; Agilent Technologies) acoplado a un espectrómetro de masa en tiempo de vuelo (Pegasus III TOF; LECO Instruments) con un inyector automático AS 2000. Los espectros de masas se registraron a 20 escaneos por segundo con un campo de barrido de 70 a 600 m/z. Cada muestra fue corrida durante 45 minutos.

Una vez obtenidas las corridas para cada muestra se procedió a su análisis. El primer paso fue evaluar la calidad de los cromatogramas obtenidos con el programa ChromaTOF® (LECO Corporation). La evaluación de la calidad implica evaluar la forma de los picos espectrales de algunas masas específicas de compuestos conocidos y el ruido de las corridas en zonas que no presentan picos. Se evaluó la variación de los estándares internos (ribitol y ácidos grasos de diferentes masas) incorporados a las muestras durante la extracción y derivatización. El siguiente paso fue el procesamiento de los datos con el programa TagFinder (Luedemann *et al.*, 2008). El objetivo es identificar los estándares internos y con ello calcular los índices de retención para cada *tag* o marca espectral que pudiera ser un compuesto. Finalmente los *tags* fueron comparados con bibliotecas de metabolitos, obtenidas de *The Golm Metabolome Database* (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>) (Kopka *et al.*, 2005), para identificarlos. La anotación final de cada compuesto se realizó de manera manual mediante la evaluación de los espectros. Una vez que se identificaron todos los metabolitos para cada muestra se calculó el nivel de cada uno corrigiendo el valor de intensidad obtenido durante la corrida por el peso de cada muestra y por la intensidad del estándar interno ribitol, de manera tal que los valores sean comparables entre todas las muestras. Esta aproximación sólo permite la cuantificación relativa de los metabolitos de los tratamientos en comparación con un control.

Finalmente, la anotación funcional de los metabolitos se realizó empleando las bases de datos de Mapman (Thimm *et al.*, 2004) y/o Kegg (Ogata *et al.*, 1999).

5.25. Análisis de perfiles transcripcionales de frutos maduros de tomates de líneas silenciadas

El análisis de los perfiles transcripcionales de frutos maduros de tomates se llevó a cabo en dos líneas silenciadas (AS5 y AS17) bajo el control del promotor 35S junto a los controles no transformados (WT). Se estudió el perfil transcripcional de tres réplicas biológicas independientes para cada genotipo. Cada una de las réplicas estuvo constituida por un *pool* del pericarpio de dos frutos maduros cosechados durante el experimento I. El análisis incluyó: extracción del ARN, síntesis del ARN copia marcado, hibridación a microarreglos y su escaneo y el procesamiento de los datos.

5.25.1. Extracción del ARNm

La extracción del ARNm de los frutos con Trizol® (Gibco) y la verificación de la calidad del mismo se realizó tal como se describió en el punto 5.3.

5.25.2. Síntesis del ARN copia marcado e hibridación de los microarreglos

La preparación del ARN copia y la hibridación de los microarreglos se realizaron a través del servicio de procesamiento de microarreglos del IFEVA (UBA). La síntesis del ARN copia marcado con biotina a partir de 100 ng de ARNm de las muestras fue realizada con el MessageAmp Premier Amplification Kit (Ambion) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. De manera resumida, los pasos que se realizaron fueron: transcripción reversa para sintetizar la primera cadena del ADN copia (empleando oligonucleótidos T7 oligodT para sintetizar el ADN copia con la secuencia promotora T7), síntesis de la segunda cadena del ADN copia (paso en el cual se genera ADN de doble cadena y para lo cual se empleó ADN polimerasa y RNaseH), transcripción *in vitro* para sintetizar la cadena del ARN copia biotinilada (se empleó la mezcla de reacción T7 Biotin IVT para generar múltiples copias del ARN copia biotinilado a partir del ADN de doble cadena) y finalmente se purificó el ARN copia biotinilado. Luego se realizó la hibridación del *target* en microarreglos GeneChip Tomato Genome Array® de Affymetrix® y se procedió a su escaneo con el escáner Affymetrix® GeneChip® Scanner 3000 7G.

5.25.3. Análisis de datos de los microarreglos

5.25.3.1. Control de calidad de las hibridaciones de los microarreglos

Para el análisis de los resultados de las hibridaciones de los microarreglos de tomate (Affymetrix GeneChip) se empleó el programa Robin (Lohse *et al.*, 2010). Este programa consiste en una interfase gráfica de R/Bioconductor, que provee de algoritmos para la evaluación de la calidad, la normalización y el análisis estadístico de los datos.

De manera previa a la normalización de los datos, se realizó una evaluación de la calidad de los microarreglos. En primer lugar, se chequeó la integridad del ARN empleado para la hibridación de las sondas. Los microarreglos de Affymetrix de tomate se caracterizan por representar un transcripto dado a través de un conjunto de 10 sondas, diseñadas sobre distintas zonas de su secuencia, denominado *probe set*. Esas diez sondas son ordenadas direccionalmente del extremo 5' al extremo 3' del transcripto y las intensidades promedios de todas las sondas son graficadas por número de sonda para cada microarreglo. En general, la degradación del ARN es más activa en el extremo 5'. Por lo tanto, las intensidades de la señal de las sondas cercanas a este extremo son más bajas. Es indicativo de un ARN de baja calidad si la pendiente de la curva de degradación del ARN para un microarreglo dado se desvía de la pendiente mediana de todas las curvas en un porcentaje mayor al 10%. Todos los microarreglos empleados en el ensayo se desvían de la mediana en un porcentaje menor al 10%, lo cual indica un nivel aceptable de calidad del ARN utilizado (figura 5.1A). Una vez que se descartaron problemas en el ARN, se realizó un gráfico de cajas con los valores de expresión de todas las sondas de cada microarreglo para visualizar la presencia de datos atípicos (figura 5.1B). Como se puede observar en la figura, la distribución de las intensidades de las señales de los nueve microarreglos es homogénea, lo cual muestra que las hibridaciones no contienen datos atípicos. Otra forma de visualizar datos atípicos es a través de histogramas suavizados de la intensidad de la señal (transformada logarítmicamente) de todas las sondas con la secuencia exacta del transcripto o *perfect match* (PM). Coincidentemente con lo observado en el análisis anterior, los microarreglos presentan un comportamiento homogéneo, compatible con la ausencia de datos atípicos (figura 5.1C).

Posteriormente, se realizaron otro conjunto de análisis sobre los datos, los gráficos de NUSE (*Normalized Unscaled Standard Error*) y de RLE (*Relative Log Expression*). El primero permite visualizar la distribución de los errores estándares para cada microarreglo individual (figura 5.1D) y debe estar centrado alrededor del valor 1. Los microarreglos que muestran un error estándar consistentemente alto son probablemente de menor calidad. Se puede ver en el gráfico que todos los microarreglos tienen errores estándares similares entre sí. La expresión logarítmica relativa (RLE) es calculada como el cociente entre la expresión de cada *probe set* en cada microarreglo y el valor de la mediana de la expresión de esta *probe set* a lo largo de todos los microarreglos (figura 5.1E). De acuerdo con el supuesto que la mayoría de los genes no están diferencialmente expresados bajo un tratamiento dado, el valor mediano de la RLE debería ser igual a cero en escala logarítmica. Entonces, los gráficos de cajas para cada microarreglo deberían estar centrados alrededor del 0 y tener una distribución semejante. Cualquier otro comportamiento sugeriría que el microarreglo es de baja calidad. Se puede observar en la

figura 5E que los gráficos de cajas de RLE no muestran diferencias sustanciales en las formas de las distribuciones de los microarreglos.

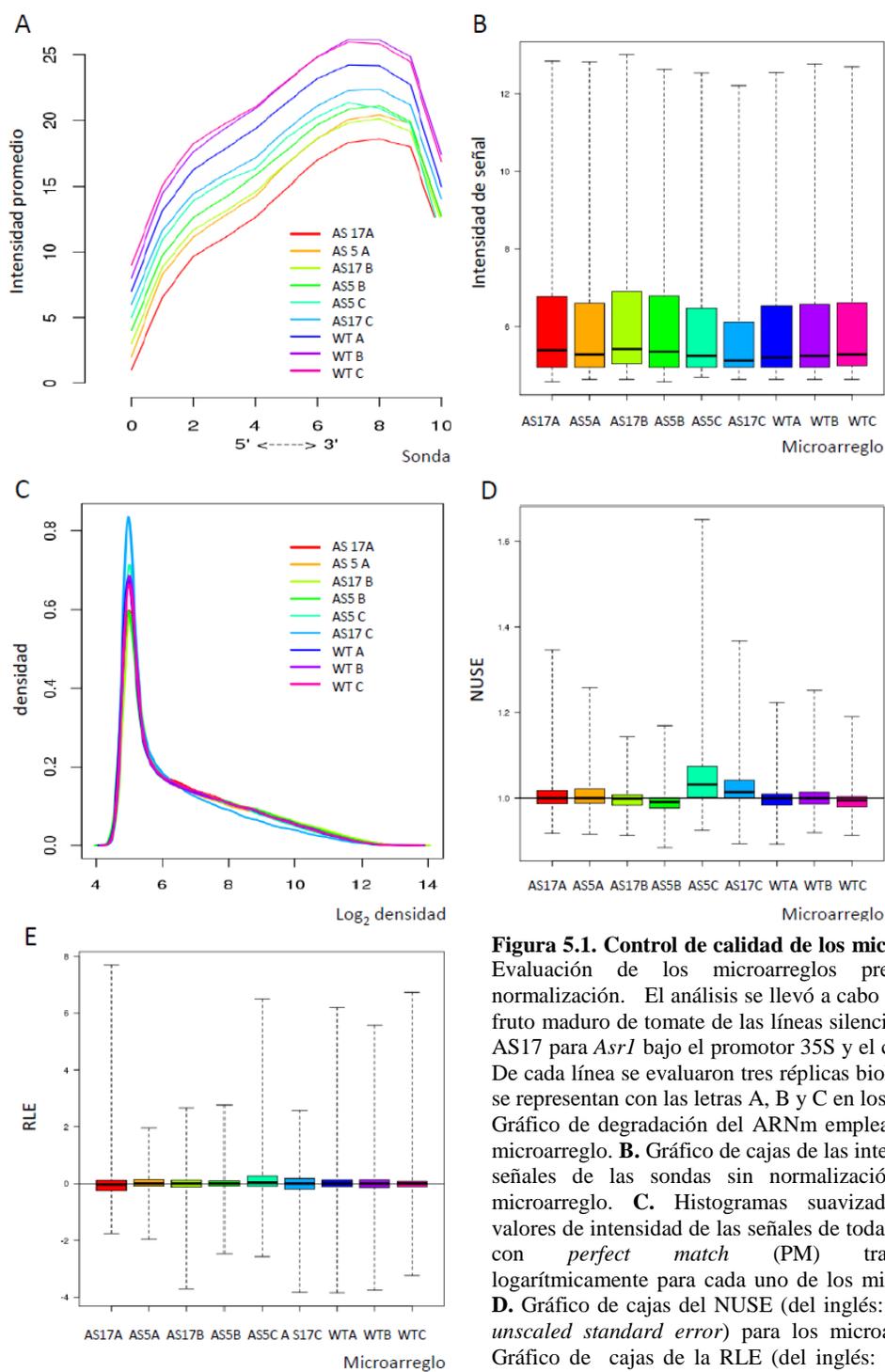


Figura 5.1. Control de calidad de los microarreglos.

Evaluación de los microarreglos previa a la normalización. El análisis se llevó a cabo en tejido maduro de tomate de las líneas silenciadas AS5 y AS17 para *Asr1* bajo el promotor 35S y el control WT. De cada línea se evaluaron tres réplicas biológicas, que se representan con las letras A, B y C en los gráficos. **A.** Gráfico de degradación del ARNm empleado en cada microarreglo. **B.** Gráfico de cajas de las intensidades de señales de las sondas sin normalización de cada microarreglo. **C.** Histogramas suavizados de los valores de intensidad de las señales de todas las sondas con *perfect match* (PM) transformados logarítmicamente para cada uno de los microarreglos. **D.** Gráfico de cajas del NUSE (del inglés: *normalized unscaled standard error*) para los microarreglos. **E.** Gráfico de cajas de la RLE (del inglés: *relative log expression*) para los microarreglos.

5.25.3.2. Normalización de los datos de microarreglos

Cuando se analizan experimentos de microarreglos, los datos obtenidos a partir del escaneo de las intensidades de las sondas en los *chips* pueden estar fuertemente influidos por efectos técnicos diferentes, tales como lavado no homogéneo o desviaciones sistemáticas en la intensidad de las sondas debido a diferencias en el ajuste del escáner. Para poder realizar una comparación entre distintas hibridaciones es preciso eliminar estos efectos. Este proceso se denomina normalización y consiste en tres pasos principales: (I) corrección del *background*, (II) normalización propiamente dicha de los niveles de las sondas con el *background* corregido y (III) resumen de los datos de los niveles de cada sonda para generar un solo valor de expresión por *probe set*, que constituirá el valor de expresión de un transcrito dado.

De todas las posibilidades de normalización que el programa Robin ofrece, se eligió ensayar dos tipos diferentes: MAS 5.0, desarrollada por Affymetrix (Affymetrix GeneChip® Expression Analysis, 2004), y RMA, la forma de normalización más extendida (Irizarry *et al.*, 2003). La diferencia básica entre ambos métodos radica en que MAS5.0 realiza el proceso de normalización basándose en cada *chip* individual, mientras que RMA tiene en cuenta a todos los *chips* empleados en un ensayo para llevar a cabo la normalización.

El programa utilizado para el análisis de los microarreglos permite visualizar el efecto de la normalización sobre las intensidades de cada sonda a través de los gráficos MA (figura 5.2 y 5.3). Esto permitió realizar una comparación entre ambos tipos de normalización y elegir la más adecuada para el conjunto de datos. Para realizar los gráficos MA, en primer lugar se genera un *chip* sintético creado a partir de los valores de las medianas de expresión de todos los *chips* en el *input*, llamado *chip G*. Luego, se obtiene el valor A, que es el valor promedio del logaritmo de la intensidad de la señal del *chip* en estudio (*chip R*) y del *chip G* ($A = \frac{1}{2} * (\log_2 R + \log_2 G)$). El valor A se grafica versus el valor M, que son los niveles de expresión del *chip R* respecto del *chip G* ($M = \log_2 R - \log_2 G$). Basándose en la asunción de que la mayor parte de los genes no tendrá una expresión diferencial, se espera que los gráficos MA estén centrados en el eje Y=0 y se considera aceptable que menos del 10% de los genes muestren un cambio mayor al doble en su expresión. En los gráficos de las figuras 5.2 y 5.3 se detalla en el margen superior izquierdo el porcentaje de genes que muestran un cambio en su expresión mayor al doble como «%G». Ninguno de los microarreglos muestra un porcentaje mayor al 10%, aunque los valores para la normalización con RMA son considerablemente más bajos que aquellos obtenidos con la normalización MAS5.0. En paralelo, se grafica una curva de regresión (llamada curva de ajuste *lowess*) sobre los datos para facilitar la comparación con el eje Y=0. La integral de la curva (señalada con la letra «I» en las figuras 5.2 y 5.3) debería ser idealmente menor a 1.

Un valor menor a 1 indicaría ausencia de artefactos dados por la intensidad de la señal, ya que debería haber sido corregida durante la normalización. Sólo con la normalización RMA todos los microarreglos tuvieron valores de «I» menores a 1. Por otro lado, si observamos el aspecto general de los gráficos MA para la normalización por MAS 5.0 y por RMA, se puede concluir que esta última es más efectiva.

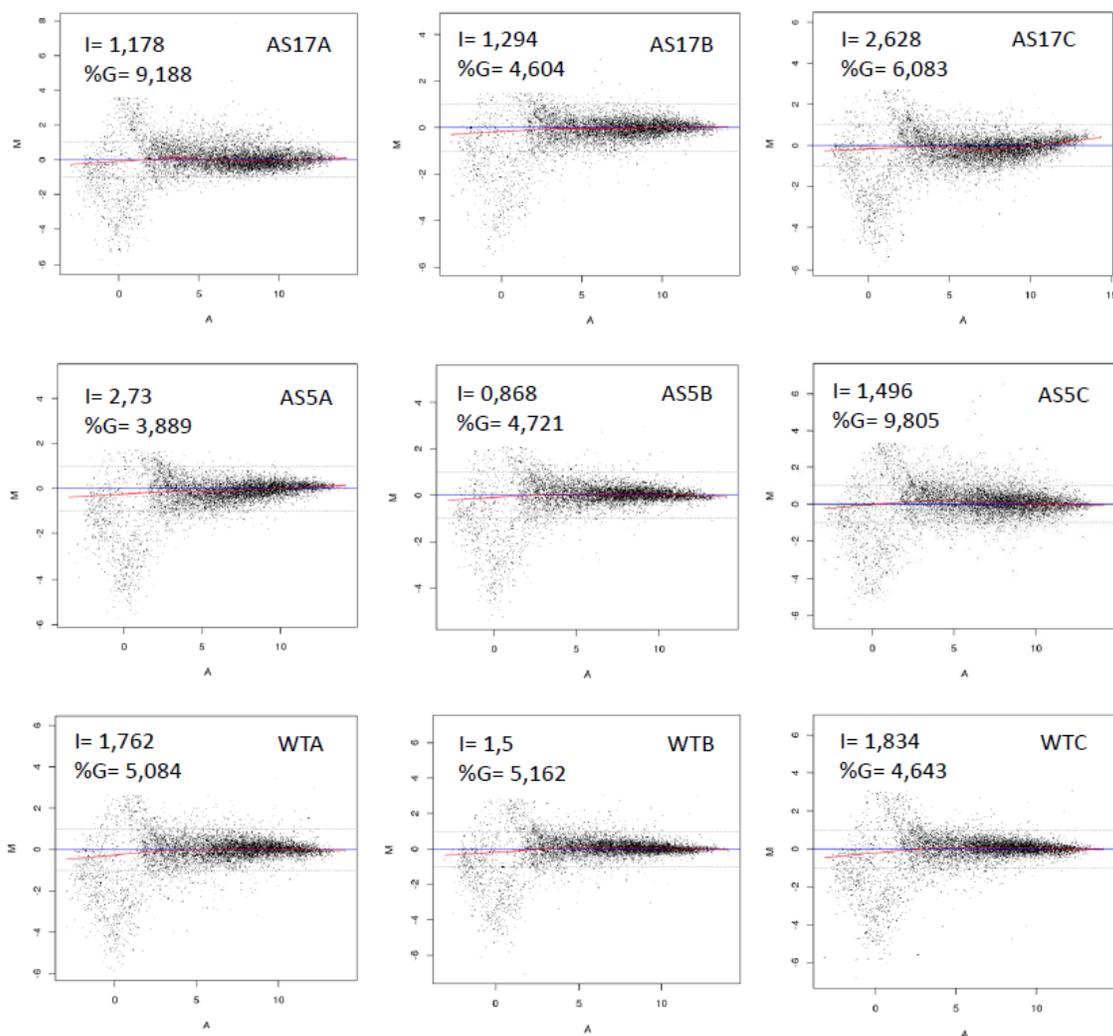


Figura 5.2. Normalización de los microarreglos empleando MAS5.0. Gráficos de MA para cada microarreglo. Se evaluaron las líneas AS5, AS17 y WT, cuyas réplicas biológicas se representan con las letras A, B y C en los gráficos. En rojo se encuentra graficada la curva de ajuste *lowess*. %G= porcentaje de genes que muestran un valor mayor al doble en la expresión. I=integral de los valores absolutos de la curva *lowess*.

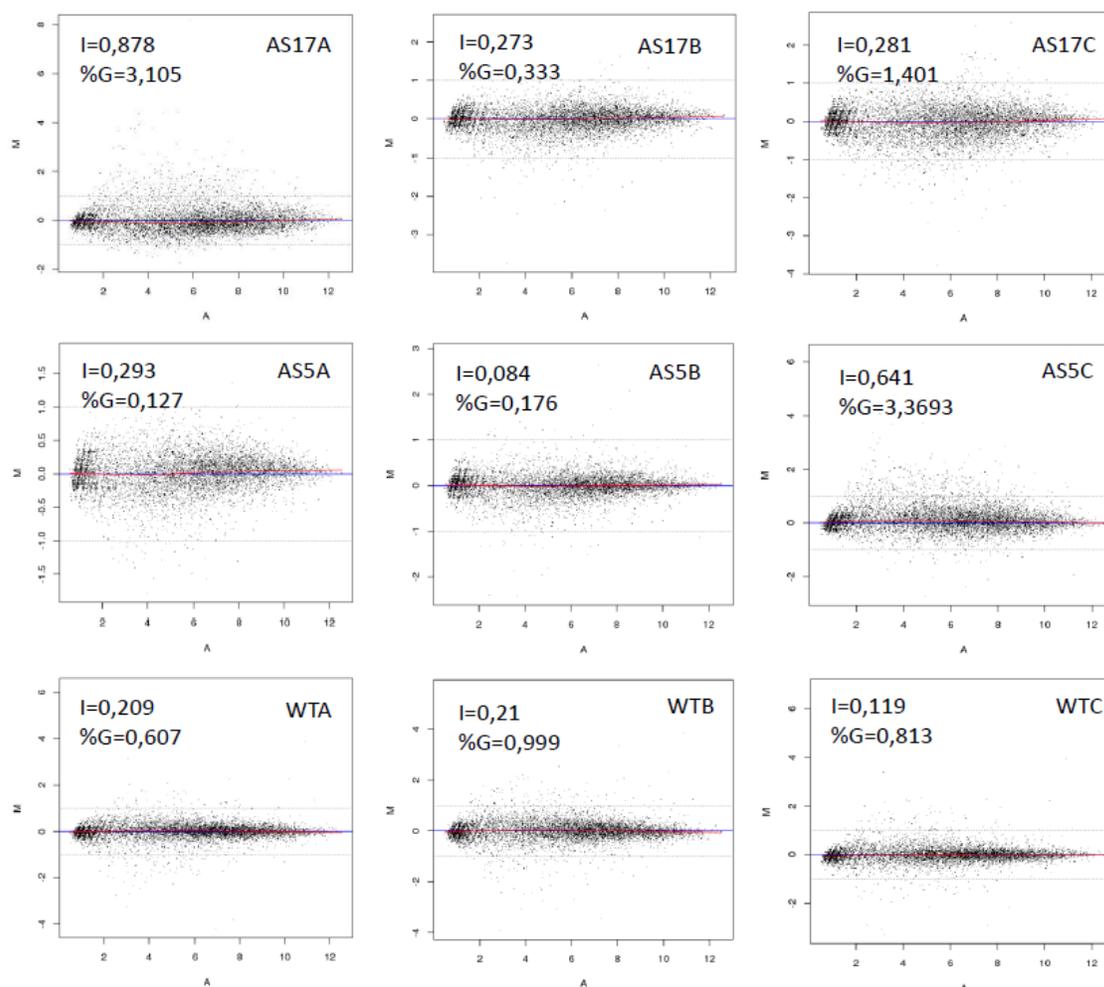


Figura 5.3. Normalización de los microarreglos empleando RMA. Gráficos de MA para cada microarreglo. Se evaluaron las líneas AS5, AS17 y WT, cuyas réplicas biológicas se representan con las letras A, B y C en los gráficos. En rojo se encuentra graficada la curva de ajuste *lowess*. %G= porcentaje de genes que muestra un valor mayor al doble en la expresión. I=integral de los valores absolutos de la curva *lowess*.

Finalmente, se exploró la estructura de los datos generados a través de un análisis de componentes principales y de un análisis de conglomerados jerárquico (figura 5.4). Los microarreglos con perfiles de expresión similares deberían agruparse juntos cuando se aplican estos análisis. De esta manera, los datos normalizados por RMA de las plantas control y de las plantas silenciadas se agrupan separadamente en el análisis de conglomerados. Sin embargo, se observa que dos microarreglos de las líneas silenciadas forman un grupo separado, lo cual indica que poseen alguna característica diferente en su conjunto de datos. En el análisis de componentes principales se observa un resultado similar. No obstante, la evaluación técnica presentada anteriormente indica que todos los microarreglos son válidos y que ninguno posee artefactos técnicos. El porcentaje de genes que muestra un valor mayor al doble en la expresión (ver el valor «G%» en la figura 5.3) es

superior en los microarreglos AS5C y AS17A. Probablemente esta sea la causa de su agrupamiento separado. Por lo tanto, se espera que las diferencias observadas entre los perfiles de expresión de los microarreglos se deban a razones biológicas.

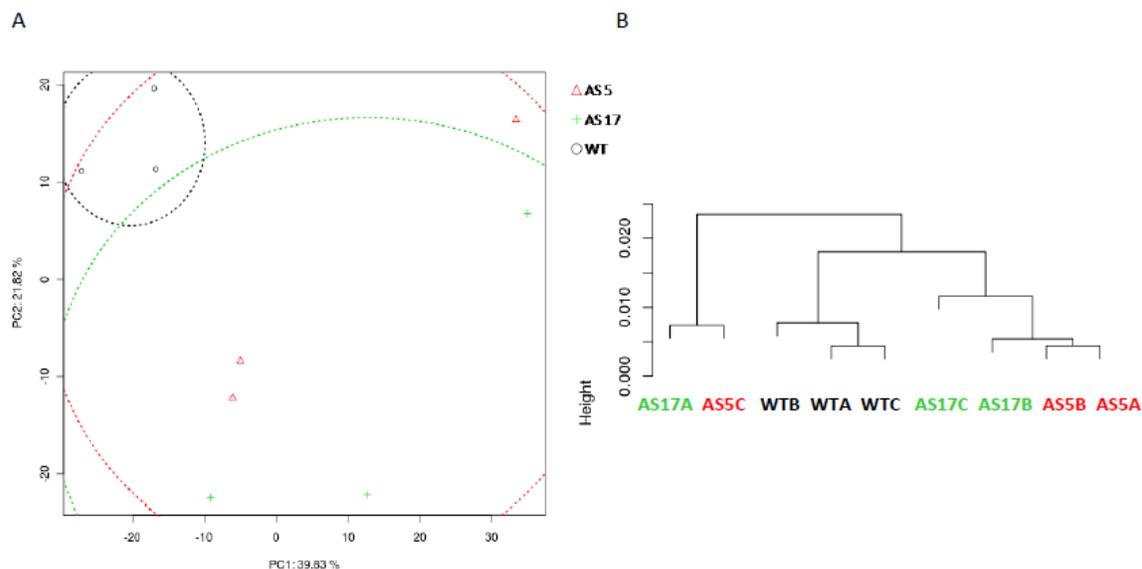


Figura 5.4. Análisis de la estructura de los datos de los microarreglos normalizados por RMA. A. Gráfico de componentes principales de los microarreglos empleando los datos de expresión estandarizados (siendo los microarreglos las columnas de la matriz del análisis y las sondas, las filas). **B.** Dendrograma del agrupamiento jerárquico de los datos de expresión de los microarreglos estandarizados, empleando el método promedio y la correlación de Pearson.

5.25.4. Clasificación de los genes estadísticamente significativos

Finalmente, los resultados obtenidos fueron anotados funcionalmente a través del programa Mapman (Thimm *et al.*, 2004), que provee clasificaciones funcionales (llamadas «bins») para genes y metabolitos. Asimismo se buscó la homología estructural de los genes encontrados en los microarreglos con genes de la base de datos TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) y de la Sol Genomics Network (<http://www.solgenomics.net/>). Ambos análisis se realizaron a través de Robin (Lohse *et al.*, 2010).

5.26. Medición de los niveles de expresión de los genes de los microarreglos por *qPCR*

Se realizó una validación técnica de algunos de los genes de los microarreglos con variaciones en sus niveles de expresión estadísticamente significativas por *qPCR* en los frutos maduros del experimento I. Las *qPCR* se realizaron con una mezcla de reacción casera tal como se describió en los puntos 5.3 a 5.7 y los oligonucleótidos empleados se encuentran listados en la tabla 22 del anexo. El gen de referencia empleado fue *18S rRNA*

(punto 5.19). El número de réplicas biológicas fue entre 3 y 5. El número de réplicas técnicas fue de 2. El análisis estadístico fue la prueba de permutación y se realizó con el *fg-statistics* (Di Rienzo, 2009).

Se realizó una validación biológica de algunos de los genes de los microarreglos con variaciones en sus niveles de expresión estadísticamente significativas por *qPCR* cuantitativa o en tiempo real en frutos maduros del experimento III (experimento independiente al de los microarreglos). Las mediciones se realizaron en frutos maduros de las líneas silenciadas bajo el promotor 35S (AS5, AS17, AS18) y en las plantas controles. Las *qPCR* se realizaron con una mezcla de reacción casera tal como se describió en los puntos 5.3 a 5.7 y los oligonucleótidos empleados se encuentran listados en la tabla 22 del anexo. El gen de referencia empleado fue *18S rRNA* (punto 5.19). El número de réplicas biológicas fue entre 3 y 5. El número de réplicas técnicas fue de 2. El análisis estadístico fue la prueba de permutación.

5.27. Identificación de motivos sobrerrepresentados en las secuencias regulatorias en *cis* de los genes medidos a través de los microarreglos

Se buscaron los motivos sobrerrepresentados en las 750 pares de bases anteriores al codón ATG de inicio de la transcripción en los genes con niveles de expresión aumentados o disminuidos en los microarreglos (tablas 15 y 16 del anexo). Las secuencias de 750 pb se prepararon para el análisis enmascarando las regiones de baja complejidad empleando el programa TANTAN (Frith, 2011) con los parámetros por defectos. La búsqueda de los motivos *de novo* se realizó con el programa DRIM (Eden *et al.*, 2007). Este programa permite la identificación de motivos en una lista de secuencias de ADN jerarquizada, es decir, está diseñado especialmente para el análisis de datos obtenidos de microarreglos. Las condiciones que se emplearon del programa son: longitud del motivo: 7 pb; p-valor < 0,001. A continuación se buscaron los motivos en la base de datos PLACE (Higo *et al.*, 1998). Para armar los modelos de las posibles vías donde ASR1 actuaría se buscaron cuáles genes estadísticamente alterados en los microarreglos contenían los motivos sobrerrepresentados obtenidos con el análisis anterior y también cuáles contenían la secuencia consenso de ASR1 (GCCCA; Ricardi *et al.*, 2014) a través del programa FIMO (Grant *et al.*, 2011). Además se realizó la anotación funcional de los genes que contenían cada motivo a través de Mapman (Thimm *et al.*, 2004).

5.28. Estudio de la textura de frutos de tomate

Se evaluó la textura de frutos de tomate de las líneas silenciadas bajo el promotor 35S (AS5, AS17, AS18) durante un ensayo de postcosecha. Los frutos fueron cosechados en

estadio *breaker*, desinfectados superficialmente con hipoclorito de sodio (150 ppm de Cl_2) y almacenados en una cámara de cría en condiciones controladas (temperatura 19°C , humedad 85%). Se midió la textura de frutos de tamaño similar cada siete días durante 21 días con un texturómetro TA.XT Plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems). Las condiciones de las mediciones fueron: velocidad 1 mm s^{-1} , distancia de compresión 3 mm. La firmeza se definió como la máxima fuerza realizada a una deformación constante (3 mm). Se realizaron cuatro mediciones en el eje ecuatorial de cada fruto cada 90° , que luego se promediaron entre sí. Se midieron entre 5 y 6 frutos por línea. El análisis estadístico empleado fue ANOVA.

5.29. Análisis integrados de los datos de metabolómica y transcriptómica

Se realizó un análisis integrado de los datos de metabolómica y de transcriptómica de los frutos maduros de las líneas silenciadas bajo el promotor 35S (AS5 y AS17). En primer lugar se utilizó el programa Mapman (Thimm *et al.*, 2004) para visualizar gráficamente las vías metabólicas primarias donde hubo metabolitos identificados por GC-MS (figura 3.11) y las vías donde hubo transcritos con cambios estadísticamente significativos (tablas 15 y 16 del anexo). Este programa permite visualizar datos de transcritos y metabolitos sobre diagramas de distintas vías metabólicas para facilitar su interpretación. Para el análisis se personalizó una base de datos combinando las bases provistas por Mapman para mapear metabolitos (*Mapping metabolites*) y para mapear transcritos medidos a través de los microarreglos de tomate de Affymetrix (Sly_AFFY_SGN_BUILD2_070709). Se emplearon los datos de los transcritos diferencialmente expresados en las líneas transgénicas (tablas 15 y 16 del anexo) y los datos de todos los metabolitos identificados en frutos de las mismas líneas (figura 3.11). Estos datos se volcaron en un esquema general de las vías metabólicas primarias.

En segundo lugar se realizó un análisis integrado de los datos de expresión de genes y variación de metabolitos no normalizados en los frutos de las líneas silenciadas AS5 y AS17 utilizando un modelo de redes neuronales a través del programa *omeSOM (Milone *et al.*, 2010). Este programa permite la identificación de variaciones coordinadas entre genes y metabolitos. En este caso también se emplearon los datos de los transcritos diferencialmente expresados en las líneas transgénicas (tablas 15 y 16 del anexo) y los datos de todos los metabolitos identificados en frutos y hojas de las mismas líneas (figuras 3.11 y 3.9).

5.30. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos aplicados en cada caso están descritos en cada sección de este capítulo y en las leyendas de las figuras correspondientes. En todos los casos se consideró un nivel de significancia de $p < 0,05$. El orden de las plantas en las mesadas de los invernáculos fue aleatorio. Todas las observaciones fueron independientes entre sí. Previamente al análisis estadístico se realizó un gráfico de cajas para evaluar la presencia de datos atípicos. En todos los casos se presenta la media y el error estándar de cada tratamiento. En los casos en los que se empleó una prueba paramétrica previamente se corroboró el cumplimiento de la normalidad (a través de la prueba de Shapiro-Wilks) y de la homocedasticidad (a través de la prueba de Levene). En el caso de haberse realizado un ANOVA la prueba de comparación empleada fue la de Duncan. Se empleó el programa Infostat para todos los análisis (Di Rienzo *et al.*, 2008), excepto donde se indica lo contrario.

Anexo

Tabla 1. Análisis fenotípico de las líneas transgénicas de tomate para *AsrI* bajo los promotores 35S y B33. Las líneas 35S:*AsrI-sense* (S12, S16, S31), 35S:*AsrI-antisense* (AS5, AS17, AS18), B33:*AsrI-sense* (S3, S12, S21), B33:*AsrI-antisense* (AS17, AS27, AS28) y los controles (WT) fueron evaluados fenotípicamente en tres experimentos independientes (experimentos I, II y III, en las columnas de las tablas). Se evaluaron el peso total de los frutos maduros, el número promedio de frutos maduros por planta, el peso promedio de los frutos maduros y los grados Brix de los frutos maduros. El análisis estadístico se realizó por ANOVA con el método de comparación de Duncan. Los valores estadísticamente significativos se marcan en negrita ($p < 0,05$).

Peso total de frutos maduros		I		II		III	
LÍNEA	Peso (g)		EE	Peso (g)	EE	Peso (g)	EE
35S AS5	483,4	±	84,0	1271,4	±	133,4	370,6 ± 77,0
35S AS17	360,8	±	103,6	1239,3	±	133,4	283,8 ± 77,5
35S AS18	574,2	±	76,3	1508,6	±	133,4	462,7 ± 71,1
35S S12	701,1	±	135,8	1062,0	±	163,4	430,4 ± 71,1
35S S16	673,0	±	24,8	1375,8	±	146,2	480,2 ± 77,7
35S S31	397,9	±	80,2	952,4	±	163,4	204,0 ± 72,8
WT	818,0	±	105,3	1397,4	±	79,3	348,7 ± 46,5
B33 AS17				1083,7	±	115,6	576,8 ± 72,0
B33 AS27				1480,8	±	133,4	469,3 ± 72,6
B33 AS28				1518,6	±	123,5	546,0 ± 65,8
B33 S3				1390,3	±	115,6	470,4 ± 61,6
B33 S12				1121,4	±	98,5	351,4 ± 52,7
B33 S21				1267,3	±	188,7	467,2 ± 87,9

Número de Frutos Promedio		I		II		III	
LÍNEA	Número		EE	Número	EE	Número	EE
35S AS5	14,3	±	3,4	26,1	±	2,8	10,6 ± 2,7
35S AS17	19,3	±	3,3	23,6	±	2,8	9,7 ± 2,6
35S AS18	25,6	±	0,7	28,8	±	2,8	11,8 ± 1,8
35S S12	26,3	±	4,5	27,3	±	2,8	11,8 ± 3,1
35S S16	26,3	±	1,9	25,2	±	3,1	11,8 ± 3,2
35S S31	18,0	±	2,9	25,8	±	3,1	6,0 ± 3,9
WT	33,3	±	2,9	28,7	±	1,7	14,0 ± 1,3
B33 AS17				24,5	±	2,4	16,7 ± 1,7
B33 AS27				36,1	±	2,8	15,3 ± 1,6
B33 AS28				32,1	±	2,6	15,9 ± 3,7
B33 S3				28,6	±	2,4	13,4 ± 1,3
B33 S12				21,0	±	2,0	9,3 ± 2,3
B33 S21				27,0	±	4,0	13,0 ± 1,1

Peso promedio de frutos maduros		I		II		III	
LINEA	Peso (g)		EE	Peso (g)	EE	Peso (g)	EE
35S AS5	24,8	±	0,4	49,0	±	3,7	36,3 ± 1,6
35S AS17	24,3	±	2,2	53,5	±	3,7	36,5 ± 2,4
35S AS18	24,5	±	1,2	52,2	±	3,7	39,6 ± 2,4
35S S12	26,2	±	1,1	40,2	±	3,7	37,9 ± 1,6
35S S16	26,5	±	1,6	55,4	±	4,5	41,2 ± 2,2
35S S31	21,6	±	2,0	44,7	±	4,5	36,0 ± 1,5
WT	22,8	±	0,5	51,4	±	2,2	34,8 ± 2,6
B33 AS17				43,3	±	3,2	38,2 ± 2,8
B33 AS27				41,6	±	4,0	28,0 ± 2,9
B33 AS28				47,4	±	3,4	35,3 ± 1,3
B33 S3				49,3	±	3,2	35,5 ± 1,6
B33 S12				56,8	±	2,6	38,4 ± 1,0
B33 S21				46,4	±	5,2	36,0 ± 1,2

Grados Brix		I		II		III	
LINEA	Grados Brix		EE	Grados Brix	EE	Grados Brix	EE
35S AS5	9,3	±	0,6	4,8	±	0,1	6,5 ± 0,3
35S AS17	9,6	±	0,1	4,3	±	0,1	6,4 ± 0,5
35S AS18	9,6	±	0,3	4,6	±	0,1	7,1 ± 0,4
35S S12	8,2	±	0,1	4,8	±	0,1	6,1 ± 0,3
35S S16	9,1	±	0,3	4,5	±	0,1	6,1 ± 0,5
35S S31	9,0	±	0,0	4,5	±	0,1	5,3 ± 0,4
WT	8,6	±	0,4	4,5	±	0,09	6,0 ± 0,2
B33 AS17				4,6	±	0,1	6,2 ± 0,2
B33 AS27				4,4	±	0,1	5,4 ± 0,3
B33 AS28				4,4	±	0,1	5,8 ± 0,2
B33 S3				4,3	±	0,1	6,1 ± 0,3
B33 S12				4,4	±	0,1	6,3 ± 0,2
B33 S21				4,4	±	0,2	6,5 ± 0,7

Tabla 2. Mediciones de conductancia estomática en hojas de plantas de tomate transgénicas para *AsrI* bajo el control del promotor 35S. Se realizaron tres medidas independientes (conductancias 1 a 3) durante el experimento I en las plantas controles (WT), *anti-sense* (AS5, AS17 y AS18) y *sense* (S12, S16 y S31) en fase vegetativa (6 a 8 hojas expandidas). Las mediciones se realizaron entre las 11 a.m. y las 13 p.m. con un porómetro SC-1 de Decagon Devices Inc. El análisis estadístico se realizó por ANOVA. No se encontraron diferencias significativas entre las plantas transgénicas y el control ($p < 0,05$). EE: error estándar. N=4-6.

Línea	Conductancia 1 ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	EE	Conductancia 2 ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	EE	Conductancia 3 ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	EE
AS5	292,7 ± 50,1		410,8 ± 29,0		381,4 ± 47,8	
AS17	263,4 ± 37,6		506,1 ± 24,4		423,5 ± 42,9	
AS18	291,8 ± 35,8		434,5 ± 48,5		429,3 ± 31,2	
S12	295,0 ± 35,1		560,8 ± 33,0		310,4 ± 37,0	
S16	278,3 ± 33,2		410,0 ± 64,4		394,3 ± 55,0	
S31	312,8 ± 62,9		598,9 ± 61,8		370,8 ± 60,9	
WT	270,5 ± 51,4		519,6 ± 51,5		464,0 ± 105,2	

Tabla 3. Contenidos de glucosa, sacarosa y/o fructosa en frutos de tomate con los niveles de *Asr1* alterados bajo el promotor 35S y B33. A. Datos del Experimento I. B. Datos del Experimento II. C. Datos del Experimento III. Se muestra el promedio del contenido del azúcar especificado y el error estándar (EE). Las mediciones fueron realizadas por el método enzimático. N=3-9. ND: no detectado en el rango dinámico del ensayo. Los datos fueron analizados por la prueba estadística ANOVA. No hubo diferencias significativas ($p < 0,05$). PF: peso fresco.

A.	Glucosa		Sacarosa		Fructosa	
	($\mu\text{mol g PF}^{-1}$ fruto)	EE	($\mu\text{mol g PF}^{-1}$ fruto)	EE	($\mu\text{mol g PF}^{-1}$ fruto)	EE
35SAS5	9,16	± 0,79	4,44	±	0,36	0,009 ± 0,005
35SAS17	9,59	± 0,93	4,53	±	0,62	0,045 ± 0,011
35SAS18	9,91	± 0,58	4,19	±	0,29	ND
35S S12	10,98	± 0,84	4,59	±	0,39	0,024 ± 0,010
35S S16	10,30	± 0,89	4,63	±	0,51	ND
35S S31	10,94	± 1,21	4,87	±	0,65	0,033 ± 0,011
WT	12,17	± 2,47	4,63	±	1,05	0,024 ± 0,006

B.	Glucosa		Sacarosa	
	($\mu\text{mol g PF}^{-1}$ fruto)	EE	($\mu\text{mol g PF}^{-1}$ fruto)	EE
35S AS5	6,44	± 0,97	3,15	± 0,24
35S AS17	5,94	± 0,73	2,05	± 0,18
35S AS18	8,26	± 1,35	3,07	± 0,42
35S S12	7,88	± 1,52	3,07	± 0,62
35S S16	7,16	± 0,63	2,35	± 0,14
35S S31	6,55	± 0,95	2,95	± 0,53
B33 AS17	4,43	± 0,23	1,99	± 0,23
B33 AS27	7,84	± 1,09	3,18	± 0,55
B33 AS28	5,3	± 0,41	2,12	± 0,23
B33 S12	8,1	± 1,19	3,13	± 0,56
B33 S21	6,16	± 1	3,05	± 1,03
B33 S3	6,13	± 0,28	2,17	± 0,28
WT	5,84	± 0,3	2,26	± 0,11

C.	Glucosa		Sacarosa	
	($\mu\text{mol g PF}^{-1}$ fruto)	EE	($\mu\text{mol g PF}^{-1}$ fruto)	EE
35S AS5	3,26	± 0,32	0,99	± 0,53
35S AS17	3,32	± 0,15	0,45	± 0,12
35S AS18	3,60	± 0,08	0,50	± 0,10
35S S12	3,26	± 0,20	0,66	± 0,36
35S S16	2,92	± 0,29	0,70	± 0,27
35S S31	2,61	± 0,28	0,74	± 0,36
B33 AS17	3,25	± 0,17	0,35	± 0,03
B33 AS27	2,90	± 0,22	0,49	± 0,11
B33 AS28	3,07	± 0,14	0,56	± 0,12
B33 S12	3,10	± 0,34	0,25	± 0,10
B33 S21	3,14	± 0,09	0,92	± 0,43
B33 S3	3,15	± 0,22	0,63	± 0,18
WT	3,12	± 0,27	0,67	± 0,48

Tabla 4. Contenidos de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) en hojas de plantas de tomate con los niveles de *Asr1* alterados bajo el promotor 35S y bajo el promotor B33. Datos del Experimento I (A), II (B) y III (C). Se muestran valores promedio y el error estándar (EE). Las mediciones fueron realizadas por el método enzimático. ND: no detectado en el rango dinámico del ensayo. Los datos fueron analizados por la prueba estadística ANOVA. N= 3-6. No se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$). PF: peso fresco.

A.	Glucosa		Fructosa		Sacarosa	
	($\mu\text{mol g PF}^{-1}$ hoja)	EE	($\mu\text{mol g PF}^{-1}$ hoja)	EE	($\mu\text{mol g PF}^{-1}$ hoja)	EE
35S AS5	0,285	± 0,045	0,492	± 0,113	0,189	± 0,048
35S AS17	0,687	± 0,372	0,587	± 0,120	0,137	± 0,075
35S AS18	0,775	± 0,038	0,906	± 0,180	0,147	± 0,057
35S S12	0,424	± 0,043	0,716	± 0,061	0,185	± 0,044
35S S16	0,596	± 0,115	0,752	± 0,124	0,091	± 0,034
35S S31	0,228	± 0,092	0,342	± 0,152	0,146	± 0,029
WT	0,519	± 0,051	0,685	± 0,108	0,322	± 0,142

B.	Glucosa		Sacarosa	
	($\mu\text{mol g PF}^{-1}$ hoja)	EE	($\mu\text{mol g PF}^{-1}$ hoja)	EE
35S AS5	1,126	± 0,513	0,631	± 0,0331
35S AS17	1,442	± 0,158	0,672	± 0,0348
35S AS18	0,975	± 0,506	0,562	± 0,0234
35S S12	0,998	± 0,522	0,756	± 0,0345
35S S16	1,140	± 0,220	0,567	± 0,0256
35S S31	1,196	± 0,468	0,847	± 0,0622
B33 AS17	0,898	± 0,056	0,435	± 0,0631
B33 AS27	0,914	± 0,189	0,773	± 0,0456
B33 AS28	1,099	± 0,248	0,890	± 0,0561
B33 S12	1,698	± 0,199	0,769	± 0,0489
B33 S21	0,324	± 0,281	0,788	± 0,0540
B33 S3	1,577	± 0,234	0,679	± 0,0321
WT	1,425	± 0,407	0,732	± 0,0340

C.	Glucosa		Fructosa		Sacarosa	
	($\mu\text{mol g PF}^{-1}$ hoja)	EE	($\mu\text{mol g PF}^{-1}$ hoja)	E.E.	($\mu\text{mol g PF}^{-1}$ hoja)	EE
35S AS5	0,221	± 0,023	0,086	± 0,018	0,409	± 0,023
35S AS17	0,327	± 0,063	0,146	± 0,036	0,323	± 0,034
35S AS18	0,225	± 0,025	ND		0,347	± 0,044
35S S12	0,276	± 0,029	0,053	± 0,025	0,303	± 0,017
35S S16	0,314	± 0,005	0,058	± 0,024	0,409	± 0,046
35S S31	0,211	± 0,070	ND		0,297	± 0,042
B33 AS17	0,320	± 0,056	0,196	± 0,078	0,355	± 0,047
B33 AS27	0,199	± 0,054	0,120	± 0,083	0,422	± 0,064
B33 AS28	0,308	± 0,093	0,077	± 0,052	0,449	± 0,041
B33 S12	0,329	± 0,012	0,079	± 0,073	0,337	± 0,050
B33 S21	0,325	± 0,023	0,151	± 0,021	0,388	± 0,058
B33 S3	0,216	± 0,015	0,139	± 0,097	0,357	± 0,029
WT	0,298	± 0,076	0,074	± 0,018	0,314	± 0,051

Tabla 5. Metabolitos de hojas fuentes de plantas de tomate con *AsrI* en sentido (S) y en antisentido (AS) bajo el promotor 35S en el experimento I. Niveles de cambio de los metabolitos en las líneas transgénicas en comparación con las plantas controles (WT) durante el experimento I. Se muestran los cocientes de intensidades medios \pm EE (error estándar) del cociente. N=3-6. Los valores en negrita indican diferencias significativas por ANOVA (método de comparación: prueba de Duncan). Todos los metabolitos fueron medidos por GC-MS.

	AS5/WT	\pm	EE	AS17/WT	\pm	EE	AS18/WT	\pm	EE	S12/WT	\pm	EE	S16/WT	\pm	EE	S31/WT	\pm	EE
1,3-Dihidroxiacetona	1,02	\pm	0,29	0,62	\pm	0,19	0,70	\pm	0,28	0,77	\pm	0,21	0,88	\pm	0,36	1,13	\pm	0,39
Ácido 2-amino-adípico	0,34	\pm	0,17	0,38	\pm	0,20	0,52	\pm	0,22	0,66	\pm	0,17	0,61	\pm	0,18	1,04	\pm	0,23
Ácido aspártico	0,98	\pm	0,28	0,81	\pm	0,20	0,74	\pm	0,25	0,74	\pm	0,21	0,89	\pm	0,29	1,75	\pm	0,32
Ácido cis-3-cafeoil-quinico	0,35	\pm	0,19	0,91	\pm	0,13	0,94	\pm	0,23	0,47	\pm	0,22	0,36	\pm	0,20	1,00	\pm	0,20
Ácido fosfórico	1,01	\pm	0,48	0,87	\pm	0,37	0,93	\pm	0,37	1,42	\pm	0,62	0,69	\pm	0,33	2,14	\pm	0,82
Ácido fumárico	1,46	\pm	0,23	0,65	\pm	0,11	0,60	\pm	0,13	0,73	\pm	0,18	0,89	\pm	0,29	1,34	\pm	0,26
Ácido glicérico	1,03	\pm	0,25	0,56	\pm	0,13	0,59	\pm	0,17	0,59	\pm	0,17	0,72	\pm	0,19	0,94	\pm	0,18
Ácido glutámico	0,76	\pm	0,15	0,79	\pm	0,15	0,67	\pm	0,19	0,81	\pm	0,22	0,74	\pm	0,20	1,20	\pm	0,40
Ácido málico	1,06	\pm	0,17	0,74	\pm	0,11	0,79	\pm	0,21	0,82	\pm	0,17	0,88	\pm	0,21	1,19	\pm	0,19
Ácido malónico	0,67	\pm	0,30	0,54	\pm	0,21	0,60	\pm	0,24	0,75	\pm	0,32	0,61	\pm	0,26	1,09	\pm	0,42
Ácido nicotínico	1,13	\pm	0,23	0,86	\pm	0,16	0,94	\pm	0,23	1,00	\pm	0,17	0,94	\pm	0,23	1,50	\pm	0,25
Ácido nonoico	0,44	\pm	0,27	0,35	\pm	0,22	0,35	\pm	0,22	0,43	\pm	0,27	0,66	\pm	0,48	0,62	\pm	0,40
Ácido piroglutámico	1,05	\pm	0,25	0,67	\pm	0,16	0,66	\pm	0,21	0,72	\pm	0,17	0,71	\pm	0,20	1,82	\pm	0,39
Ácido salicílico	0,80	\pm	0,25	1,08	\pm	0,40	1,12	\pm	0,38	1,29	\pm	0,48	0,99	\pm	0,41	1,04	\pm	0,33
Ácido succínico	0,92	\pm	0,25	0,64	\pm	0,17	0,71	\pm	0,22	0,81	\pm	0,26	0,88	\pm	0,29	1,01	\pm	0,29
Ácido trans-3-cafeoil-quinico	0,42	\pm	0,14	0,66	\pm	0,26	0,60	\pm	0,30	0,66	\pm	0,21	0,48	\pm	0,15	0,89	\pm	0,32
Ácido trans-5-cafeoil-quinico	0,38	\pm	0,25	0,32	\pm	0,14	0,27	\pm	0,20	0,49	\pm	0,23	0,27	\pm	0,10	0,83	\pm	0,34
Beta-alanina	0,72	\pm	0,54	0,42	\pm	0,23	0,46	\pm	0,35	0,61	\pm	0,45	0,52	\pm	0,35	1,22	\pm	0,80
Ácido treónico	0,87	\pm	0,25	0,73	\pm	0,20	0,80	\pm	0,23	0,71	\pm	0,18	0,93	\pm	0,28	1,14	\pm	0,29
Alanina	1,84	\pm	0,83	0,96	\pm	0,37	0,84	\pm	0,42	0,78	\pm	0,30	0,89	\pm	0,46	2,15	\pm	0,86
Asparagina	2,44	\pm	1,13	0,94	\pm	0,33	0,61	\pm	0,22	1,41	\pm	0,44	0,97	\pm	0,41	9,60	\pm	4,15
Calistegina B2	0,12	\pm	0,05	0,43	\pm	0,24	0,47	\pm	0,25	0,46	\pm	0,26	0,45	\pm	0,30	0,54	\pm	0,27
Cisteína	0,98	\pm	0,28	0,93	\pm	0,24	0,65	\pm	0,18	0,85	\pm	0,24	0,85	\pm	0,26	1,44	\pm	0,34
Eritrosa	1,11	\pm	0,24	0,82	\pm	0,18	1,02	\pm	0,26	3,33	\pm	1,27	0,77	\pm	0,20	1,00	\pm	0,20
Fenilalanina	0,83	\pm	0,16	1,00	\pm	0,29	0,70	\pm	0,29	0,68	\pm	0,18	0,68	\pm	0,18	1,24	\pm	0,23
Glicerol	1,41	\pm	0,61	0,94	\pm	0,27	5,23	\pm	2,36	9,12	\pm	8,56	0,96	\pm	0,34	1,75	\pm	0,52
Glucosa-6-fosfato	0,71	\pm	0,28	0,87	\pm	0,30	0,82	\pm	0,29	1,07	\pm	0,43	0,66	\pm	0,28	1,32	\pm	0,44
Glicina	1,68	\pm	0,54	0,41	\pm	0,14	0,71	\pm	0,27	0,54	\pm	0,18	0,91	\pm	0,34	1,13	\pm	0,40
Isoleucina	1,27	\pm	0,31	0,86	\pm	0,22	0,89	\pm	0,26	1,09	\pm	0,28	0,97	\pm	0,30	2,18	\pm	0,57
Leucina	1,37	\pm	0,34	0,97	\pm	0,24	0,79	\pm	0,20	1,13	\pm	0,24	1,03	\pm	0,26	2,25	\pm	0,59
Metionina	1,09	\pm	0,50	1,15	\pm	0,43	1,32	\pm	0,54	1,47	\pm	0,77	0,87	\pm	0,33	2,74	\pm	0,94
Mioinositol	1,07	\pm	0,18	0,90	\pm	0,14	0,92	\pm	0,23	0,92	\pm	0,16	0,94	\pm	0,20	1,23	\pm	0,19
Noradrenalina	0,42	\pm	0,10	1,00	\pm	0,12	0,18	\pm	0,08	0,34	\pm	0,08	0,48	\pm	0,18	0,32	\pm	0,09
Prolina	0,54	\pm	0,17	0,39	\pm	0,12	0,41	\pm	0,16	0,47	\pm	0,19	0,45	\pm	0,19	1,33	\pm	0,51
Putrescina	1,11	\pm	0,32	0,84	\pm	0,20	0,70	\pm	0,24	1,10	\pm	0,24	0,97	\pm	0,27	2,99	\pm	0,77
Ramnosa	0,88	\pm	0,26	0,97	\pm	0,20	0,75	\pm	0,21	0,89	\pm	0,24	0,85	\pm	0,22	1,59	\pm	0,36
Sacarosa	1,14	\pm	0,18	0,91	\pm	0,13	0,95	\pm	0,24	0,96	\pm	0,15	0,92	\pm	0,19	1,24	\pm	0,18
Serina	1,19	\pm	0,37	0,61	\pm	0,20	0,63	\pm	0,22	0,90	\pm	0,30	0,85	\pm	0,33	1,84	\pm	0,58
Sorbosa	0,89	\pm	0,20	1,01	\pm	0,17	1,00	\pm	0,28	1,04	\pm	0,20	0,92	\pm	0,19	1,26	\pm	0,22
Tiramina	0,69	\pm	0,15	0,80	\pm	0,25	0,73	\pm	0,21	0,76	\pm	0,20	0,68	\pm	0,22	1,22	\pm	0,24
Trans-4-hidroxi-Prolina	1,01	\pm	0,27	0,71	\pm	0,18	0,63	\pm	0,17	0,70	\pm	0,21	0,84	\pm	0,27	1,32	\pm	0,33

Treonina	1,14	±	0,35	0,70	±	0,22	0,75	±	0,26	0,86	±	0,28	0,86	±	0,32	1,87	±	0,55
Valina	1,04	±	0,24	0,81	±	0,19	0,77	±	0,22	0,78	±	0,18	0,85	±	0,25	1,67	±	0,39

Tabla 6. Metabolitos de hojas fuentes de plantas de tomate con *AsrI* en sentido (S) y en antisentido (AS) bajo el promotor 35S en el experimento II. Niveles de cambio de los metabolitos en las líneas transgénicas en comparación con las plantas controles (WT) durante el experimento II. Se muestra la media y el error estándar (EE). Los metabolitos fueron medidos por GC-MS. El análisis estadístico realizado fue ANOVA con el método de comparación de Duncan. Las variables estadísticamente significativas se marcaron en negrita. N=3-6.

	35S AS5 ± EE		35S AS17 ± EE		35S AS18 ± EE		35S S12 ± EE		35S S16 ± EE		35S S31 ± EE	
1-O-												
metilglucopiranosido	0,86	± 1,12	1,25	± 1,12	1,01	± 1,29	0,47	± 1,29	0,94	± 1,12	0,50	± 1,29
2-amino-deoxiglucosa	1,31	± 1,29	1,97	± 1,11	1,04	± 1,29	0,62	± 1,29	1,88	± 1,11	0,52	± 1,29
3-metoxi-tiramina	1,33	± 1,12	0,87	± 1,29	0,97	± 1,29	1,08	± 1,29	0,22	± 1,12	1,04	± 1,29
4-hidroxi-prolina	0,98	± 1,12	1,02	± 1,12	1,00	± 1,32	0,99	± 1,32	0,84	± 1,12	0,76	± 1,32
5-hidroxi-triptamina	2,11	± 1,16	2,45	± 1,00	1,77	± 1,16	0,44	± 1,16	2,27	± 1,16	3,92	± 1,16
ácido 1,4-galactolactona	1,26	± 1,00	1,09	± 1,00	0,74	± 1,17	0,30	± 1,17	1,22	± 1,00	0,35	± 1,17
ácido 1,4-gluconolactona	1,02	± 1,10	0,89	± 1,30	0,95	± 1,30	0,87	± 1,30	1,07	± 1,10	0,89	± 1,30
ácido 2-oxoglucónico	0,65	± 1,11	0,81	± 1,29	0,87	± 1,29	0,91	± 1,29	0,18	± 1,11	0,66	± 1,29
ácido 2-oxoglutarico	1,08	± 1,13	0,20	± 1,30	0,66	± 1,30	0,14	± 1,30	0,37	± 1,13	0,28	± 1,30
ácido 3-cafeoilquinico	1,22	± 1,15	1,07	± 1,00	1,05	± 1,15	0,69	± 1,15	0,94	± 1,15	0,44	± 1,15
ácido 3-cinámico	1,29	± 1,00	0,92	± 1,16	1,11	± 1,00	1,00	± 1,16	1,43	± 1,00	0,75	± 1,16
ácido 3-hidroxicinámico	1,10	± 1,14	1,00	± 1,29	0,86	± 1,29	0,66	± 1,29	0,97	± 1,29	0,48	± 1,29
ácido 3-hidroxipiruvico	1,08	± 1,12	0,61	± 1,12	0,71	± 1,29	0,70	± 1,29	1,07	± 1,29	1,23	± 1,12
ácido 3-indolacético	0,77	± 1,12	1,10	± 1,12	1,07	± 1,29	0,76	± 1,29	0,67	± 1,12	0,98	± 1,29
ácido 4-aminobutanoico	0,87	± 1,29	0,58	± 1,12	0,40	± 1,29	0,53	± 1,29	0,41	± 1,29	0,93	± 1,29
ácido abscísico	1,11	± 1,12	0,88	± 1,29	0,98	± 1,29	0,97	± 1,29	1,00	± 1,12	0,93	± 1,29
ácido ascórbico	1,02	± 1,11	0,90	± 1,28	0,96	± 1,28	0,87	± 1,28	1,07	± 1,11	0,88	± 1,28
ácido aspártico	1,33	± 1,00	1,97	± 1,00	1,58	± 1,15	1,45	± 1,15	1,86	± 1,00	1,59	± 1,15
ácido cítrico	0,67	± 1,12	0,80	± 1,29	0,87	± 1,29	0,93	± 1,29	0,20	± 1,12	0,57	± 1,12
ácido dehidroascórbico	0,81	± 1,00	0,95	± 1,00	4,53	± 1,16	0,36	± 1,16	2,21	± 1,00	0,40	± 1,16
ácido fenilpiruvico	1,34	± 1,16	1,01	± 1,16	1,13	± 1,16	1,05	± 1,16	1,52	± 1,00	0,90	± 1,16
ácido fosfoenolpiruvico	2,02	± 1,00	1,81	± 1,00	1,98	± 1,17	1,55	± 1,17	1,79	± 1,00	1,69	± 1,17
ácido fosfórico	0,76	± 1,29	0,60	± 1,29	0,66	± 1,29	0,93	± 1,29	1,05	± 1,12	1,70	± 1,29
ácido fumárico	1,63	± 1,00	1,45	± 1,00	1,47	± 1,15	1,82	± 1,15	1,23	± 1,00	1,09	± 1,15
ácido glicérico	1,47	± 1,29	1,00	± 1,12	1,08	± 1,29	0,84	± 1,29	1,00	± 1,12	0,71	± 1,29
ácido glucónico	1,17	± 1,00	1,41	± 1,00	1,20	± 1,17	0,39	± 1,17	1,54	± 1,17	0,52	± 1,17
ácido glucurónico	1,18	± 1,00	1,37	± 1,00	1,20	± 1,15	0,41	± 1,15	1,59	± 1,15	0,51	± 1,15
ácido glucurónico-3,6-lactona	1,17	± 1,00	2,59	± 1,00	1,29	± 1,16	0,61	± 1,16	1,24	± 1,16	0,60	± 1,16
ácido glutámico	0,79	± 1,00	0,70	± 1,00	1,21	± 1,00	0,43	± 1,00	0,58	± 0,87	1,12	± 1,00
ácido isoascórbico	1,11	± 0,87	2,47	± 0,87	1,32	± 1,00	0,60	± 1,00	1,16	± 1,00	0,55	± 1,00
ácido lixónico	1,39	± 1,20	0,92	± 1,00	0,81	± 1,20	0,60	± 1,20	0,95	± 1,00	0,66	± 1,20
ácido málico	1,04	± 1,29	1,00	± 1,12	0,98	± 1,29	0,96	± 1,29	0,85	± 1,12	0,76	± 1,29
ácido mevalónico-1,5-lactona	1,01	± 1,12	0,61	± 1,12	0,42	± 1,29	0,55	± 1,29	0,43	± 1,29	0,96	± 1,29
ácido quinico	1,36	± 1,29	0,84	± 1,12	1,11	± 1,29	0,33	± 1,29	1,06	± 1,29	0,21	± 1,29
ácido sacárico	0,81	± 1,11	0,72	± 1,11	1,56	± 1,30	0,26	± 1,30	1,58	± 1,30	0,92	± 1,30
ácido shikímico	1,07	± 0,87	0,81	± 1,00	1,05	± 1,00	0,81	± 1,00	0,91	± 0,87	0,69	± 1,00
ácido subérico	0,79	± 1,31	0,76	± 1,13	0,97	± 1,31	0,44	± 1,31	0,59	± 1,13	0,57	± 1,31
ácido succínico	0,93	± 1,13	0,97	± 1,13	0,99	± 1,30	0,70	± 1,30	0,83	± 1,13	0,77	± 1,30
ácido treónico	1,11	± 1,13	1,68	± 1,13	1,35	± 1,30	0,92	± 1,30	1,42	± 1,13	0,68	± 1,30
alanina	1,05	± 1,29	0,62	± 1,12	0,69	± 1,29	0,68	± 1,29	1,07	± 1,29	1,22	± 1,12
alfa-lactosa	0,56	± 1,29	1,31	± 1,14	0,72	± 1,29	0,59	± 1,29	0,53	± 1,14	0,78	± 1,29
arabinosa	1,02	± 1,15	0,89	± 1,00	0,82	± 1,15	0,65	± 1,15	0,95	± 1,00	0,68	± 1,15
Arabinosa/xilosa/lixosa	0,90	± 1,12	1,17	± 1,30	0,94	± 1,30	0,73	± 1,30	1,14	± 1,12	0,91	± 1,12
asparagina	0,46	± 1,15	0,54	± 1,00	0,31	± 1,15	0,54	± 1,15	1,15	± 1,00	19,23	± 1,42
etanolamina	2,22	± 1,15	1,14	± 1,00	0,99	± 1,15	0,91	± 1,15	1,98	± 1,15	1,30	± 1,15
fenilalanina	1,41	± 1,00	1,09	± 1,00	1,12	± 1,16	1,01	± 1,16	1,02	± 1,00	1,22	± 1,16
fructosa	1,21	± 1,00	0,90	± 1,16	1,18	± 1,16	1,05	± 1,16	1,48	± 1,00	0,87	± 1,16

fructosa-6-fosfato	0,92	±	1,00	0,77	±	1,00	1,08	±	1,00	1,08	±	1,00	1,08	±	1,00	1,15	±	1,00
galactinol	1,82	±	1,00	1,53	±	1,00	1,45	±	1,16	1,00	±	1,16	2,21	±	1,16	1,42	±	1,16
galactosa	1,43	±	1,00	1,15	±	1,15	1,37	±	1,15	1,08	±	1,15	1,91	±	1,00	0,85	±	1,15
gliceraldehido	1,26	±	1,29	0,14	±	1,29	0,15	±	1,29	1,97	±	1,29	0,17	±	1,29	1,63	±	1,12
gliceroaldopiranosido	0,98	±	1,13	1,08	±	1,13	0,96	±	1,30	0,66	±	1,30	0,71	±	1,13	1,06	±	1,30
glicina	2,53	±	1,00	1,16	±	1,00	1,28	±	1,16	0,89	±	1,16	1,97	±	1,16	1,32	±	1,16
glucopiranososa	1,04	±	0,86	2,20	±	0,86	1,26	±	1,00	0,62	±	1,00	1,32	±	0,86	0,55	±	1,00
glucosa	1,18	±	1,12	0,91	±	1,29	0,89	±	1,29	0,74	±	1,29	1,08	±	1,29	0,47	±	1,29
glucosa-6-fosfato	1,00	±	1,00	0,72	±	1,17	0,97	±	1,17	1,19	±	1,17	1,25	±	1,00	1,17	±	1,17
glutamina	2,18	±	1,15	2,03	±	1,00	2,03	±	1,15	2,32	±	1,15	2,03	±	1,00	2,27	±	1,15
homoserina	0,99	±	1,13	1,00	±	1,13	0,99	±	1,30	0,97	±	1,30	0,87	±	1,13	0,78	±	1,30
homoserina	0,82	±	1,00	0,76	±	1,00	1,24	±	1,00	0,59	±	1,00	0,71	±	1,00	1,18	±	1,00
indol 3 acetaldehído	1,02	±	1,00	0,91	±	1,33	0,98	±	1,33	0,88	±	1,33	1,05	±	1,00	0,88	±	1,33
isoleucina	1,02	±	1,30	0,72	±	1,12	0,80	±	1,30	0,77	±	1,30	0,89	±	1,12	1,67	±	1,30
leucina	0,98	±	1,29	0,57	±	1,12	0,65	±	1,29	0,99	±	1,29	0,68	±	1,12	2,23	±	1,29
lisina	1,16	±	1,11	0,78	±	1,11	0,62	±	1,30	1,09	±	1,30	0,74	±	1,11	1,72	±	1,30
maltosa	0,77	±	1,30	1,42	±	1,30	0,97	±	1,30	1,11	±	1,30	0,67	±	1,13	1,84	±	1,30
metionina	1,14	±	1,00	0,73	±	1,00	0,95	±	1,13	0,75	±	1,13	1,55	±	1,00	1,04	±	1,13
mioinositol	1,02	±	1,12	0,89	±	1,29	0,98	±	1,29	0,92	±	1,29	1,07	±	1,12	0,93	±	1,29
n-acetil-glutámico	1,30	±	1,00	0,99	±	1,15	1,22	±	1,15	1,06	±	1,15	1,62	±	1,00	0,87	±	1,15
nicotinamida	1,03	±	1,12	0,64	±	1,12	0,45	±	1,30	0,59	±	1,30	0,45	±	1,12	0,99	±	1,30
norleucina	0,98	±	0,89	0,89	±	1,00	0,97	±	1,00	0,97	±	0,89	0,83	±	0,89	0,67	±	1,00
o-																		
metilgalactopiranosido	1,34	±	1,16	0,99	±	1,16	1,16	±	1,16	1,05	±	1,16	1,53	±	1,00	0,86	±	1,16
ornitina	2,67	±	1,30	0,79	±	1,13	0,74	±	1,30	1,99	±	1,30	0,65	±	1,13	0,76	±	1,30
Ortinitinalactama	1,06	±	1,29	0,90	±	1,29	0,99	±	1,29	1,02	±	1,12	0,98	±	1,12	0,86	±	1,29
prolina	0,34	±	1,12	0,22	±	1,29	0,29	±	1,29	0,19	±	1,29	0,27	±	1,12	0,55	±	1,29
ramnosa	0,81	±	1,13	1,22	±	1,13	0,92	±	1,30	0,81	±	1,30	0,71	±	1,13	1,09	±	1,30
sacarosa	1,11	±	1,12	0,90	±	1,29	0,99	±	1,29	1,04	±	1,29	1,09	±	1,12	1,01	±	1,29
salicilaldehído-beta-																		
glucopiranosido	0,73	±	1,08	1,00	±	1,25	0,95	±	1,25	1,18	±	1,25	0,65	±	1,08	2,03	±	1,25
serina	1,07	±	1,12	0,60	±	1,12	0,69	±	1,29	0,68	±	1,29	1,04	±	1,29	1,03	±	1,29
tiramina	1,08	±	1,00	0,71	±	1,00	0,74	±	1,16	0,54	±	1,16	0,97	±	1,00	1,61	±	1,16
tirosina	0,83	±	1,15	0,59	±	1,15	0,73	±	1,15	0,89	±	1,15	0,54	±	1,00	2,79	±	1,15
treonina	1,04	±	1,12	0,90	±	1,12	1,04	±	1,29	0,64	±	1,29	1,34	±	1,12	1,06	±	1,29
urea	1,91	±	1,00	0,80	±	1,15	1,25	±	1,15	1,58	±	1,15	0,91	±	1,00	1,29	±	1,15
Valina	1,62	±	1,15	1,07	±	1,00	1,02	±	1,15	1,17	±	1,15	1,30	±	1,15	1,67	±	1,15

Tabla 7. Metabolitos de hojas fuentes de plantas de tomate con *AsrI* en sentido (S) y en antisentido(AS) bajo el promotor B33 en el experimento II. Niveles de cambio de los metabolitos en las líneas transgénicas en comparación con las plantas controles (WT) durante el experimento II. Se muestra la media y el error estándar (EE). Los metabolitos fueron medidos por GC-MS. El análisis estadístico realizado fue ANOVA con el método de comparación de Duncan. Las variables estadísticamente significativas se marcaron en negrita. N=3-6.

	B33 AS17 ± EE		B33 AS27 ± EE		B33 AS28 ± EE		B33 S3 ± EE		B33 S12 ± EE		B33 S21 ± EE	
1-O-												
metilglucopiranosido	0,87	± 1,12	0,99	± 1,00	0,72	± 1,00	0,99	± 1,29	0,40	± 1,12	1,31	± 1,12
2-amino-deoxiglucosa	0,72	± 1,11	1,03	± 1,00	0,27	± 1,29	1,35	± 1,11	0,36	± 1,11	3,60	± 1,11
3-metoxi-tiramina	1,80	± 1,12	1,58	± 1,12	0,59	± 1,12	0,58	± 1,29	1,82	± 1,00	0,63	± 1,12
4-hidroxi-prolina	0,93	± 1,12	1,27	± 1,00	0,96	± 1,00	1,10	± 1,12	1,06	± 1,00	0,92	± 1,12
5-hidroxi-triptamina	3,46	± 1,00	2,41	± 0,90	1,42	± 1,00	2,34	± 1,16	2,28	± 0,90	5,88	± 1,00
ácido 1,4-galactolactona	0,65	± 1,00	0,83	± 0,83	0,65	± 0,83	1,00	± 1,00	0,43	± 1,17	1,65	± 1,00
ácido 1,4-gluconolactona	1,01	± 1,10	1,21	± 1,00	0,95	± 1,30	1,04	± 1,30	1,02	± 1,30	1,03	± 1,10
ácido 2-oxoglucónico	1,17	± 1,11	0,81	± 1,29	0,49	± 1,11	1,02	± 1,11	0,72	± 1,00	0,19	± 1,11
ácido 2-oxoglucúrico	0,21	± 1,13	1,01	± 1,00	0,63	± 1,00	0,53	± 1,13	0,35	± 1,13	0,38	± 1,13
ácido 3-cafeoilquinico	0,56	± 1,00	1,25	± 0,89	1,02	± 0,89	0,99	± 1,00	0,89	± 0,89	4,16	± 1,00
ácido 3-cinámico	0,79	± 1,00	1,12	± 0,89	0,55	± 0,89	0,82	± 1,00	0,73	± 0,89	1,36	± 1,00
ácido 3-hidroxicinámico	0,79	± 1,14	0,86	± 1,00	0,41	± 1,00	1,00	± 1,14	0,48	± 1,00	1,66	± 1,14
ácido 3-hidroxipirúvico	0,45	± 1,12	0,86	± 1,00	0,77	± 1,29	0,53	± 1,29	0,88	± 1,29	0,68	± 1,12
ácido 3-indolacético	1,07	± 1,12	1,23	± 1,00	0,83	± 1,00	1,22	± 1,12	0,88	± 1,00	0,93	± 1,12
ácido 4-aminobutanoico	0,50	± 1,12	0,65	± 1,00	0,63	± 1,12	0,50	± 1,29	0,72	± 1,00	0,36	± 1,12
ácido abscísico	0,93	± 1,12	1,11	± 1,12	0,90	± 1,00	1,09	± 1,29	1,07	± 1,00	1,03	± 1,12
ácido ascórbico	1,01	± 1,11	1,28	± 1,00	0,94	± 1,28	1,05	± 1,28	1,01	± 1,00	1,04	± 1,11
ácido aspártico	1,33	± 1,00	1,30	± 1,00	1,76	± 0,90	0,87	± 1,15	1,60	± 0,90	0,89	± 1,00
ácido cítrico	1,20	± 1,12	0,84	± 1,29	0,51	± 1,12	1,03	± 1,12	0,75	± 1,00	0,21	± 1,12
ácido dehidroascórbico	0,33	± 1,16	0,67	± 1,00	1,01	± 0,90	1,94	± 1,16	0,67	± 0,90	2,74	± 1,00
ácido fenilpirúvico	1,06	± 1,00	1,28	± 0,90	0,78	± 0,90	0,95	± 1,00	1,01	± 0,90	1,47	± 1,00
ácido fosfoenolpirúvico	1,21	± 1,00	1,57	± 1,00	3,88	± 0,90	1,40	± 1,17	1,31	± 1,00	3,79	± 1,00
ácido fosfórico	0,89	± 1,12	1,13	± 1,00	0,61	± 1,12	1,01	± 1,29	2,20	± 1,00	0,79	± 1,12
ácido fumárico	1,04	± 1,00	2,01	± 0,89	1,53	± 1,00	1,45	± 1,15	1,07	± 1,00	1,62	± 1,00
ácido glicérico	0,94	± 1,12	1,14	± 1,00	0,88	± 1,00	1,34	± 1,29	0,87	± 1,00	0,81	± 1,12
ácido glucónico	0,89	± 1,00	1,11	± 0,92	0,69	± 1,17	1,81	± 1,17	0,46	± 1,00	2,04	± 1,00
ácido glucurónico	0,86	± 1,00	1,11	± 0,88	0,63	± 1,00	1,74	± 1,15	0,45	± 1,00	1,95	± 1,00
ácido glucurónico-3,6-lactona	2,73	± 1,00	1,50	± 0,90	0,89	± 1,00	1,60	± 1,00	0,74	± 1,16	2,80	± 1,00
ácido glutámico	0,44	± 0,87	0,99	± 0,77	0,85	± 0,77	1,08	± 0,87	0,90	± 0,77	0,28	± 0,87
ácido isoascórbico	3,50	± 0,77	1,40	± 0,77	0,59	± 0,87	1,55	± 0,87	0,76	± 0,77	3,17	± 0,87
ácido lixónico	0,82	± 1,00	0,69	± 0,93	1,01	± 0,93	1,02	± 1,00	0,62	± 1,00	1,47	± 1,00
ácido málico	0,88	± 1,12	1,26	± 1,00	0,95	± 1,00	1,02	± 1,29	1,03	± 1,00	0,91	± 1,12
ácido mevalónico-1,5-lactona	0,54	± 1,12	0,67	± 1,00	0,66	± 1,12	0,55	± 1,12	0,75	± 1,00	0,37	± 1,12
ácido quínico	0,54	± 1,12	0,86	± 1,00	0,79	± 1,00	0,97	± 1,12	0,50	± 1,00	2,32	± 1,12
ácido sacárico	0,84	± 1,11	0,60	± 1,11	0,70	± 1,00	1,17	± 1,30	1,11	± 1,11	0,52	± 1,11
ácido shikímico	0,92	± 0,87	1,17	± 0,77	0,81	± 0,87	0,99	± 1,00	1,08	± 0,77	1,19	± 0,87
ácido subérico	0,61	± 1,13	1,03	± 1,00	0,86	± 1,00	0,76	± 1,13	0,62	± 1,00	0,85	± 1,31
ácido succínico	0,52	± 1,13	1,00	± 1,00	0,99	± 1,00	1,37	± 1,13	0,85	± 1,00	0,89	± 1,13
ácido treónico	0,77	± 1,13	0,98	± 1,00	1,17	± 1,00	1,54	± 1,13	0,91	± 1,13	2,51	± 1,13
alanina	0,44	± 1,20	0,85	± 1,00	0,79	± 1,29	0,81	± 1,12	1,15	± 1,00	0,69	± 1,12
alfa-lactosa	1,00	± 1,14	1,50	± 1,00	0,84	± 1,14	1,47	± 1,14	0,88	± 1,00	0,72	± 1,14
arabinosa	0,81	± 1,00	0,78	± 1,15	0,99	± 1,15	1,00	± 1,00	0,67	± 1,00	1,39	± 1,00
Arabinosa/xilosa/lixosa	1,18	± 1,12	0,81	± 1,12	0,51	± 1,12	1,13	± 1,12	0,73	± 1,12	1,65	± 1,12
asparagina	0,69	± 1,00	0,77	± 0,88	1,62	± 0,88	1,08	± 1,42	1,08	± 1,00	0,46	± 1,00
etanolamina	0,59	± 1,00	0,99	± 1,00	0,49	± 1,00	1,02	± 1,15	0,84	± 1,00	1,95	± 1,00
fenilalanina	0,90	± 1,00	1,18	± 0,90	0,94	± 1,00	1,16	± 1,00	0,97	± 1,00	1,53	± 1,00
fructosa	0,90	± 1,00	1,24	± 0,90	0,69	± 0,90	0,81	± 1,00	0,94	± 0,90	1,34	± 1,00

fructosa-6-fosfato	0,62	±	1,00	0,77	±	1,00	0,77	±	1,00	0,69	±	1,00	1,15	±	1,00	0,92	±	1,00
galactinol	1,27	±	1,00	1,50	±	0,89	1,53	±	0,89	1,54	±	1,16	1,25	±	0,89	2,98	±	1,00
galactosa	1,36	±	1,15	1,32	±	0,89	0,69	±	0,89	1,26	±	1,15	0,87	±	0,89	1,88	±	1,00
gliceraldehído	0,73	±	1,12	2,04	±	1,00	1,49	±	1,00	2,88	±	1,29	0,17	±	1,12	2,80	±	1,12
gliceroaldopiranosido	1,21	±	1,13	1,05	±	1,00	0,70	±	1,13	1,25	±	1,13	0,79	±	1,13	0,98	±	1,13
glicina	0,59	±	1,00	1,00	±	1,00	0,48	±	1,00	1,00	±	1,16	0,82	±	1,00	2,01	±	1,00
glucopiranososa	2,45	±	0,86	1,34	±	0,77	0,68	±	0,86	1,40	±	0,86	0,73	±	0,77	2,65	±	0,86
glucosa	0,83	±	1,12	0,90	±	1,00	0,38	±	1,00	1,13	±	1,29	0,48	±	1,00	1,48	±	1,12
glucosa-6-fosfato	0,72	±	1,00	0,86	±	1,17	0,75	±	1,00	0,81	±	1,17	1,19	±	1,00	1,06	±	1,00
glutamina	1,42	±	1,00	1,82	±	1,00	3,13	±	0,90	1,52	±	1,15	1,61	±	1,00	2,20	±	1,15
homoserina	0,94	±	1,13	1,19	±	1,13	0,96	±	1,00	1,09	±	1,13	1,06	±	1,00	0,93	±	1,13
Indol-3-acetaldehído	1,02	±	1,00	1,25	±	1,00	0,93	±	1,33	1,04	±	1,33	1,04	±	1,00	1,00	±	1,00
isoleucina	0,64	±	1,12	1,05	±	1,00	0,71	±	1,12	0,83	±	1,12	0,67	±	1,12	0,76	±	1,12
leucina	0,94	±	1,12	0,99	±	1,00	0,98	±	1,00	0,88	±	1,29	0,80	±	1,12	0,71	±	1,12
lisina	0,75	±	1,11	0,69	±	1,00	0,73	±	1,00	0,66	±	1,30	0,64	±	1,11	0,79	±	1,11
maltosa	2,12	±	1,13	1,20	±	1,13	0,98	±	1,00	1,15	±	1,13	1,39	±	1,00	1,22	±	1,13
metionina	0,59	±	1,00	1,16	±	0,87	1,14	±	0,87	1,09	±	1,00	0,70	±	1,00	1,54	±	1,00
mioinositol	1,02	±	1,12	1,28	±	1,00	1,03	±	1,12	1,01	±	1,29	1,05	±	1,29	1,01	±	1,12
n-acetil-glutámico	1,04	±	1,00	1,26	±	0,90	0,72	±	0,90	0,86	±	1,00	0,94	±	0,90	1,55	±	1,00
nicotinamida	0,57	±	1,12	0,71	±	1,00	0,93	±	1,00	0,59	±	1,12	0,79	±	1,00	0,40	±	1,12
norleucina	0,87	±	0,78	1,18	±	0,89	0,93	±	0,78	0,96	±	1,00	1,03	±	0,78	0,90	±	0,89
o-																		
metilgalactopiranosido	1,03	±	1,00	1,27	±	0,89	0,77	±	0,89	1,08	±	1,16	0,99	±	0,89	1,47	±	1,00
ornitina	0,52	±	1,13	0,54	±	1,13	0,66	±	1,13	0,71	±	1,13	0,67	±	1,13	0,66	±	1,13
Ornitinalactama	0,96	±	1,12	1,18	±	1,12	0,97	±	1,00	1,04	±	1,29	1,09	±	1,00	0,97	±	1,12
prolina	0,23	±	1,12	0,68	±	1,00	0,30	±	1,12	1,07	±	1,12	0,37	±	1,00	0,14	±	1,12
ramnosa	1,06	±	1,13	1,35	±	1,00	0,78	±	1,13	1,50	±	1,13	1,11	±	1,13	0,89	±	1,13
sacarosa	1,01	±	1,12	1,14	±	1,12	0,98	±	1,00	1,05	±	1,29	1,16	±	1,00	1,06	±	1,12
salicilaldehído-beta-																		
glucopiranosido	2,38	±	1,08	1,15	±	1,08	1,15	±	1,08	1,13	±	1,08	1,43	±	1,00	1,13	±	1,08
serina	0,43	±	1,12	0,84	±	1,00	0,78	±	1,29	0,50	±	1,29	0,85	±	1,29	0,67	±	1,12
tiramina	1,11	±	1,00	0,97	±	0,90	0,92	±	1,00	0,74	±	1,16	1,03	±	1,00	1,43	±	1,00
tirosina	0,90	±	1,00	1,09	±	1,15	0,90	±	0,89	0,66	±	1,15	0,98	±	0,89	0,80	±	1,00
treonina	0,57	±	1,12	1,26	±	1,00	0,91	±	1,12	0,63	±	1,29	0,75	±	1,12	0,53	±	1,12
urea	1,14	±	1,00	1,27	±	0,90	1,08	±	0,90	1,12	±	1,15	1,30	±	1,00	0,97	±	0,90
Valina	0,88	±	1,00	1,45	±	0,89	0,88	±	1,00	1,21	±	1,15	0,99	±	1,00	1,35	±	1,00

Tabla 8. Metabolitos de hojas fuentes de plantas de tomate con *AsrI* en sentido (S) y antisentido (AS) bajo el promotor 35S en el experimento III. Niveles de cambio de los metabolitos en las líneas transgénicas en comparación con las plantas controles (WT) durante el experimento III. Se muestra la media \pm el error estándar (EE). Los metabolitos fueron medidos por GC-MS. El análisis estadístico realizado fue ANOVA con el método de comparación de Duncan. Las variables estadísticamente significativas se marcaron en negrita. N=3-6.

	35S5		35s17		35s18		35S12		35s16		35S31		
1-O-metil-galactopiranosido	1,39	\pm 1,29	2,21	\pm 1,29	1,29	0,71	\pm 1,12	1,77	\pm 1,12	1,58	\pm 1,12	0,75	\pm 1,12
1-O-metil-glucopiranosido	0,78	\pm 1,50	1,01	\pm 1,50	0,66	\pm 1,50	0,88	\pm 1,50	0,91	\pm 1,50	0,80	\pm 1,50	
2-amino-2-deoxiglucosa	0,74	\pm 1,13	1,06	\pm 1,13	0,59	\pm 1,00	0,88	\pm 1,13	1,04	\pm 1,13	0,77	\pm 1,00	
4-hidroxiprolina	0,97	\pm 1,29	1,04	\pm 1,29	0,68	\pm 1,14	0,73	\pm 1,29	0,87	\pm 1,29	0,92	\pm 1,14	
5-hidroxitriptamina	1,39	\pm 1,14	1,64	\pm 1,14	0,74	\pm 1,00	1,47	\pm 1,00	1,11	\pm 1,00	1,49	\pm 1,00	
ácido 2-oxoglutámico	0,92	\pm 1,15	0,89	\pm 1,15	0,98	\pm 1,00	1,02	\pm 1,00	1,16	\pm 1,00	0,83	\pm 1,00	
ácido 2-oxoglutámico	0,83	\pm 1,33	0,73	\pm 1,33	0,30	\pm 1,00	0,75	\pm 1,33	0,78	\pm 1,00	0,88	\pm 1,00	
ácido 3-cafeoil-quinico	1,04	\pm 1,15	2,84	\pm 1,15	0,77	\pm 1,00	1,27	\pm 1,00	1,16	\pm 1,15	0,76	\pm 1,15	
ácido 3-cinámico	1,47	\pm 1,16	2,27	\pm 1,16	0,48	\pm 1,00	1,92	\pm 1,16	1,32	\pm 1,00	0,75	\pm 1,00	
ácido 3-hidroxicinámico	1,40	\pm 1,29	2,00	\pm 1,29	1,20	\pm 1,29	1,80	\pm 1,12	1,40	\pm 1,12	0,80	\pm 1,12	
ácido 3-hidroxipirúvico	0,93	\pm 1,16	3,74	\pm 1,16	0,79	\pm 1,16	1,70	\pm 1,00	1,06	\pm 1,16	1,23	\pm 1,00	
ácido 3-indolacético	0,87	\pm 1,17	0,92	\pm 1,17	0,98	\pm 1,00	0,74	\pm 1,00	0,98	\pm 1,00	0,83	\pm 1,17	
ácido 4-aminobutanoico	0,83	\pm 1,29	0,82	\pm 1,29	0,58	\pm 1,29	0,98	\pm 1,11	0,84	\pm 1,29	1,47	\pm 1,11	
ácido abscísico	1,02	\pm 1,29	1,04	\pm 1,29	1,02	\pm 1,12	1,10	\pm 1,12	0,93	\pm 1,29	0,99	\pm 1,12	
ácido ascórbico	1,20	\pm 1,15	1,30	\pm 1,15	1,13	\pm 1,00	1,28	\pm 1,00	1,02	\pm 1,00	1,11	\pm 1,00	
ácido aspártico	0,95	\pm 1,12	1,22	\pm 1,12	0,67	\pm 1,12	0,79	\pm 1,00	0,86	\pm 1,12	1,48	\pm 1,00	
ácido cítrico	0,92	\pm 1,00	0,95	\pm 1,00	0,99	\pm 1,00	0,91	\pm 1,00	1,19	\pm 1,00	0,87	\pm 1,00	
ácido fenilpirúvico	1,45	\pm 1,29	2,39	\pm 1,29	0,70	\pm 1,12	1,85	\pm 1,12	1,62	\pm 1,12	0,72	\pm 1,12	
ácido fosfoenolpirúvico	0,56	\pm 1,29	1,13	\pm 1,29	0,81	\pm 1,12	0,69	\pm 1,12	1,00	\pm 1,12	0,75	\pm 1,12	
ácido fumárico	0,80	\pm 1,29	0,80	\pm 1,29	0,76	\pm 1,11	0,86	\pm 1,29	0,96	\pm 1,11	0,71	\pm 1,29	
ácido galactónico/galactónico	1,05	\pm 1,29	2,00	\pm 1,29	0,57	\pm 1,10	0,81	\pm 1,10	1,00	\pm 1,10	1,00	\pm 1,10	
ácido galactónico-1,4-lactona	0,82	\pm 1,30	1,00	\pm 1,30	0,65	\pm 1,30	0,76	\pm 1,10	0,88	\pm 1,30	0,88	\pm 1,10	
ácido glicérico	1,29	\pm 1,16	0,87	\pm 1,16	0,77	\pm 1,16	1,68	\pm 1,00	0,75	\pm 1,16	1,09	\pm 1,00	
ácido glucónico-1,4-lactona	1,23	\pm 1,15	1,32	\pm 1,15	1,08	\pm 1,00	1,23	\pm 1,15	1,11	\pm 1,15	1,11	\pm 1,00	
ácido glucurónico/galacturónico	1,02	\pm 1,16	1,32	\pm 1,16	0,53	\pm 0,90	0,84	\pm 1,00	0,71	\pm 1,00	0,98	\pm 1,00	
ácido glucurónico-3,6-lactona	1,13	\pm 1,14	1,24	\pm 1,14	0,99	\pm 1,00	0,83	\pm 1,00	0,88	\pm 1,00	0,88	\pm 1,00	
ácido glutámico	0,77	\pm 1,33	1,22	\pm 1,33	0,47	\pm 1,33	0,56	\pm 1,33	1,00	\pm 1,33	0,86	\pm 1,33	
ácido isoascórbico	0,83	\pm 1,25	0,96	\pm 1,25	0,94	\pm 1,25	0,81	\pm 1,25	1,12	\pm 1,25	0,81	\pm 1,25	
ácido lixónico	1,07	\pm 1,27	1,65	\pm 1,27	0,88	\pm 1,09	0,79	\pm 1,27	1,00	\pm 1,09	0,58	\pm 1,09	
ácido málico	0,98	\pm 1,29	0,88	\pm 1,29	0,73	\pm 1,12	0,93	\pm 1,29	1,09	\pm 1,12	0,91	\pm 1,12	
ácido mevalónico-1,5-lactona	0,82	\pm 1,28	0,80	\pm 1,28	0,55	\pm 1,28	0,97	\pm 1,12	0,70	\pm 1,28	1,50	\pm 1,12	
ácido quinico	1,26	\pm 1,29	1,70	\pm 1,29	0,71	\pm 1,12	1,96	\pm 1,12	0,75	\pm 1,29	0,48	\pm 1,12	
ácido sacarido	1,49	\pm 1,13	1,97	\pm 1,13	0,69	\pm 1,00	1,30	\pm 1,00	1,06	\pm 1,00	2,37	\pm 1,00	
ácido shikímico	0,97	\pm 1,33	1,24	\pm 1,33	0,64	\pm 1,33	1,13	\pm 1,13	0,98	\pm 1,13	0,54	\pm 1,13	
ácido subérico	0,81	\pm 1,25	1,17	\pm 1,25	0,65	\pm 1,08	0,63	\pm 1,08	0,67	\pm 1,08	1,01	\pm 1,08	
ácido succínico	0,93	\pm 1,33	1,40	\pm 1,33	0,70	\pm 1,13	0,85	\pm 1,13	0,89	\pm 1,13	0,80	\pm 1,33	
ácido treónico	1,13	\pm 1,15	0,72	\pm 1,15	0,73	\pm 1,00	0,74	\pm 1,00	1,00	\pm 1,00	1,06	\pm 1,00	
alanina	0,87	\pm 1,29	3,49	\pm 1,29	0,83	\pm 1,12	1,59	\pm 1,12	0,87	\pm 1,12	1,14	\pm 1,12	
arabinosa	1,09	\pm 1,29	1,61	\pm 1,29	0,89	\pm 1,12	0,81	\pm 1,29	1,01	\pm 1,29	0,59	\pm 1,12	
arabinosa/xilosa/lixosa	0,95	\pm 1,29	1,30	\pm 1,29	0,80	\pm 1,12	1,19	\pm 1,29	1,76	\pm 1,12	0,82	\pm 1,12	
asparagina	0,63	\pm 1,00	5,88	\pm 1,00	0,63	\pm 0,89	0,88	\pm 0,89	1,13	\pm 1,00	9,00	\pm 0,89	
beta-homoserina	1,00	\pm 1,30	0,90	\pm 1,30	0,72	\pm 1,12	0,85	\pm 1,12	1,07	\pm 1,12	0,93	\pm 1,12	
dímero de ácido													
dehidroascórbico	1,83	\pm 1,50	1,66	\pm 1,50	0,98	\pm 1,50	1,42	\pm 1,25	1,58	\pm 1,25	0,89	\pm 1,25	
etanolamina	0,82	\pm 1,29	2,41	\pm 1,29	0,98	\pm 1,00	1,02	\pm 1,12	1,01	\pm 1,29	0,70	\pm 1,12	
fenilalanina	0,83	\pm 1,29	1,63	\pm 1,29	0,74	\pm 1,14	1,10	\pm 1,29	0,90	\pm 1,14	1,04	\pm 1,14	

fructosa	1,33	±	1,26	2,36	±	1,26	0,67	±	1,26	1,76	±	1,11	1,82	±	1,26	0,73	±	1,11
fructosa-6-fosfato	0,81	±	1,20	1,26	±	1,20	0,59	±	1,00	0,78	±	1,00	0,78	±	1,00	1,22	±	1,00
galactinol	1,09	±	1,15	2,10	±	1,15	0,70	±	1,15	1,37	±	1,00	0,87	±	1,00	0,82	±	1,00
gliceraldehído	0,64	±	0,16	1,04	±	0,16	1,08	±	0,16	0,04	±	0,16	0,28	±	0,16	0,04	±	0,13
glicina	0,83	±	1,29	1,49	±	1,29	0,97	±	1,12	1,04	±	1,12	1,03	±	1,29	0,71	±	1,12
glucopiranososa	1,27	±	1,29	1,50	±	1,29	0,93	±	1,12	1,03	±	1,29	1,17	±	1,12	1,00	±	1,12
glucosa	1,42	±	1,17	2,06	±	1,17	0,50	±	1,00	1,82	±	1,17	1,28	±	1,00	0,73	±	1,00
glucosa-6-fosfato	0,75	±	1,29	0,96	±	1,29	0,46	±	1,12	0,65	±	1,12	0,67	±	1,12	1,22	±	1,12
glutamina	0,58	±	1,16	0,49	±	1,16	0,97	±	1,16	0,70	±	1,00	0,76	±	1,00	1,00	±	1,00
homoserina	0,82	±	1,00	1,18	±	1,00	0,57	±	0,86	0,61	±	0,86	1,11	±	0,86	0,89	±	0,86
indol-3-acetaldehído	1,22	±	1,29	1,30	±	1,29	1,10	±	1,12	1,20	±	1,12	1,00	±	1,12	1,08	±	1,12
isoleucina	0,73	±	1,16	2,79	±	1,16	0,98	±	1,00	1,05	±	1,00	0,90	±	1,16	1,77	±	1,16
lactosa	0,94	±	1,29	0,88	±	1,29	1,06	±	1,29	0,59	±	1,12	1,00	±	1,12	0,94	±	1,12
leucina	0,73	±	1,15	1,30	±	1,15	1,02	±	1,00	1,00	±	1,00	0,81	±	1,15	1,90	±	1,15
lisina	0,74	±	1,29	1,19	±	1,29	0,69	±	1,12	0,81	±	1,12	0,86	±	1,12	1,44	±	1,12
maltosa	0,90	±	1,00	0,64	±	1,00	0,90	±	1,00	0,79	±	1,00	1,46	±	1,00	0,64	±	1,00
metionina	0,95	±	1,25	7,19	±	1,50	0,76	±	1,00	1,19	±	1,25	0,90	±	1,25	2,10	±	1,25
mioinositol	1,19	±	1,17	1,27	±	1,17	1,10	±	1,00	1,23	±	1,00	1,14	±	1,17	1,10	±	1,00
n-acetil-glutámico	1,48	±	1,29	2,69	±	1,29	0,40	±	1,12	1,88	±	1,12	1,90	±	1,12	0,73	±	1,12
nicotinamida	0,92	±	1,30	1,17	±	1,30	0,72	±	1,11	0,73	±	1,11	0,71	±	1,11	1,32	±	1,11
norleucina	1,01	±	1,27	0,91	±	1,27	0,75	±	1,09	0,87	±	1,09	1,00	±	1,27	0,96	±	1,09
ornitina	0,72	±	1,29	0,75	±	1,29	0,88	±	1,12	0,72	±	1,12	0,70	±	1,12	0,61	±	1,12
ornitina-1,5-lactámico	1,09	±	1,16	1,03	±	1,16	0,87	±	1,00	0,98	±	1,00	1,21	±	1,00	1,03	±	1,00
prolina	1,04	±	1,16	1,54	±	1,16	1,64	±	1,00	0,85	±	1,00	1,81	±	1,00	1,40	±	1,00
ramnosa	0,89	±	1,29	1,01	±	1,29	0,98	±	1,29	0,86	±	1,14	1,01	±	1,14	0,90	±	1,14
sacarosa	0,98	±	1,15	1,03	±	1,15	1,04	±	1,15	1,14	±	1,15	0,95	±	1,00	0,98	±	1,00
salicilaldehído-beta-glucopiranosido	0,90	±	1,16	0,59	±	1,16	0,85	±	1,00	0,75	±	1,00	1,47	±	1,00	0,58	±	1,00
serina	0,86	±	1,29	3,66	±	1,29	0,73	±	1,29	1,57	±	1,12	0,91	±	1,12	1,13	±	1,12
similar a gliceraldopiranosido	0,77	±	1,30	0,89	±	1,30	1,02	±	1,12	0,69	±	1,12	1,09	±	1,30	0,89	±	1,12
similar a hexapirosa	0,51	±	1,25	0,43	±	1,25	1,07	±	1,08	0,77	±	1,25	0,49	±	1,08	0,34	±	1,08
tiramina	0,83	±	1,16	0,90	±	1,16	0,84	±	1,00	0,68	±	1,16	0,79	±	1,16	1,11	±	1,00
tirosina	0,57	±	1,40	1,83	±	1,40	0,61	±	1,20	0,66	±	1,40	0,93	±	1,20	1,42	±	1,20
treonina	0,80	±	1,29	1,95	±	1,29	0,74	±	1,12	1,05	±	1,29	0,93	±	1,29	1,10	±	1,12
urea	0,48	±	1,00	3,19	±	1,00	0,85	±	1,00	0,67	±	1,00	0,80	±	0,87	0,98	±	0,87
valina	0,81	±	1,15	1,76	±	1,15	0,92	±	1,00	1,00	±	1,00	0,92	±	1,15	1,75	±	1,00

Tabla 9. Metabolitos de hojas fuentes de plantas de tomate con *AsrI* en sentido (S) y antisentido (AS) bajo el promotor B33 en el experimento III. Niveles de cambio de los metabolitos en las líneas transgénicas en comparación con las plantas controles (WT) durante el experimento III. Se muestra la media \pm el error estándar (EE). Los metabolitos fueron medidos por GC-MS. El análisis estadístico realizado fue ANOVA con el método de comparación de Duncan. Las variables estadísticamente significativas se marcaron en negrita. N=3-6.

	B3317		B3327		B3328		B333		B3312		B3321	
1-O-metil-galactopiranosido	0,90	\pm 1,29	1,68	\pm 1,12	1,21	\pm 1,12	1,09	\pm 1,29	1,19	\pm 1,29	2,84	\pm 1,29
1-O-metil-glucopiranosido	0,98	\pm 1,50	1,07	\pm 1,50	0,93	\pm 1,50	0,92	\pm 1,50	1,17	\pm 1,50	0,85	\pm 1,50
2-amino-2-deoxiglucosa	1,01	\pm 1,00	1,09	\pm 1,00	0,94	\pm 1,00	0,91	\pm 1,13	1,06	\pm 1,13	0,94	\pm 1,00
4-hidroxiprolina	1,08	\pm 1,14	1,27	\pm 1,29	1,01	\pm 1,14	0,93	\pm 1,29	0,78	\pm 1,14	0,81	\pm 1,14
5-hidroxitriptamina	0,64	\pm 1,00	0,57	\pm 1,14	0,47	\pm 1,00	0,98	\pm 1,14	0,69	\pm 1,00	0,77	\pm 1,00
ácido 2-oxogluconico	0,89	\pm 1,00	1,06	\pm 1,15	1,12	\pm 1,00	1,01	\pm 1,15	1,00	\pm 1,00	0,81	\pm 1,15
ácido 2-oxoglutárico	1,00	\pm 1,00	0,95	\pm 1,33	0,65	\pm 1,00	1,40	\pm 1,33	1,13	\pm 1,00	0,65	\pm 1,33
ácido 3-cafeoil-quinico	0,99	\pm 1,15	0,30	\pm 1,00	0,51	\pm 1,00	1,33	\pm 1,15	0,93	\pm 1,15	1,02	\pm 1,00
ácido 3-cinámico	1,14	\pm 1,00	1,82	\pm 1,16	1,28	\pm 1,16	1,26	\pm 1,16	1,09	\pm 1,16	3,21	\pm 1,16
ácido 3-hidroxicinámico	1,80	\pm 1,12	2,00	\pm 1,12	2,00	\pm 1,29	1,20	\pm 1,29	1,00	\pm 1,12	2,40	\pm 1,29
ácido 3-hidroxipirúvico	1,15	\pm 1,16	1,83	\pm 1,16	1,43	\pm 1,00	1,06	\pm 1,16	1,10	\pm 1,00	1,85	\pm 1,00
ácido 3-indolacético	1,03	\pm 1,17	0,73	\pm 1,00	0,82	\pm 1,00	0,86	\pm 1,17	0,80	\pm 1,00	0,77	\pm 1,00
ácido 4-aminobutanoico	1,23	\pm 1,11	1,29	\pm 1,11	0,70	\pm 1,11	1,35	\pm 1,29	1,09	\pm 1,00	0,75	\pm 1,29
ácido abscísico	1,13	\pm 1,12	1,00	\pm 1,29	1,01	\pm 1,12	0,85	\pm 1,29	0,99	\pm 1,12	0,95	\pm 1,29
ácido ascórbico	1,25	\pm 1,00	1,37	\pm 1,15	1,23	\pm 1,00	1,09	\pm 1,15	0,99	\pm 1,15	1,22	\pm 1,00
ácido aspártico	0,92	\pm 1,12	1,26	\pm 1,00	1,47	\pm 1,00	0,96	\pm 1,12	0,89	\pm 1,12	0,95	\pm 1,12
ácido cítrico	0,92	\pm 1,00	1,06	\pm 1,00	1,01	\pm 1,00	1,00	\pm 1,00	0,82	\pm 1,00	0,86	\pm 1,00
ácido fenilpirúvico	0,89	\pm 1,12	1,76	\pm 1,12	1,26	\pm 1,12	1,14	\pm 1,29	1,09	\pm 1,29	2,46	\pm 1,29
ácido fosfoenolpirúvico	0,75	\pm 1,12	1,25	\pm 1,12	1,69	\pm 1,12	0,63	\pm 1,29	0,56	\pm 1,12	0,81	\pm 1,12
ácido fumárico	0,88	\pm 1,11	1,23	\pm 1,11	1,22	\pm 1,11	0,85	\pm 1,29	0,79	\pm 1,11	0,68	\pm 1,11
ácido galactónico/glucónico	1,24	\pm 1,10	1,24	\pm 1,10	0,86	\pm 1,10	0,95	\pm 1,29	1,48	\pm 1,10	0,95	\pm 1,10
ácido galactónico-1,4-lactona	1,12	\pm 1,10	1,12	\pm 1,10	1,00	\pm 1,10	0,71	\pm 1,30	1,18	\pm 1,10	0,94	\pm 1,30
ácido glicérico	1,34	\pm 1,00	1,77	\pm 1,00	1,60	\pm 1,00	1,42	\pm 1,16	1,26	\pm 1,00	1,56	\pm 1,00
ácido glucónico-1,4-lactona	1,23	\pm 1,00	1,30	\pm 1,00	1,32	\pm 1,00	1,11	\pm 1,15	1,02	\pm 1,00	1,19	\pm 1,00
ácido glucurónico/galacturónico	1,26	\pm 1,00	1,21	\pm 1,00	0,84	\pm 1,16	1,31	\pm 1,16	1,48	\pm 1,00	0,90	\pm 1,00
ácido glucurónico-3,6-lactona	1,08	\pm 1,00	1,18	\pm 1,00	1,11	\pm 1,00	1,13	\pm 1,14	0,93	\pm 1,00	0,96	\pm 1,14
ácido glutámico	1,00	\pm 1,33	0,96	\pm 1,33	0,78	\pm 1,33	0,61	\pm 1,33	0,81	\pm 1,33	0,65	\pm 1,33
ácido isoascórbico	1,04	\pm 1,25	0,77	\pm 1,25	0,81	\pm 1,25	0,83	\pm 1,25	0,81	\pm 1,25	0,65	\pm 1,25
ácido lioxónico	1,12	\pm 1,09	1,42	\pm 1,09	1,28	\pm 1,09	0,67	\pm 1,27	0,63	\pm 1,09	1,14	\pm 1,09
ácido málico	1,11	\pm 1,12	1,17	\pm 1,12	1,00	\pm 1,12	0,94	\pm 1,29	0,84	\pm 1,12	0,78	\pm 1,29
ácido mevalónico-1,5-lactona	1,20	\pm 1,12	1,29	\pm 1,12	0,67	\pm 1,12	1,35	\pm 1,28	1,16	\pm 1,12	0,72	\pm 1,12
ácido quinico	0,90	\pm 1,29	1,06	\pm 1,12	0,95	\pm 1,12	0,91	\pm 1,29	0,72	\pm 1,29	1,92	\pm 1,29
ácido sacárido	1,32	\pm 1,00	1,69	\pm 1,13	1,02	\pm 1,00	1,27	\pm 1,13	2,90	\pm 1,13	1,26	\pm 1,00
ácido shikímico	0,76	\pm 1,33	1,05	\pm 1,13	0,84	\pm 1,13	0,81	\pm 1,33	0,92	\pm 1,13	1,46	\pm 1,13
ácido subérico	1,18	\pm 1,08	0,71	\pm 1,08	0,71	\pm 1,08	0,92	\pm 1,25	1,06	\pm 1,08	0,81	\pm 1,08
ácido succínico	0,86	\pm 1,13	0,91	\pm 1,13	1,03	\pm 1,13	0,78	\pm 1,33	0,84	\pm 1,13	0,97	\pm 1,13
ácido treónico	0,99	\pm 1,00	0,80	\pm 1,00	1,24	\pm 1,00	0,65	\pm 1,15	0,67	\pm 1,00	0,92	\pm 1,15
alanina	1,21	\pm 1,12	1,71	\pm 1,29	1,33	\pm 1,12	0,94	\pm 1,29	1,02	\pm 1,29	1,75	\pm 1,12
arabinosa	1,11	\pm 1,12	1,39	\pm 1,29	1,31	\pm 1,29	0,67	\pm 1,29	0,80	\pm 1,12	1,13	\pm 1,12
arabinosa/xilosa/lixosa	1,74	\pm 1,12	0,82	\pm 1,12	0,58	\pm 1,29	0,84	\pm 1,29	0,86	\pm 1,29	1,01	\pm 1,12
asparagina	1,00	\pm 0,89	1,25	\pm 0,89	1,63	\pm 0,89	0,75	\pm 1,00	1,13	\pm 0,89	1,13	\pm 0,89
beta-homoserina	1,13	\pm 1,12	1,13	\pm 1,12	1,01	\pm 1,12	0,94	\pm 1,30	0,84	\pm 1,12	0,76	\pm 1,30

dímero de ácido dehidroascórbico	0,92	±	1,25	1,34	±	1,25	1,05	±	1,25	0,94	±	1,50	0,86	±	1,25	1,22	±	1,50
etanolamina	0,94	±	1,29	1,14	±	1,29	1,17	±	1,12	0,89	±	1,29	1,52	±	1,12	0,80	±	1,29
fenilalanina	1,03	±	1,14	0,95	±	1,14	0,93	±	1,14	0,89	±	1,29	0,92	±	1,29	1,12	±	1,29
fructosa	0,89	±	1,26	1,73	±	1,11	1,20	±	1,11	1,14	±	1,26	1,29	±	1,26	2,84	±	1,26
fructosa-6-fosfato	0,70	±	1,20	0,74	±	1,00	0,63	±	1,00	0,93	±	1,20	1,22	±	1,00	0,78	±	1,00
galactinol	0,85	±	1,00	1,31	±	1,15	1,26	±	1,00	0,88	±	1,15	0,81	±	1,00	1,67	±	1,00
gliceraldehído	0,56	±	0,13	0,94	±	0,13	1,03	±	0,16	0,04	±	0,16	0,05	±	0,16	0,90	±	0,16
glicina	0,95	±	1,29	1,03	±	1,12	1,20	±	1,12	0,90	±	1,29	1,54	±	1,12	0,82	±	1,29
glucopiranososa	0,93	±	1,12	1,27	±	1,12	1,23	±	1,12	1,00	±	1,29	0,87	±	1,12	1,13	±	1,29
glucosa	1,07	±	1,00	1,94	±	1,00	0,61	±	1,00	1,29	±	1,17	0,98	±	1,00	2,73	±	1,00
glucosa-6-fosfato	0,58	±	1,12	0,68	±	1,12	0,54	±	1,12	0,80	±	1,29	1,13	±	1,29	0,97	±	1,12
glutamina	0,68	±	1,00	1,09	±	1,00	2,08	±	1,00	0,61	±	1,16	0,62	±	1,00	0,73	±	1,00
homoserina	1,04	±	0,86	0,82	±	1,00	0,86	±	0,76	0,64	±	1,00	0,89	±	0,86	0,71	±	0,86
indol-3-acetaldehído	1,22	±	1,12	1,44	±	1,29	1,24	±	1,12	1,08	±	1,29	0,94	±	1,29	1,18	±	1,12
isoleucina	1,36	±	1,00	0,94	±	1,00	1,06	±	1,00	0,84	±	1,16	1,10	±	1,00	1,56	±	1,00
lactosa	0,82	±	1,29	0,71	±	1,12	0,88	±	1,12	1,06	±	1,29	0,59	±	1,29	0,65	±	1,12
leucina	0,93	±	1,15	0,95	±	1,00	0,96	±	1,00	1,02	±	1,15	0,99	±	1,15	1,48	±	1,00
lisina	1,20	±	1,12	0,95	±	1,29	0,89	±	1,12	1,34	±	1,29	0,95	±	1,12	0,87	±	1,12
maltosa	1,48	±	1,00	1,09	±	1,00	0,86	±	1,00	0,81	±	1,00	0,86	±	1,00	0,66	±	1,00
metionina	1,14	±	1,00	2,29	±	1,00	1,86	±	1,00	1,33	±	1,25	1,00	±	1,25	1,71	±	1,25
mioinositol	1,24	±	1,00	1,19	±	1,00	1,30	±	1,00	1,09	±	1,17	1,03	±	1,00	1,19	±	1,00
n-acetil-glutámico	0,87	±	1,29	1,90	±	1,12	1,31	±	1,12	1,13	±	1,29	1,25	±	1,29	3,35	±	1,29
nicotinamida	0,85	±	1,11	1,12	±	1,30	1,34	±	1,11	0,84	±	1,30	0,79	±	1,11	1,02	±	1,11
norleucina	1,13	±	1,09	1,17	±	1,09	1,01	±	1,09	0,90	±	1,27	0,84	±	1,09	0,78	±	1,27
ornitina	0,54	±	1,29	0,97	±	1,12	1,04	±	1,12	0,72	±	1,29	0,63	±	1,29	0,88	±	1,12
ornitina-1,5-lactámico	1,22	±	1,00	1,26	±	1,00	1,09	±	1,00	1,02	±	1,16	0,96	±	1,00	0,87	±	1,16
prolina	1,45	±	1,00	1,13	±	1,00	1,86	±	1,00	1,08	±	1,16	0,74	±	1,16	1,14	±	1,00
ramnosa	1,09	±	1,14	0,90	±	1,14	0,83	±	1,14	0,86	±	1,29	0,79	±	1,14	0,92	±	1,14
sacarosa	1,16	±	1,15	0,96	±	1,15	0,98	±	1,00	0,83	±	1,15	1,04	±	1,00	0,99	±	1,00
salicilaldehído-beta-glucopiranosido	1,56	±	1,00	1,13	±	1,16	0,86	±	1,00	0,78	±	1,16	0,91	±	1,00	0,61	±	1,00
serina	1,21	±	1,12	1,69	±	1,29	1,33	±	1,12	0,97	±	1,29	1,51	±	1,12	1,74	±	1,12
similar a gliceraldopiranosido	1,05	±	1,12	0,67	±	1,30	0,82	±	1,12	0,81	±	1,30	0,98	±	1,12	0,68	±	1,30
similar a hexapirosa	0,46	±	1,25	0,26	±	1,08	0,29	±	1,08	0,74	±	1,25	0,37	±	1,08	0,63	±	1,08
tiramina	0,48	±	1,16	0,44	±	1,00	0,42	±	1,00	0,95	±	1,16	0,87	±	1,00	0,70	±	1,16
tirosina	1,02	±	1,20	0,75	±	1,20	0,68	±	1,20	0,73	±	1,40	0,78	±	1,20	0,76	±	1,40
treonina	1,02	±	1,12	1,11	±	1,12	1,23	±	1,12	0,79	±	1,29	0,76	±	1,29	1,19	±	1,12
urea	0,61	±	0,87	0,76	±	1,00	0,80	±	1,00	0,84	±	1,00	1,21	±	0,87	1,11	±	0,87
valina	1,19	±	1,00	0,93	±	1,00	1,09	±	1,00	0,85	±	1,15	0,97	±	1,00	1,33	±	1,00

Tabla 10. Metabolitos de frutos maduros de plantas de tomate con *AsrI* en sentido (S) y en antisentido (AS) bajo el promotor 35S en el experimento I. Niveles de cambio de metabolitos en frutos maduros de las líneas transgénicas en comparación con las plantas controles (WT) en el experimento I. Se muestran los cocientes de intensidades medios \pm EE (error estándar) del cociente. N=3-6. Los valores en negrita indican diferencias significativas por ANOVA (método de comparación: prueba de Duncan). Todos los metabolitos fueron medidos por GC-MS.

	AS5/WT \pm EE		AS17/WT \pm EE		AS18/WT \pm EE		S12/WT \pm EE		S16/WT \pm EE		S31/WT \pm EE	
Ácido aspártico	2,12	\pm 0,46	1,53	\pm 0,35	1,34	\pm 0,27	1,61	\pm 0,62	1,15	\pm 0,18	1,55	\pm 0,17
Ácido fosfórico	1,62	\pm 0,32	1,41	\pm 0,26	1,47	\pm 0,23	1,85	\pm 0,53	1,39	\pm 0,23	1,70	\pm 0,21
Ácido galactónico	1,25	\pm 0,27	1,11	\pm 0,24	0,89	\pm 0,19	1,37	\pm 0,72	2,19	\pm 0,57	1,97	\pm 0,53
Ácido glutámico	1,47	\pm 0,24	1,20	\pm 0,18	1,29	\pm 0,20	1,56	\pm 0,56	1,21	\pm 0,16	1,54	\pm 0,13
Ácido hexadecenoico	1,27	\pm 0,18	1,05	\pm 0,14	1,28	\pm 0,19	1,49	\pm 0,36	1,34	\pm 0,19	1,49	\pm 0,22
Ácido itacónico	1,09	\pm 0,21	0,93	\pm 0,16	1,14	\pm 0,25	1,48	\pm 0,32	1,20	\pm 0,30	1,42	\pm 0,23
Ácido nonaicoico	1,18	\pm 0,13	1,06	\pm 0,09	1,22	\pm 0,18	1,50	\pm 0,38	1,12	\pm 0,15	1,39	\pm 0,12
Ácido piroglutámico	2,12	\pm 0,56	1,61	\pm 0,38	1,73	\pm 0,43	2,00	\pm 0,74	1,17	\pm 0,20	1,70	\pm 0,24
Ácido succínico	0,70	\pm 0,13	0,59	\pm 0,07	0,80	\pm 0,11	1,06	\pm 0,29	0,73	\pm 0,12	1,00	\pm 0,12
Alfa-1-O-metilmanopiranosido	1,79	\pm 0,32	1,42	\pm 0,28	1,47	\pm 0,24	1,72	\pm 0,58	1,17	\pm 0,18	1,55	\pm 0,15
Arabinosa	1,01	\pm 0,09	0,90	\pm 0,05	1,00	\pm 0,10	1,27	\pm 0,41	1,28	\pm 0,17	1,42	\pm 0,07
Asparagina	2,91	\pm 0,92	2,01	\pm 0,57	1,77	\pm 0,47	2,01	\pm 0,82	1,09	\pm 0,20	1,67	\pm 0,28
Beta-1,6-anhidroglucosa	0,87	\pm 0,71	0,45	\pm 0,28	0,29	\pm 0,18	0,65	\pm 0,51	0,23	\pm 0,14	0,19	\pm 0,13
Beta-alanina	2,10	\pm 0,46	1,59	\pm 0,38	1,92	\pm 0,38	2,54	\pm 0,79	1,35	\pm 0,31	1,59	\pm 0,45
Cisteína	1,76	\pm 0,60	1,73	\pm 0,40	1,59	\pm 0,35	2,15	\pm 0,87	1,48	\pm 0,29	1,82	\pm 0,24
D-glucaro-1,4-lactona	1,12	\pm 0,12	0,92	\pm 0,17	0,87	\pm 0,21	1,81	\pm 0,88	1,13	\pm 0,08	1,39	\pm 0,11
Fenilalanina	1,90	\pm 0,41	1,42	\pm 0,28	2,16	\pm 0,59	3,05	\pm 0,90	1,82	\pm 0,46	1,89	\pm 0,30
Fucosa	2,15	\pm 0,63	1,67	\pm 0,44	2,49	\pm 1,05	1,98	\pm 0,69	1,07	\pm 0,24	1,82	\pm 0,30
Glicerol	1,27	\pm 0,21	0,78	\pm 0,12	0,85	\pm 0,13	1,14	\pm 0,27	1,07	\pm 0,20	1,35	\pm 0,22
Glicerol-3-fosfato	2,32	\pm 0,97	1,80	\pm 0,73	1,34	\pm 0,46	2,72	\pm 1,88	1,67	\pm 0,64	2,08	\pm 0,68
Glicina	2,17	\pm 0,60	2,15	\pm 0,78	2,02	\pm 0,52	2,39	\pm 0,77	1,10	\pm 0,27	1,31	\pm 0,26
Glucosa	1,02	\pm 0,67	1,02	\pm 0,87	1,02	\pm 0,67	1,07	\pm 0,67	1,13	\pm 0,56	1,35	\pm 0,45
Isoleucina	3,62	\pm 0,84	2,62	\pm 0,66	3,01	\pm 0,72	3,67	\pm 1,56	2,04	\pm 0,36	3,16	\pm 0,56
Leucina	2,79	\pm 0,64	2,04	\pm 0,46	2,70	\pm 0,59	3,12	\pm 0,98	1,97	\pm 0,40	2,44	\pm 0,43
Metionina	4,43	\pm 1,35	3,84	\pm 0,97	4,52	\pm 1,13	3,98	\pm 1,55	1,93	\pm 0,36	3,56	\pm 0,79
Mioinositol	1,23	\pm 0,18	1,11	\pm 0,13	1,38	\pm 0,23	1,52	\pm 0,35	1,29	\pm 0,27	1,28	\pm 0,10
O-acetilcisteína	1,21	\pm 0,14	1,06	\pm 0,08	1,26	\pm 0,12	1,55	\pm 0,41	1,12	\pm 0,12	1,46	\pm 0,11
Ornitina	3,04	\pm 0,91	1,69	\pm 0,41	2,13	\pm 0,50	2,84	\pm 1,09	1,68	\pm 0,33	2,22	\pm 0,39
Prolina	3,60	\pm 1,34	2,63	\pm 0,99	3,70	\pm 2,04	2,68	\pm 1,27	1,20	\pm 0,36	1,75	\pm 0,45
Putrescina	1,14	\pm 0,21	1,22	\pm 0,31	1,84	\pm 0,36	1,80	\pm 0,40	1,18	\pm 0,35	1,14	\pm 0,16
Rafinosa	2,76	\pm 0,77	3,90	\pm 1,61	4,88	\pm 2,67	2,09	\pm 0,86	1,96	\pm 0,63	2,03	\pm 0,46
Ramnosa	1,56	\pm 0,25	1,18	\pm 0,16	1,10	\pm 0,19	1,48	\pm 0,53	1,31	\pm 0,18	1,47	\pm 0,13
Serina	1,89	\pm 0,51	1,16	\pm 0,33	1,42	\pm 0,37	1,76	\pm 0,77	0,86	\pm 0,20	1,24	\pm 0,26
S-metil-cisteína	3,27	\pm 1,04	2,76	\pm 1,24	4,37	\pm 1,39	3,29	\pm 1,57	0,88	\pm 0,28	2,17	\pm 0,99
Trans-4-hidroxi-prolina	3,72	\pm 0,93	3,94	\pm 1,17	5,05	\pm 1,61	3,08	\pm 1,50	1,54	\pm 0,45	1,92	\pm 0,41
Treonina	2,20	\pm 0,56	1,49	\pm 0,39	1,47	\pm 0,36	1,79	\pm 0,77	1,25	\pm 0,29	1,87	\pm 0,36
Valina	3,25	\pm 0,83	2,43	\pm 0,64	3,64	\pm 0,94	4,08	\pm 1,23	1,40	\pm 0,38	2,40	\pm 0,70

Tabla 11. Metabolitos de frutos maduros de plantas de tomate con *AsrI* en sentido (S) y en antisentido (AS) bajo el promotor 35S en el experimento II. Se muestran los niveles de cambio de los metabolitos en los frutos de las líneas transgénicas en comparación con las plantas controles (WT) y el error estándar (EE). Los metabolitos fueron medidos por GC-MS. El análisis estadístico realizado fue ANOVA con el método de comparación de Duncan. Las variables estadísticamente significativas se marcaron en negrita. N=3-6.

	35S AS5 ± EE		35S AS17 ± EE		35S AS18 ± EE		35S S12 ± EE		35S S16 ± EE		35S S31 ± EE							
1-O-metil-galactopiranosido	1,51	±	1,12	1,28	±	1,12	1,18	±	1,00	1,22	±	1,29	1,12	±	1,00	1,14	±	1,00
1-O-metil-glucopiranosido	1,46	±	1,00	0,94	±	1,11	1,25	±	1,00	1,03	±	1,29	1,19	±	1,11	1,03	±	1,00
2,7-anhidro-sedoheptulosa	1,45	±	1,00	0,90	±	1,13	1,25	±	1,00	1,15	±	1,30	1,20	±	1,13	1,01	±	1,00
2-amino-2-deoxi-galactosa	1,03	±	1,00	2,21	±	0,89	1,28	±	0,89	0,97	±	1,00	0,87	±	1,00	0,51	±	1,00
2-amino-2-deoxi-glucosa	1,33	±	0,89	1,12	±	0,89	1,32	±	1,00	0,98	±	1,15	0,85	±	1,00	0,98	±	1,15
Ácido 1,4-glucónolactona	1,48	±	1,00	0,86	±	1,07	1,20	±	1,00	1,15	±	1,29	1,23	±	1,07	0,97	±	1,00
Ácido 2,4-diamino-butírico	1,39	±	1,12	1,28	±	1,00	1,45	±	1,00	1,09	±	1,12	1,41	±	1,12	1,29	±	1,12
Ácido 3-hidroxi-pirúvico	1,71	±	1,00	1,50	±	0,89	1,42	±	1,00	1,20	±	0,89	1,04	±	1,00	0,89	±	1,00
Ácido 3-indol-acético	1,03	±	1,00	2,22	±	0,89	1,30	±	0,89	0,97	±	1,00	0,88	±	1,00	0,53	±	1,00
Ácido 4-amino-butanoico	1,62	±	1,12	1,18	±	1,12	1,58	±	1,00	1,50	±	1,00	1,24	±	1,12	0,97	±	1,12
Ácido abscísico	1,43	±	0,85	1,27	±	0,85	1,30	±	1,00	1,30	±	1,00	1,08	±	0,85	0,75	±	0,77
Ácido ascórbico	1,47	±	1,00	0,94	±	1,12	1,24	±	1,00	1,17	±	1,30	1,18	±	1,12	1,02	±	1,00
Ácido aspártico	1,82	±	1,00	1,25	±	1,12	1,31	±	1,00	1,30	±	1,00	1,06	±	1,00	0,81	±	1,00
Ácido eritrónico	1,24	±	1,11	1,36	±	1,00	1,53	±	1,00	0,93	±	1,11	1,32	±	1,00	1,23	±	1,11
Ácido fenilpirúvico	1,48	±	1,00	1,26	±	1,12	1,21	±	1,00	1,23	±	1,00	1,14	±	1,00	1,14	±	1,00
Ácido fosfoenolpirúvico	1,51	±	1,13	1,19	±	1,38	1,43	±	1,00	1,19	±	1,00	1,43	±	1,00	0,83	±	1,00
Ácido fosfórico	1,66	±	1,00	1,16	±	0,87	1,17	±	0,77	1,30	±	0,87	0,91	±	0,77	1,08	±	0,77
Ácido glucurónico	1,38	±	0,89	1,26	±	1,00	1,40	±	0,89	1,34	±	1,00	1,15	±	1,00	1,02	±	1,00
Ácido glucurónico-3,6-lactona	1,08	±	1,00	2,06	±	0,90	1,33	±	0,90	1,09	±	1,00	0,95	±	1,00	0,61	±	1,00
Ácido glutámico	2,15	±	1,00	1,28	±	1,12	1,55	±	1,12	1,26	±	1,12	1,11	±	1,00	0,77	±	1,00
Ácido láctico	1,20	±	1,16	1,52	±	1,16	0,97	±	1,00	0,93	±	0,90	1,55	±	0,90	1,76	±	0,90
Ácido málico	1,32	±	1,12	1,34	±	1,00	1,49	±	1,00	1,00	±	1,12	1,31	±	1,00	1,26	±	1,12
Ácido mevalónico-1,5-lactona	1,80	±	1,00	1,27	±	1,12	1,32	±	1,00	1,31	±	1,00	0,91	±	1,12	0,84	±	1,00
Ácido subérico	1,28	±	0,89	0,86	±	1,00	1,00	±	0,89	1,17	±	0,89	0,98	±	0,89	0,78	±	0,89
Ácido treónico	1,86	±	1,00	1,26	±	1,14	1,31	±	1,00	1,30	±	1,00	1,08	±	1,00	0,79	±	1,00
Alanina	2,05	±	0,89	1,46	±	0,89	1,40	±	1,00	1,18	±	0,89	1,02	±	1,00	0,86	±	1,00
Alantoína	1,75	±	1,14	1,00	±	1,14	1,42	±	1,31	1,31	±	1,31	1,43	±	1,14	0,91	±	1,00
Alfa-lactosa	1,47	±	1,11	1,22	±	1,11	1,27	±	1,00	1,25	±	1,11	1,12	±	1,11	0,78	±	1,11
Asparagina	1,60	±	0,89	1,77	±	1,00	1,21	±	0,89	0,93	±	1,00	1,35	±	0,89	0,74	±	0,89
beta-alanina	1,71	±	1,12	1,18	±	1,12	1,79	±	1	2,00	±	1	1,77	±	1	1,25	±	1
D-glucopiranososa	1,46	±	1,00	0,92	±	1,12	1,24	±	1,00	1,15	±	1,29	1,20	±	1,12	1,01	±	1,00
Etanolamina	1,66	±	1,00	1,41	±	1,12	1,38	±	1,00	1,23	±	1,00	1,00	±	1,12	0,88	±	1,00
Fenilalanina	1,30	±	0,87	1,40	±	0,87	1,32	±	0,87	1,30	±	0,77	1,46	±	0,77	0,83	±	0,77
Fructosa	1,55	±	1,12	1,29	±	1,12	1,20	±	1,00	1,24	±	1,29	1,13	±	1,00	1,15	±	1,00
Fructosa-6-fosfato	1,45	±	0,67	1,15	±	1,00	1,20	±	0,67	1,05	±	1,00	0,85	±	1,00	0,80	±	0,67
Galactosa-6-fosfato	1,40	±	1,18	1,20	±	1,18	1,19	±	1,00	1,15	±	1,18	1,08	±	1,18	0,74	±	1,18
Gliceraldehído	1,00	±	0,89	0,54	±	0,89	0,45	±	0,89	0,62	±	0,89	1,00	±	1,15	0,43	±	0,89
Glucoheptosa	1,03	±	0,88	1,33	±	0,88	1,08	±	0,75	0,94	±	1,00	0,83	±	0,88	0,58	±	0,88

Glucosa	1,53	±	1,12	1,24	±	1,12	1,23	±	1,00	1,18	±	1,12	1,15	±	1,00	1,17	±	1,00
Glucosa-6-fosfato	1,51	±	0,91	1,15	±	1,00	1,22	±	0,91	1,06	±	1,00	1,03	±	1,09	0,85	±	0,91
Glutamina	1,68	±	1,14	1,06	±	1,14	2,20	±	1,00	0,89	±	1,14	0,86	±	1,14	0,74	±	1,00
Homoserina	1,93	±	1,00	1,28	±	1,20	1,48	±	1,20	1,24	±	1,20	1,09	±	1,00	0,83	±	1,00
Indol-3-acetaldehído	1,11	±	1,00	1,15	±	0,89	1,33	±	1,00	0,94	±	1,22	0,82	±	1,00	0,90	±	1,22
Isoleucina	1,65	±	1,00	1,40	±	1,12	1,38	±	1,00	1,24	±	1,00	0,99	±	1,12	0,86	±	1,00
Leucina	1,36	±	1,00	1,28	±	1,12	1,25	±	1,00	1,06	±	1,00	0,91	±	1,12	0,74	±	1,00
Lisina	1,79	±	1,00	1,31	±	1,12	1,44	±	1,00	1,29	±	1,12	0,96	±	1,12	0,87	±	1,00
Maltosa	2,32	±	0,90	1,19	±	1,00	1,33	±	0,90	1,27	±	1,15	1,23	±	1,00	0,79	±	1,00
Mioinositol	1,76	±	1,00	1,11	±	1,12	1,27	±	1,00	1,04	±	1,29	1,40	±	1,12	0,88	±	1,00
Mioinositol-2-fosfato	1,36	±	1,12	1,19	±	1,12	1,19	±	1,00	1,15	±	1,12	0,94	±	1,12	0,80	±	1,12
Nicotinamida	1,79	±	1,00	1,27	±	1,12	1,33	±	1,00	1,32	±	1,00	0,92	±	1,12	0,84	±	1,00
Norleucina	1,32	±	1,14	1,28	±	1,00	1,43	±	1,00	1,00	±	1,14	1,23	±	1,00	1,28	±	1,14
Ornitinalactama	1,41	±	1,12	1,29	±	1,00	1,45	±	1,00	1,11	±	1,12	1,40	±	1,12	1,31	±	1,12
Prolina	1,85	±	1,11	1,13	±	1,11	1,64	±	1,00	1,61	±	1,00	1,25	±	1,11	0,88	±	1,11
Putrescina	2,31	±	0,87	1,61	±	0,77	1,37	±	0,77	1,06	±	0,77	0,89	±	0,87	0,76	±	0,77
Sacarosa	2,02	±	0,77	1,57	±	0,77	1,59	±	0,77	1,48	±	0,87	1,24	±	0,87	1,36	±	0,77
Serina	1,69	±	1,00	1,48	±	0,89	1,40	±	1,00	1,18	±	0,89	1,02	±	1,00	0,88	±	1,00
Similar a hexopiranososa	1,40	±	0,89	1,03	±	1,16	1,41	±	0,89	1,39	±	1,00	1,17	±	1,00	1,18	±	0,89
Similar a glucopiranososa	1,57	±	1,00	1,57	±	1,00	1,57	±	1,00	1,57	±	1,12	1,57	±	1,12	1,57	±	1,00
Timidina	1,33	±	1,12	1,19	±	1,12	1,19	±	1,00	1,16	±	1,12	0,94	±	1,12	0,84	±	1,12
Trehalosa	1,25	±	1,09	1,58	±	1,00	1,25	±	1,00	1,08	±	1,27	1,15	±	1,09	0,71	±	1,00
Treonina	1,81	±	1,00	1,41	±	1,12	1,42	±	1,00	1,21	±	1,00	1,12	±	1,12	0,84	±	1,12
Urea	1,67	±	0,91	1,41	±	1,00	1,69	±	0,91	1,16	±	0,91	1,90	±	0,91	1,98	±	0,91
Uridina	1,27	±	1,13	1,68	±	1,00	1,16	±	1,00	1,05	±	1,30	1,10	±	1,13	0,72	±	1,00
Valina	1,43	±	0,89	1,33	±	0,89	1,32	±	1,15	1,21	±	0,89	1,17	±	1,00	0,89	±	0,89

Tabla 12. Metabolitos de frutos maduros de plantas de tomate con *Asr1* en sentido (S) y en antisentido (AS) bajo el promotor B33 en el experimento II. Se muestran los niveles de cambio de los metabolitos en los frutos de las líneas transgénicas en comparación con las plantas controles (WT) y el error estándar (EE). Los metabolitos fueron medidos por GC-MS. El análisis estadístico realizado fue ANOVA con el método de comparación de Duncan. Las variables estadísticamente significativas se marcaron en negrita. N=3-6.

	B33 AS17 ± EE		B33 AS27 ± EE		B33 AS28 ± EE		B33 S3 ± EE		B33 S12 ± EE		B33 S21 ± EE	
1-O-metil-galactopiranosido	1,17	± 1,00	1,06	± 1,00	1,10	± 1,12	1,04	± 1,00	1,03	± 1,00	1,04	± 1,00
1-O-metil-glucopiranosido	0,76	± 1,11	0,76	± 1,00	1,03	± 1,00	0,87	± 1,00	0,88	± 1,00	0,88	± 1,11
2,7-anhidro-sedoheptulosa	0,72	± 1,13	0,66	± 1,13	0,99	± 1,00	0,69	± 1,13	0,85	± 1,00	0,82	± 1,30
2-amino-2-deoxi-galactosa	0,58	± 1,00	1,46	± 0,89	2,82	± 0,89	1,09	± 1,15	0,91	± 0,89	1,59	± 1,15
2-amino-2-deoxi-glucosa	0,91	± 0,89	0,77	± 0,89	1,12	± 1,00	0,78	± 1,00	0,85	± 0,89	0,82	± 1,15
Ácido 1,4-glucónolactona	0,79	± 1,00	0,62	± 1,07	0,97	± 1,00	0,66	± 1,07	0,82	± 1,00	0,79	± 1,29
Ácido 2,4-diamino-butírico	1,68	± 1,00	0,71	± 1,00	0,61	± 1,00	1,31	± 1,00	1,28	± 1,00	1,53	± 1,00
Ácido 3-hidroxi-pirúvico	1,68	± 1,00	0,71	± 0,89	0,60	± 0,89	1,09	± 0,89	1,11	± 0,89	1,28	± 1,00
Ácido 3-indol-acético	0,61	± 1,00	1,45	± 0,89	2,81	± 0,89	1,11	± 1,15	0,91	± 0,89	1,67	± 1,15
Ácido 4-amino-butanoico	1,20	± 1,00	0,58	± 1,00	0,50	± 1,00	1,20	± 1,00	1,09	± 1,00	1,28	± 1,29
Ácido abscísico	0,90	± 0,77	0,58	± 0,77	0,88	± 0,77	0,82	± 0,77	0,95	± 0,77	0,92	± 1,00
Ácido ascórbico	0,77	± 1,12	0,75	± 1,00	1,02	± 1,00	0,74	± 1,12	0,87	± 1,00	0,86	± 1,12
Ácido aspártico	1,03	± 1,12	0,72	± 1,00	1,02	± 1,00	0,86	± 1,00	0,89	± 1,00	1,04	± 1,00
Ácido eritrónico	1,88	± 1,00	0,55	± 1,00	0,42	± 1,00	1,35	± 1,00	1,35	± 1,00	1,75	± 1,00
Ácido fenilpirúvico	1,18	± 1,29	1,05	± 1,00	1,16	± 1,00	1,03	± 1,00	1,02	± 1,00	1,04	± 1,00
Ácido fosfoenolpirúvico	1,47	± 1,13	0,68	± 1,00	0,77	± 1,38	0,98	± 1,00	1,04	± 1,00	1,15	± 1,00
Ácido fosfórico	1,35	± 0,87	0,74	± 1,00	0,89	± 0,77	1,13	± 0,87	1,11	± 0,77	0,87	± 0,77
Ácido glucurónico	0,71	± 1,00	0,96	± 0,89	1,68	± 1,15	0,87	± 1,00	0,79	± 0,89	1,41	± 1,00
Ácido glucurónico-3,6-lactona	0,75	± 1,00	1,28	± 0,90	2,41	± 0,90	1,03	± 1,16	0,89	± 0,90	1,51	± 1,16
Ácido glutámico	0,91	± 1,29	0,58	± 1,00	1,05	± 1,00	0,95	± 1,00	0,93	± 1,00	0,90	± 1,00
Ácido láctico	1,15	± 0,90	0,90	± 0,90	0,99	± 0,90	0,72	± 1,00	1,35	± 0,90	0,67	± 1,00
Ácido málico	1,80	± 1,00	0,62	± 1,00	0,52	± 1,00	1,33	± 1,00	1,32	± 1,00	1,65	± 1,00
Ácido mevalónico-1,5-lactona	1,07	± 1,12	0,75	± 1,00	1,03	± 1,00	0,89	± 1,00	0,91	± 1,00	1,05	± 1,00
Ácido subérico	0,80	± 0,89	0,68	± 1,11	0,78	± 0,89	0,91	± 0,89	0,85	± 0,89	0,80	± 0,89
Ácido treónico	0,86	± 1,00	0,73	± 1,00	1,06	± 1,00	0,84	± 1,00	0,85	± 1,00	1,06	± 1,00
Alanina	1,63	± 1,00	0,68	± 0,89	0,56	± 0,89	1,06	± 0,89	1,09	± 0,89	1,26	± 1,00
Alantoína	1,48	± 1,00	0,56	± 1,14	0,39	± 1,00	0,94	± 1,14	1,05	± 1,00	0,83	± 1,31
Alfa-lactosa	1,15	± 1,11	0,56	± 1,00	0,87	± 1,00	0,84	± 1,00	1,01	± 1,11	0,74	± 1,29
Asparagina	0,88	± 1,00	0,51	± 1,00	0,61	± 1,00	0,92	± 0,89	0,90	± 0,89	1,13	± 0,89
beta-alanina	1,65	± 1	0,61	± 1	0,30	± 1	1,16	± 1,30	1,20	± 1	0,91	± 1
D-glucopiranososa	0,76	± 1,12	0,73	± 1,00	1,00	± 1,00	0,72	± 1,12	0,86	± 1,00	0,83	± 1,29
Etanolamina	1,20	± 1,12	0,45	± 1,12	0,66	± 1,00	1,09	± 1,00	1,05	± 1,00	1,23	± 1,12
Fenilalanina	0,97	± 0,87	0,61	± 0,77	0,82	± 0,77	0,99	± 0,77	0,99	± 0,77	0,94	± 0,77
Fructosa	1,26	± 1,12	1,07	± 1,00	1,15	± 1,00	1,05	± 1,00	1,04	± 1,00	1,04	± 1,00
Fructosa-6-fosfato	0,85	± 1,00	1,10	± 0,67	1,30	± 0,67	0,75	± 0,67	0,90	± 1,00	0,70	± 1,00
Galactosa-6-fosfato	0,93	± 1,00	0,54	± 1,00	0,84	± 1,00	0,83	± 1,00	0,77	± 1,18	0,69	± 1,35
Gliceraldehído	0,87	± 1,15	0,96	± 1,00	0,69	± 0,89	1,24	± 0,89	0,04	± 1,00	0,14	± 1,00
Glucoheptosa	0,58	± 0,88	1,22	± 0,75	2,22	± 0,75	0,83	± 1,00	0,78	± 0,75	1,19	± 1,00

Glucosa	1,18	±	1,29	1,05	±	1,00	1,18	±	1,00	1,05	±	1,00	1,03	±	1,00	1,05	±	1,00
Glucosa-6-fosfato	0,96	±	0,91	1,07	±	0,91	1,32	±	0,91	0,79	±	0,91	0,90	±	1,00	0,68	±	1,09
Glutamina	1,26	±	1,00	0,59	±	1,14	0,86	±	1,00	1,00	±	1,00	1,41	±	1,14	1,06	±	1,00
Homoserina	0,94	±	1,30	0,63	±	1,00	1,06	±	1,00	0,96	±	1,00	0,93	±	1,00	0,93	±	1,00
Indol-3-acetaldehído	0,75	±	1,22	0,72	±	0,89	1,08	±	1,00	0,82	±	0,89	0,78	±	0,89	0,71	±	1,22
Isoleucina	1,19	±	1,12	0,42	±	1,12	0,64	±	1,00	1,09	±	1,00	1,04	±	1,00	1,23	±	1,12
Leucina	0,95	±	1,29	0,55	±	1,00	0,78	±	1,00	0,97	±	1,00	0,95	±	1,00	1,01	±	1,12
Lisina	1,13	±	1,12	0,47	±	1,12	0,71	±	1,00	0,96	±	1,00	0,96	±	1,00	1,21	±	1,12
Maltosa	0,79	±	1,00	0,56	±	0,90	0,85	±	1,00	0,91	±	0,90	0,78	±	1,00	0,68	±	1,15
Mioinositol	0,86	±	1,12	0,62	±	1,00	0,68	±	1,12	0,99	±	1,00	1,00	±	1,00	0,89	±	1,12
Mioinositol-2-fosfato	1,15	±	1,12	0,58	±	1,00	0,88	±	1,00	0,83	±	1,00	0,80	±	1,12	0,75	±	1,29
Nicotinamida	1,07	±	1,12	0,75	±	1,00	1,04	±	1,00	0,89	±	1,00	0,91	±	1,00	1,06	±	1,00
Norleucina	1,68	±	1,00	0,66	±	1,00	0,55	±	1,00	1,19	±	1,14	1,26	±	1,00	1,55	±	1,00
Ortinitinalactama	1,67	±	1,00	0,72	±	1,00	0,63	±	1,00	1,21	±	1,12	1,28	±	1,00	1,51	±	1,00
Prolina	1,14	±	1,00	0,59	±	1,00	0,49	±	1,00	1,16	±	1,00	1,04	±	1,00	1,28	±	1,11
Putrescina	1,32	±	0,77	0,74	±	0,87	1,22	±	0,87	1,22	±	0,77	1,07	±	0,77	1,39	±	0,77
Sacarosa	1,16	±	0,77	1,29	±	0,87	1,49	±	0,87	0,50	±	0,87	0,86	±	0,77	0,87	±	1,00
Serina	1,66	±	1,00	0,70	±	0,89	0,59	±	0,89	0,92	±	1,00	1,10	±	0,89	1,26	±	1,00
Similar a hexopiranososa	0,72	±	1,00	0,93	±	0,89	1,54	±	1,00	0,82	±	1,00	0,79	±	0,89	1,37	±	1,00
Similar a glucopiranososa	1,57	±	1,00	1,57	±	1,00	1,57	±	1,00	1,57	±	1,29	1,57	±	1,00	1,57	±	1,29
Timidina	1,16	±	1,12	0,61	±	1,00	0,90	±	1,00	0,85	±	1,00	0,82	±	1,12	0,78	±	1,29
Trehalosa	0,60	±	1,09	0,69	±	1,09	1,21	±	1,00	0,81	±	1,00	1,06	±	1,09	0,77	±	1,27
Treonina	1,43	±	1,12	0,81	±	1,00	0,88	±	1,00	1,00	±	1,00	1,12	±	1,00	1,23	±	1,12
Urea	1,32	±	0,91	1,07	±	0,91	1,30	±	0,91	1,59	±	1,00	2,32	±	0,91	0,96	±	0,91
Uridina	0,68	±	1,13	0,74	±	1,00	1,10	±	1,00	0,82	±	1,00	0,98	±	1,13	0,73	±	1,30
Valina	1,61	±	1,00	0,62	±	0,89	0,73	±	0,89	1,05	±	1,00	1,32	±	0,89	1,26	±	0,89

Tabla 13. Metabolitos de frutos maduros de plantas de tomate con *Asr1* en sentido (S) y antisentido (AS) bajo el promotor 35S durante el experimento III. Niveles de cambio de los metabolitos en los frutos de las líneas transgénicas en comparación con las plantas controles (WT) durante el experimento III. Se muestra la media \pm el error estándar (EE). Los metabolitos fueron medidos por GC-MS. El análisis estadístico realizado fue ANOVA con el método de comparación de Duncan. Las variables estadísticamente significativas se marcaron en negrita. N=3-6.

	35S S5		35S AS17		35S AS18		35S S12		35S S16		35S S31	
2,7-												
anhidrosedoheptulosa	1,20	\pm 1,14	1,02	\pm 1,14	1,27	\pm 1,00	0,88	\pm 1,00	1,03	\pm 1,00	0,97	\pm 1,14
2-amino-2-deoxigalactosa	1,16	\pm 1,16	1,49	\pm 1,16	1,63	\pm 0,90	1,51	\pm 0,90	2,00	\pm 1,16	1,38	\pm 1,16
2-amino-2-deoxiglucosa	1,08	\pm 1,30	1,01	\pm 1,30	1,30	\pm 1,12	0,83	\pm 1,12	0,70	\pm 1,30	0,77	\pm 1,30
5-ornitinalactama	0,83	\pm 1,28	0,88	\pm 1,28	1,39	\pm 1,00	0,94	\pm 1,11	1,07	\pm 1,11	1,32	\pm 1,28
ácido 3-hidroxipirúvico	1,09	\pm 1,15	1,21	\pm 1,15	1,25	\pm 0,89	1,15	\pm 0,89	1,01	\pm 1,00	1,21	\pm 1,15
ácido 4-aminobutanoico	1,11	\pm 1,15	1,60	\pm 1,15	1,32	\pm 0,89	1,36	\pm 0,89	0,94	\pm 1,00	1,02	\pm 1,15
ácido abscísico	1,19	\pm 1,14	1,39	\pm 1,14	1,45	\pm 0,86	1,16	\pm 0,86	0,84	\pm 1,00	1,32	\pm 1,14
ácido ascórbico	1,20	\pm 1,16	1,06	\pm 1,16	1,25	\pm 1,00	0,88	\pm 1,00	1,02	\pm 1,00	0,99	\pm 1,16
ácido aspártico	1,26	\pm 1,16	1,36	\pm 1,16	1,36	\pm 0,89	1,37	\pm 0,89	0,92	\pm 1,16	1,40	\pm 1,16
ácido eritrónico	0,97	\pm 1,15	1,06	\pm 1,15	1,94	\pm 0,91	1,34	\pm 1,15	1,49	\pm 1,00	1,61	\pm 1,15
ácido fenilpirúvico	1,04	\pm 1,15	1,04	\pm 1,15	1,18	\pm 0,89	0,98	\pm 1,00	1,05	\pm 1,00	1,00	\pm 1,15
ácido fosfoenpirúvico	0,97	\pm 1,29	1,20	\pm 1,29	1,21	\pm 1,00	1,06	\pm 1,14	1,11	\pm 1,14	1,59	\pm 1,29
ácido fosfórico	0,93	\pm 1,00	0,80	\pm 1,00	1,14	\pm 0,77	1,03	\pm 0,77	0,77	\pm 1,00	1,39	\pm 1,00
ácido glucónico/galactónico	1,14	\pm 1,16	0,85	\pm 1,16	1,20	\pm 0,89	0,81	\pm 1,00	1,16	\pm 1,16	1,38	\pm 1,16
ácido glucónico-1,4-lactona	1,27	\pm 1,11	1,13	\pm 1,11	1,23	\pm 0,89	0,87	\pm 1,00	1,03	\pm 1,00	0,98	\pm 1,11
ácido glucurónico/galacturónico	1,13	\pm 1,15	0,88	\pm 1,15	1,20	\pm 0,90	0,82	\pm 1,00	1,09	\pm 1,15	1,31	\pm 1,15
ácido glucurónico-3,6-lactona	1,68	\pm 1,15	0,99	\pm 1,15	1,38	\pm 0,89	1,01	\pm 1,00	1,74	\pm 1,00	1,74	\pm 1,15
ácido glutámico	1,15	\pm 1,15	1,43	\pm 1,15	1,26	\pm 0,89	1,25	\pm 0,89	1,06	\pm 1,00	1,46	\pm 1,15
ácido láctico	1,19	\pm 1,15	1,27	\pm 1,15	1,00	\pm 0,90	1,23	\pm 0,90	1,11	\pm 1,00	1,69	\pm 1,15
ácido málico	0,81	\pm 1,29	0,85	\pm 1,29	1,45	\pm 1,00	1,05	\pm 1,29	1,14	\pm 1,12	1,20	\pm 1,29
ácido mevalónico-1,5-lactona	1,25	\pm 1,16	1,33	\pm 1,16	1,34	\pm 0,90	1,34	\pm 0,90	0,92	\pm 1,16	1,40	\pm 1,16
ácido subérico	0,96	\pm 1,33	1,00	\pm 1,33	1,13	\pm 1,00	0,75	\pm 1,33	1,17	\pm 1,33	1,42	\pm 1,33
ácido treónico	1,29	\pm 1,12	1,42	\pm 1,12	1,41	\pm 0,88	1,38	\pm 0,88	0,99	\pm 1,00	1,36	\pm 1,12
alanina	1,05	\pm 1,15	1,23	\pm 1,15	1,27	\pm 0,90	1,15	\pm 0,90	0,99	\pm 1,00	1,59	\pm 1,15
alantoína	1,05	\pm 1,00	0,97	\pm 1,19	1,18	\pm 0,92	0,64	\pm 1,00	0,95	\pm 1,00	0,85	\pm 1,19
beta-alanina	0,99	\pm 1,15	1,21	\pm 1,15	1,07	\pm 0,88	1,13	\pm 0,88	0,64	\pm 1,00	1,82	\pm 1,15
beta-o-metilglucopiranosido	1,13	\pm 1,25	0,88	\pm 1,25	1,19	\pm 1,00	0,85	\pm 1,00	0,84	\pm 1,25	0,75	\pm 1,00
etanolamina	1,00	\pm 1,16	1,16	\pm 1,16	1,16	\pm 0,89	1,29	\pm 0,89	0,85	\pm 1,00	1,36	\pm 1,16
fenilalanina	1,05	\pm 1,29	1,59	\pm 1,29	1,44	\pm 1,00	1,42	\pm 1,00	0,64	\pm 1,12	0,66	\pm 1,29
fructosa	1,02	\pm 1,15	1,03	\pm 1,15	1,18	\pm 0,89	1,12	\pm 0,89	1,06	\pm 1,00	1,06	\pm 1,15
fructosa-6-fosfato	1,00	\pm 1,00	1,09	\pm 1,00	1,18	\pm 0,50	1,18	\pm 0,50	0,91	\pm 1,00	1,27	\pm 1,00
galactosa-6-fosfato	1,18	\pm 1,14	0,92	\pm 1,14	1,38	\pm 0,86	1,37	\pm 0,86	0,95	\pm 1,00	1,69	\pm 1,14
gliceraldehído	0,66	\pm 1,16	1,15	\pm 1,16	0,97	\pm 1,00	0,87	\pm 0,89	0,22	\pm 1,16	0,41	\pm 1,16
glucoheptosa	1,19	\pm 1,11	1,73	\pm 1,11	1,54	\pm 0,89	1,46	\pm 0,89	1,92	\pm 1,11	1,31	\pm 1,11
glucopiranososa	1,19	\pm 1,16	1,07	\pm 1,16	1,26	\pm 1,00	0,89	\pm 1,00	1,02	\pm 1,00	1,03	\pm 1,16
glucosa	1,05	\pm 1,15	0,99	\pm 1,15	1,16	\pm 0,89	0,96	\pm 1,00	1,04	\pm 1,00	0,93	\pm 1,15
glucosa-6-fosfato	1,06	\pm 1,25	0,75	\pm 1,25	1,19	\pm 1,00	0,89	\pm 1,00	0,86	\pm 1,25	1,22	\pm 1,25
glutamina	0,92	\pm 1,00	0,83	\pm 1,00	1,33	\pm 0,77	1,38	\pm 0,77	1,04	\pm 0,87	1,36	\pm 1,00
homoserina	0,79	\pm 1,29	0,94	\pm 1,14	1,51	\pm 1,00	1,07	\pm 1,29	1,17	\pm 1,14	1,31	\pm 1,29
indol 3-acetaldehído	1,26	\pm 1,00	1,11	\pm 1,00	1,29	\pm 0,78	0,87	\pm 0,89	0,71	\pm 1,00	0,82	\pm 1,00
isoleucina	0,83	\pm 1,29	0,96	\pm 1,29	0,95	\pm 1,00	1,07	\pm 1,00	0,80	\pm 1,29	1,11	\pm 1,29
lactosa	0,85	\pm 1,29	1,05	\pm 1,29	0,97	\pm 1,00	0,93	\pm 1,00	0,69	\pm 1,11	1,06	\pm 1,29
leucina	0,81	\pm 1,12	0,84	\pm 1,29	0,87	\pm 1,00	0,90	\pm 1,00	0,61	\pm 1,12	0,68	\pm 1,29
lisina	0,85	\pm 1,00	0,92	\pm 1,00	0,95	\pm 0,78	1,00	\pm 0,78	0,79	\pm 0,87	0,77	\pm 1,00
maltosa	1,00	\pm 1,13	1,08	\pm 1,13	1,05	\pm 0,88	0,67	\pm 1,00	0,85	\pm 1,00	0,76	\pm 1,13
mioinositol	0,92	\pm 1,00	0,99	\pm 1,00	0,96	\pm 0,77	0,68	\pm 0,87	0,78	\pm 0,87	0,77	\pm 1,00
mioinositol-2-fosfato	1,19	\pm 1,16	1,34	\pm 1,16	1,34	\pm 0,89	1,32	\pm 0,89	0,97	\pm 1,00	1,64	\pm 1,16

n-acetil-alanina	0,96	±	1,11	1,01	±	1,29	1,00	±	1,00	0,83	±	1,11	0,80	±	1,29	0,73	±	1,29
nicotinamida	1,24	±	1,15	1,07	±	1,15	1,33	±	0,89	1,33	±	0,89	0,92	±	1,15	1,38	±	1,15
norleucina	0,76	±	1,50	0,83	±	1,50	1,37	±	1,00	1,02	±	1,50	1,05	±	1,50	1,22	±	1,50
o-metilgalactopiranosido	1,04	±	1,15	1,02	±	1,15	1,16	±	0,89	1,10	±	0,89	1,06	±	1,00	1,02	±	1,15
o-metil-glucopiranosido	1,20	±	1,15	1,06	±	1,15	1,26	±	1,00	0,88	±	1,00	1,01	±	1,00	0,99	±	1,15
prolina	1,42	±	1,00	0,67	±	1,15	0,96	±	0,89	0,48	±	1,00	0,38	±	1,15	1,75	±	1,15
putrescina	0,79	±	1,19	0,97	±	1,19	1,03	±	0,92	0,95	±	0,92	0,88	±	1,00	1,22	±	1,19
sacarosa	1,19	±	1,15	1,10	±	1,15	1,09	±	0,89	1,12	±	0,89	0,79	±	1,00	0,99	±	1,15
serina	1,09	±	1,15	1,20	±	1,15	1,25	±	0,89	1,15	±	0,89	1,01	±	1,00	1,20	±	1,15
similar a glucopiranososa	1,03	±	1,29	1,03	±	1,29	1,28	±	1,00	0,91	±	1,00	0,76	±	1,12	0,71	±	1,29
similar a hexapiranososa	1,01	±	1,30	0,88	±	1,30	1,06	±	1,00	0,87	±	1,00	0,96	±	1,30	1,02	±	1,30
timina	1,18	±	1,15	1,27	±	1,15	1,32	±	0,89	1,30	±	0,89	0,98	±	1,00	1,62	±	1,15
trehalosa	1,17	±	1,18	1,39	±	1,18	1,22	±	0,91	0,73	±	1,00	0,54	±	1,18	0,51	±	1,18
treonina	1,14	±	1,15	1,21	±	1,15	1,17	±	0,89	1,18	±	0,89	1,03	±	1,00	1,51	±	1,15
urea	1,02	±	1,15	1,77	±	1,15	1,40	±	0,89	1,65	±	0,89	1,55	±	1,15	5,41	±	1,15
uridina	0,99	±	1,18	1,13	±	1,18	1,06	±	0,88	0,64	±	1,00	0,61	±	1,18	0,69	±	1,18
valina	0,70	±	1,28	0,73	±	1,28	0,85	±	1,00	0,68	±	1,11	0,57	±	1,11	1,10	±	1,28

Tabla 14. Metabolitos de frutos maduros de plantas de tomate con *Asr1* en sentido (S) y antisentido (AS) bajo el promotor B33 en el experimento III. Niveles de cambio de los metabolitos de frutos de las líneas transgénicas en comparación con las plantas controles (WT) durante el experimento III. Se muestra la media \pm el error estándar (EE). Los metabolitos fueron medidos por GC-MS. El análisis estadístico realizado fue ANOVA con el método de comparación de Duncan. Las variables estadísticamente significativas se marcaron en negrita. N=3-6.

	B33 AS17		B33 AS27		B33 AS28		B33 S3		B33 S12		B33 S21	
2,7-												
anhidrocedoheptulosa	0,98	\pm 1,14	0,81	\pm 0,89	0,92	\pm 0,89	1,21	\pm 1,14	1,05	\pm 0,89	0,96	\pm 1,00
2-amino-2-deoxigalactosa	1,19	\pm 1,00	2,13	\pm 0,90	5,55	\pm 0,90	1,96	\pm 0,90	1,70	\pm 0,90	1,52	\pm 1,16
2-amino-2-deoxiglucosa	0,93	\pm 1,00	0,85	\pm 1,00	0,95	\pm 1,00	1,17	\pm 1,30	1,06	\pm 1,00	1,11	\pm 1,30
5-ornitinalactama	1,21	\pm 1,00	0,82	\pm 1,00	0,58	\pm 1,00	1,46	\pm 1,00	1,09	\pm 1,00	0,91	\pm 1,11
ácido 3-hidroxi pirúvico	0,99	\pm 0,89	0,79	\pm 1,00	0,71	\pm 1,00	1,14	\pm 0,89	0,92	\pm 1,00	1,19	\pm 1,00
ácido 4-aminobutanoico	0,82	\pm 0,89	0,61	\pm 0,89	0,47	\pm 1,00	1,19	\pm 0,89	0,57	\pm 1,00	1,31	\pm 1,00
ácido abscísico	0,81	\pm 0,86	0,87	\pm 0,86	1,06	\pm 1,14	0,94	\pm 1,00	1,00	\pm 0,86	1,52	\pm 1,00
ácido ascórbico	0,94	\pm 0,90	0,82	\pm 0,90	0,92	\pm 0,90	1,20	\pm 1,16	1,04	\pm 0,90	0,95	\pm 1,00
ácido aspártico	0,89	\pm 0,89	0,92	\pm 0,89	1,07	\pm 0,89	1,03	\pm 1,00	0,89	\pm 1,00	1,46	\pm 1,00
ácido eritrónico	1,68	\pm 0,91	0,94	\pm 0,91	0,60	\pm 0,91	2,39	\pm 1,00	1,39	\pm 0,91	1,13	\pm 1,00
ácido fenilpirúvico	1,10	\pm 1,00	1,00	\pm 0,89	0,97	\pm 0,89	1,19	\pm 1,00	1,07	\pm 0,89	0,96	\pm 1,00
ácido fosfoenolpirúvico	0,59	\pm 1,00	0,89	\pm 1,00	0,58	\pm 1,00	0,76	\pm 1,14	0,86	\pm 1,29	1,44	\pm 1,14
ácido fosfórico	0,88	\pm 1,00	0,74	\pm 0,77	0,89	\pm 1,00	1,35	\pm 0,77	0,93	\pm 0,87	0,89	\pm 0,87
ácido glucónico/galactónico	1,40	\pm 0,89	0,93	\pm 0,89	1,26	\pm 1,00	1,13	\pm 0,89	0,84	\pm 1,00	0,70	\pm 1,00
ácido glucónico-1,4-lactona	0,94	\pm 0,89	0,84	\pm 0,89	0,94	\pm 0,89	1,27	\pm 1,11	1,05	\pm 0,89	0,98	\pm 1,00
ácido glucurónico/galacturónico	1,32	\pm 0,90	0,92	\pm 0,90	1,20	\pm 1,00	1,14	\pm 0,90	0,87	\pm 1,00	0,74	\pm 1,00
ácido glucurónico-3,6-lactona	0,98	\pm 0,89	0,76	\pm 0,89	0,82	\pm 0,89	0,99	\pm 1,00	0,87	\pm 1,00	1,05	\pm 1,00
ácido glutámico	0,84	\pm 1,00	0,74	\pm 0,89	0,70	\pm 0,89	0,95	\pm 1,00	0,90	\pm 0,89	1,41	\pm 1,15
ácido láctico	1,52	\pm 0,90	1,02	\pm 0,90	1,13	\pm 1,00	1,09	\pm 0,90	1,06	\pm 0,90	0,92	\pm 1,00
ácido málico	1,27	\pm 1,00	0,79	\pm 1,00	0,53	\pm 1,00	1,57	\pm 1,00	1,09	\pm 1,00	0,91	\pm 1,12
ácido mevalónico-1,5-lactona	0,90	\pm 0,90	0,92	\pm 0,90	1,06	\pm 0,90	1,03	\pm 1,00	0,89	\pm 1,00	1,43	\pm 1,00
ácido subérico	0,88	\pm 1,00	1,04	\pm 1,00	1,04	\pm 1,00	1,04	\pm 1,00	1,00	\pm 1,00	1,13	\pm 1,33
ácido treónico	0,87	\pm 0,88	0,95	\pm 0,88	1,14	\pm 0,88	1,05	\pm 1,00	0,99	\pm 0,88	1,53	\pm 1,12
alanina	0,98	\pm 0,90	0,92	\pm 0,90	0,67	\pm 1,00	1,13	\pm 0,90	0,90	\pm 1,00	1,20	\pm 1,00
alantoína	0,56	\pm 0,92	0,33	\pm 1,00	0,32	\pm 0,92	1,01	\pm 1,19	0,31	\pm 1,00	0,87	\pm 1,00
beta-alanina	0,74	\pm 0,88	0,60	\pm 0,88	0,37	\pm 1,00	1,07	\pm 0,88	0,49	\pm 1,00	1,23	\pm 1,00
beta-o-metil-glucopiranosido	0,95	\pm 1,00	0,81	\pm 1,00	0,98	\pm 1,00	1,19	\pm 1,25	1,04	\pm 1,00	1,09	\pm 1,25
etanolamina	0,74	\pm 0,89	0,64	\pm 0,89	0,54	\pm 1,00	0,97	\pm 0,89	0,87	\pm 1,00	1,00	\pm 1,00
fenilalanina	0,63	\pm 1,00	0,62	\pm 1,00	0,44	\pm 1,12	0,93	\pm 1,00	1,06	\pm 1,00	0,90	\pm 1,12
fructosa	1,12	\pm 1,00	1,04	\pm 0,89	0,98	\pm 0,89	1,20	\pm 1,00	1,07	\pm 0,89	0,96	\pm 1,00
fructosa-6-fosfato	0,91	\pm 0,50	1,09	\pm 0,50	1,36	\pm 0,50	1,27	\pm 1,00	1,18	\pm 0,50	1,00	\pm 1,00
galactosa-6-fosfato	0,86	\pm 1,00	0,86	\pm 0,86	0,82	\pm 0,86	0,88	\pm 1,00	0,82	\pm 1,00	1,54	\pm 1,00
gliceraldehído	0,66	\pm 0,89	0,56	\pm 0,89	0,95	\pm 1,00	0,54	\pm 0,89	0,49	\pm 0,89	0,93	\pm 1,00
glucoheptosa	1,15	\pm 1,00	1,85	\pm 0,89	4,15	\pm 1,00	1,81	\pm 0,89	1,62	\pm 0,89	1,69	\pm 1,00
glucopiranososa	0,94	\pm 0,90	0,82	\pm 0,90	0,92	\pm 0,90	1,20	\pm 1,16	1,04	\pm 0,90	0,95	\pm 1,00
glucosa	1,09	\pm 1,00	0,94	\pm 0,89	0,93	\pm 0,89	1,14	\pm 0,89	1,01	\pm 1,00	0,93	\pm 1,00
glucosa-6-fosfato	0,89	\pm 1,00	1,03	\pm 1,00	1,39	\pm 1,00	1,08	\pm 1,00	1,11	\pm 1,00	1,06	\pm 1,00
glutamina	0,55	\pm 0,87	0,72	\pm 0,87	0,60	\pm 0,77	0,93	\pm 0,77	1,02	\pm 0,77	1,36	\pm 0,87
homoserina	1,31	\pm 1,00	0,79	\pm 1,00	0,53	\pm 1,00	1,80	\pm 1,14	1,12	\pm 1,00	0,92	\pm 1,14
indol 3-acetaldehído	1,00	\pm 0,78	0,95	\pm 0,78	1,08	\pm 0,78	1,32	\pm 0,78	1,18	\pm 0,78	1,08	\pm 0,89
isoleucina	0,61	\pm 1,00	0,51	\pm 1,00	0,44	\pm 1,12	0,79	\pm 1,00	0,73	\pm 1,12	0,83	\pm 1,12
lactosa	0,54	\pm 1,00	0,59	\pm 1,00	0,55	\pm 1,00	0,88	\pm 1,00	0,71	\pm 1,00	1,03	\pm 1,11
leucina	0,63	\pm 1,00	0,50	\pm 1,00	0,52	\pm 1,12	0,72	\pm 1,00	0,81	\pm 1,29	0,76	\pm 1,12
lisina	0,73	\pm 0,78	0,58	\pm 0,78	0,46	\pm 0,87	0,96	\pm 0,78	0,70	\pm 0,87	0,86	\pm 0,87
maltosa	0,63	\pm 0,88	0,64	\pm 0,88	0,69	\pm 0,88	0,84	\pm 1,00	0,92	\pm 0,88	1,05	\pm 1,13
mioinositol	0,74	\pm 0,77	0,64	\pm 0,77	0,51	\pm 0,87	1,02	\pm 1,00	0,93	\pm 1,00	1,12	\pm 1,00
mioinositol-2-fosfato	0,88	\pm 1,00	0,85	\pm 0,89	0,85	\pm 0,89	0,88	\pm 1,00	0,82	\pm 1,00	1,42	\pm 1,00

n-acetil-alanina	0,61	±	1,00	0,53	±	1,00	0,42	±	1,11	0,82	±	1,00	0,74	±	1,11	0,86	±	1,11
nicotinamida	0,89	±	0,89	0,92	±	0,89	1,05	±	0,89	1,03	±	1,00	0,99	±	0,89	1,41	±	1,15
norleucina	1,20	±	1,00	0,78	±	1,00	0,54	±	1,00	1,59	±	1,25	1,05	±	1,00	0,88	±	1,25
o-metilgalactopiranosido	1,10	±	1,00	1,00	±	0,89	0,96	±	0,89	1,18	±	1,00	1,06	±	0,89	0,96	±	1,00
o-metil-glucopiranosido	0,94	±	0,89	0,82	±	0,89	0,92	±	0,89	1,20	±	1,15	1,04	±	0,89	0,97	±	0,89
prolina	0,64	±	0,89	0,54	±	0,89	1,69	±	0,89	1,25	±	0,89	0,72	±	1,15	1,29	±	1,00
putrescina	0,66	±	1,00	0,92	±	0,92	0,66	±	1,19	0,69	±	1,00	0,91	±	0,92	1,06	±	1,00
sacarosa	0,74	±	0,89	0,82	±	0,89	0,91	±	0,89	1,11	±	1,15	1,00	±	0,89	1,25	±	1,15
serina	0,99	±	0,89	0,80	±	1,00	0,71	±	1,00	1,13	±	0,89	0,92	±	1,00	1,19	±	1,00
similar a glucopiranososa	1,10	±	1,00	1,03	±	1,00	1,26	±	1,00	1,18	±	1,00	1,23	±	1,00	1,12	±	1,29
similar a hexapiranososa	1,16	±	1,00	0,79	±	1,00	1,06	±	1,30	1,03	±	1,00	0,88	±	1,00	0,77	±	1,30
timina	0,89	±	1,00	0,86	±	0,89	0,85	±	0,89	0,89	±	1,00	0,83	±	1,00	1,36	±	1,00
treonina	0,82	±	0,89	0,87	±	0,89	0,70	±	1,00	1,06	±	0,89	0,91	±	1,00	1,07	±	1,00
urea	3,92	±	0,89	1,14	±	1,00	1,26	±	1,00	1,61	±	0,89	1,78	±	0,89	0,97	±	1,00
uridina	0,51	±	0,88	0,48	±	1,00	0,52	±	0,88	0,69	±	1,00	0,89	±	0,88	0,97	±	1,18
valina	0,63	±	1,00	0,57	±	1,00	0,47	±	1,11	0,68	±	1,00	0,56	±	1,11	1,01	±	1,11

Tabla 15. Identificación de las sondas cuyos niveles de expresión resultaron significativamente disminuidos en comparación con las plantas controles ($p < 0,05$) en al menos una de las líneas silenciadas AS5 o AS17 para *Asr1* bajo el promotor 35S. Se muestra para cada sonda en cada línea los niveles de cambio de su ARNm y el p-valor junto al nombre del gen que representa la sonda (A). En la tabla siguiente (B) se muestra la clasificación Mapman y la homología de la sonda con genes de la base de datos *Sol Genomics Network* (genes de tomate) y/o de la base de datos TAIR (genes de arabidopsis). Los p-valores estadísticamente significativos se marcaron en negrita ($p < 0,05$). A cada sonda se le asignó un número de identificación, que se encuentra en el margen izquierdo de cada tabla.

A	Identificación de la sonda	AS5 Niveles de cambio	p-valor	AS17 niveles de cambio	p-valor	Nombre del gen
1	Les.3980.1.S1_at	-1,73	0,0035	-1,01	0,08	LOX2 (LIPOXYGENASE 2)
2	Les.677.2.A1_at	-1,24	0,0035	-0,86	0,06	HISTONE H2A 5
3	Les.4312.2.S1_at	-1,36	0,0069	-0,79	0,21	PEPTIDASE M48
4	Les.2305.1.S1_at	-1,35	0,0074	-1,05	0,08	AHP1 (HISTIDINE-CONTAINING PHOSPHOTRANSMITTER 3)
5	LesAffx.66800.1.S1_at	-1,31	0,0074	-0,69	0,30	NUDT14 (Nudix hydrolase homolog 14)
6	Les.3090.1.S1_at	-1,41	0,0124	-0,69	0,30	HISTONE H3.2
7	Les.2117.1.A1_at	-1,16	0,0210	-1,07	0,06	UNKNOWN
8	LesAffx.30810.1.S1_at	-1,15	0,0220	-0,79	0,21	UNKNOWN
9	LesAffx.47278.1.S1_at	-1,13	0,0246	-0,85	0,16	UNKNOWN
10	LesAffx.68367.1.S1_at	-1,20	0,0246	-0,78	0,26	ASPARTYL PROTEASE
11	LesAffx.51271.1.S1_at	-1,18	0,0261	-0,72	0,31	WLIM1 (LIM protein)
12	Les.2702.1.S1_a_at	-1,22	0,0263	-0,24	1,00	beta-fructosidase
13	LesAffx.58308.1.S1_at	-1,11	0,0263	-0,60	0,32	CBF4/DREB1D (C- REPEAT-BINDING FACTOR 4)
14	Les.4442.1.S1_s_at	-1,10	0,0274	-0,85	0,17	HTB1 (histone h2b.1)
15	Les.56.1.S1_at	-1,17	0,0283	-0,84	0,19	histone H4
16	LesAffx.64054.3.S1_at	-1,20	0,0298	0,20	0,89	GST29 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 29)
17	LesAffx.69492.1.S1_at	-1,05	0,0300	-0,78	0,22	NF-YC13 (nuclear factor Y, subunit C13)
18	LesAffx.8333.1.S1_at	-1,15	0,0300	-1,07	0,08	EFE (ETHYLENE FORMING ENZYME)
19	Les.5523.1.S1_at	-1,06	0,0347	-0,13	1,00	ENODL17 (EARLY NODULIN-LIKE PROTEIN 17)
20	Les.3967.1.S1_at	-1,02	0,0366	-0,74	0,23	FAD8 (FATTY ACID DESATURASE 8)
21	LesAffx.14559.1.S1_at	-1,02	0,0366	-0,55	0,51	COX19-1 (cytochrome c oxidase 19-1)
22	LesAffx.17164.1.A1_at	-1,07	0,0366	-0,70	0,38	MOD1 (MOSAIC DEATH 1)
23	LesAffx.31317.8.S1_at	-1,00	0,0366	-0,81	0,19	glycosyl transferase family 28 protein
24	Les.2561.1.S1_at	-0,98	0,0418	-1,02	0,09	UNKNOWN
25	Les.4803.1.S1_at	-1,10	0,0418	-1,17	0,06	proline oxidase
26	Les.10.1.S1_at	-0,98	0,0420	-0,97	0,09	GA3OX1 (gibberellin 3-beta-dioxygenase)
27	Les.1.1.S1_at	-1,22	0,0424	-0,34	0,80	BGAL1 (BETA GALACTOSIDASE 1)
28	Les.4596.1.S1_at	-0,96	0,0451	-0,99	0,09	protease inhibitor p322 precursor
29	LesAffx.65028.1.S1_at	-1,04	0,0451	-0,93	0,12	UNKNOWN
30	LesAffx.1574.8.A1_at	-0,97	0,0454	-0,92	0,13	ATG6 (autophagy protein 6)
31	Les.5357.1.S1_at	-0,94	0,0455	-1,04	0,07	DTX35 (DETOXIFYING EFFLUX CARRIER 35)
32	LesAffx.46215.1.S1_at	-0,94	0,0467	-0,78	0,19	ATAUR1 (ATAURORA1)
33	LesAffx.2226.2.A1_at	-1,02	0,0471	-0,66	0,35	TSO2 (ribonucleotide reductase small subunit)
34	Les.1049.1.S1_at	-0,96	0,0475	-0,89	0,14	SCAMP (secretory carrier membrane protein)
35	LesAffx.71515.1.S1_at	-0,93	0,0482	-0,97	0,09	CHL (CHLOROPLASTIC LIPOCALIN)
36	LesAffx.59056.1.S1_at	-0,88	0,0904	-1,92	0,00	HBP1 (HAEM-BINDING PROTEIN 1)
37	LesAffx.1345.1.S1_at	-0,68	0,1211	-1,97	0,00	OXIDOREDUCTASE (LIPID)
38	LesAffx.56637.1.S1_at	-0,86	0,0885	-1,78	0,00	DNAJ (heat shock protein)
39	LesAffx.41477.1.S1_at	-0,82	0,1087	-1,71	0,00	HPR (HYDROXYPYRUVATE REDUCTASE)
40	LesAffx.22898.1.S1_at	-0,83	0,1021	-1,69	0,01	UNKNOWN
41	Les.2890.1.S1_at	-0,48	0,4073	-1,61	0,01	UNKNOWN
42	Les.1832.1.A1_at	-0,60	0,2200	-1,61	0,01	PGR5 (PROTON GRADIENT REGULATION 5)
43	Les.2092.1.S1_at	-0,74	0,1874	-1,45	0,01	PRXR1 (peroxidase 42)
44	LesAffx.3253.1.S1_at	-0,67	0,1144	-1,94	0,01	CYP707A1 (cytochrome P450)
45	Les.327.1.S1_at	-0,59	0,3074	-1,52	0,01	RPT2 (ROOT PHOTOTROPISM 2)
46	Les.2137.1.S1_at	-0,71	0,1745	-1,47	0,02	LRR family protein

47	LesAffx.71603.1.S1_at	-0,84	0,0865	-1,33	0,02	SPL3 (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 3)
48	Les.1785.1.A1_at	-0,65	0,1995	-1,38	0,02	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein
49	LesAffx.70764.1.S1_at	-0,76	0,2426	-1,43	0,03	RBCL (large subunit of RUBISCO)
50	Les.5327.1.S1_at	-0,82	0,0915	-1,25	0,03	LRR1 (LEUCINE RICH REPEAT PROTEIN 1)
51	LesAffx.44987.3.S1_at	-0,90	0,0682	-1,21	0,03	SPS1 (SOLANESYL DIPHOSPHATE SYNTHASE 1)
52	Les.5039.1.S1_at	-0,92	0,0682	-1,26	0,03	CDC20.1 (CELL DIVISION CYCLE 20.1)
53	LesAffx.63979.1.S1_at	0,46	1,0000	-1,25	0,03	MEE66 (maternal effect embryo arrest 66)
54	Les.5917.1.S1_at	0,27	0,7629	-0,88	0,04	ACO1 (ACC OXIDASE 1)
55	Les.3551.1.S1_at	-0,36	0,5743	-1,34	0,04	MBF1C (MULTIPROTEIN BRIDGING FACTOR 1C)
56	LesAffx.63984.1.S1_at	-0,52	0,3146	-1,24	0,04	CYP98A3 (CYTOCHROME P450)
57	Les.3454.1.S1_at	-0,37	0,6447	-1,24	0,04	ABA3 (ABA DEFICIENT 3)
58	LesAffx.65143.1.S1_at	-0,41	0,5692	-1,43	0,04	UNKNOWN
59	Les.98.1.S1_at	-0,52	0,3863	-1,20	0,04	MFP1 (MAR BINDING FILAMENT-LIKE PROTEIN 1)
60	Les.325.1.A1_at	-0,75	0,1678	-1,17	0,04	OHP2 (ONE-HELIX PROTEIN 2)
61	Les.3700.1.S1_at	-0,47	0,2994	-1,24	0,04	NSHB1 (HEMOGLOBIN 1)
62	Les.392.1.S1_at	-0,92	0,0943	-1,22	0,04	ALPHA/BETA-HYDROLASE PROTEIN
63	Les.4620.1.S1_at	-0,43	0,4703	-1,16	0,04	PAP27 (purple acid phosphatase 27)
64	Les.5696.1.S1_at	-0,49	0,3894	-1,17	0,04	Metallo-hydrolase/oxidoreductase superfamily protein
65	LesAffx.58365.1.S1_at	-0,22	0,9429	-1,23	0,04	DNAJ (heat shock PROTEIN)
66	LesAffx.43670.1.S1_at	-0,70	0,1771	-1,15	0,05	SBPASE (SEDOHEPTULOSE-BISPHOSPHATASE)
67	Les.293.1.S1_at	-0,29	0,6525	-1,23	0,05	GSTU7 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 25)
68	Les.4888.1.S1_at	-0,71	0,1392	-1,27	0,05	NUDT2 (Nudix hydrolase homolog 2)
69	Les.396.2.A1_at	-0,40	0,5915	-1,19	0,05	UNKNOWN
70	Les.3679.1.S1_at	-0,80	0,1131	-1,61	0,01	ERF1 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1)
71	Les.217.1.S1_at	-6,38	0,0000	-6,22	0,00	copper ion binding
72	Les.3619.1.S1_at	-2,63	0,0000	-4,25	0,00	GF14 (G-BOX FACTOR14)
73	Les.4418.1.A1_s_at	-4,39	0,0000	-3,89	0,00	ASR1
74	Les.5468.1.S1_at	-3,31	0,0000	-3,60	0,00	NADP-dependent oxidoreductase
75	Les.852.1.A1_at	-4,67	0,0000	-4,70	0,00	UNKNOWN
76	Les.12.1.S1_at	-2,04	0,0007	-2,27	0,00	Cystathionine beta-synthase (CBS) protein
77	Les.4603.1.S1_at	-2,37	0,0000	-2,18	0,00	histone H3
78	Les.4876.1.S1_at	-0,95	0,0451	-2,17	0,00	EF-1-alpha (elongation factor 1-alpha)
79	LesAffx.30683.2.S1_at	-1,14	0,0220	-2,20	0,00	RING/U-box superfamily protein
80	Les.45.1.S1_at	-1,94	0,0007	-2,18	0,00	OSM34 (OSMOTIN 34)
81	Les.3527.1.S1_at	-1,13	0,0300	-1,99	0,00	LOX1 (Lipoxygenase 1)
82	Les.3597.1.S1_at	-2,06	0,0007	-1,85	0,00	DUT1 (DUTP-PYROPHOSPHATASE-LIKE 1)
83	Les.5282.1.S1_at	-1,65	0,0035	-1,88	0,00	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein
84	LesAffx.37563.1.S1_at	-0,87	0,0436	-2,06	0,00	CYP73A5 (CINNAMATE 4-HYDROXYLASE)
85	Les.4439.1.S1_at	-1,98	0,0007	-1,79	0,00	histone H3
86	LesAffx.71238.1.S1_at	-1,23	0,0246	-1,80	0,00	DAC (DEFECTIVE ACCUMULATION OF CYTOCHROME B6/F COMPLEX)
87	Les.2989.1.S1_at	-1,88	0,0013	-1,67	0,01	HTA6 (histone H2A)
88	Les.4493.1.S1_at	-1,08	0,0274	-1,59	0,01	RCA (RUBISCO ACTIVASE)
89	LesAffx.35593.1.S1_at	-1,00	0,0398	-1,55	0,01	FOP1 (FOLDED PETAL 1)
90	LesAffx.30145.1.S1_at	-1,37	0,0149	-1,75	0,01	PCR2 (PLANT CADMIUM RESISTANCE 2)
91	Les.4978.1.S1_at	-1,60	0,0035	-1,48	0,01	PRL (PROLIFERA)
92	Les.300.2.S1_at	-1,18	0,0095	-1,31	0,01	UNKNOWN
93	Les.3123.1.S1_at	-2,17	0,0007	-1,79	0,01	geranylgeranyl reductase
94	LesAffx.58583.1.S1_at	-1,74	0,0035	-1,51	0,01	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein
95	Les.72.1.S1_at	-1,56	0,0041	-1,47	0,01	FPS2 (FARNESYL DIPHOSPHATE SYNTHASE 2)
96	Les.3618.1.S1_at	-1,67	0,0074	-1,70	0,02	trypsin and protease inhibitor family protein
97	Les.4773.1.S1_at	-1,06	0,0347	-1,26	0,04	UNKNOWN
98	Les.4987.1.S1_at	-1,60	0,0035	-1,18	0,04	TET3 (TETRASPANIN3)
99	Les.1719.1.A1_at	-1,23	0,0421	-1,17	0,05	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein

B	Nombre del gen	Clasificación por categorías Mapman	Secuencias ortólogas
1	LOX2 (LIPOXYGENASE 2)	17.7.1.2 hormone metabolism.	(sgn-u572041): highly similar to (992)AT3G45140
2	HISTONE H2A 5	28.1.3 DNA.synthesis/chromatin structure.histone	(sgn-u570173): weakly similar to (184)AT1G08880
3	PEPTIDASE M48	29.5 protein.degradation	(sgn-u590507): very weakly similar to (80.9)AT3G27110
4	AHP1	30.2.99 signalling.receptor kinases.	(sgn-u574117): moderately similar to (201)AT3G21510
5	NUDT14	35.1 not assigned.no ontology	MULTIPLE HITS: (sgn-u577154,sgn-u577149) sgn-u577154
6	HISTONE H3.2	28.1.3 DNA.synthesis/chromatin structure.histone	(sgn-u581374): moderately similar to (216)AT4G40030
7	UNKNOWN	35.2 not assigned.unknown	(sgn-u569574): Tomato 200607#2 [2 ESTs aligned]
8	UNKNOWN	35.2 not assigned.unknown	MULTIPLE HITS: (sgn-u576724,sgn-u576725) sgn-u576724
9	UNKNOWN	34.99 transport.misc	(sgn-u572921): weakly similar to (127)AT1G19130
10	ASPARTYL PROTEASE	27.3.99 RNA.regulation of transcription.unclassified	(sgn-u570669): highly similar to (517)AT5G37540
11	WLIM1 (LIM protein)	33.99 development.unspecified	MULTIPLE HITS: (sgn-u577047,sgn-u587332) sgn-u577047
12	beta-fructosidase	2.2.1.3.2 major CHO metabolism.degradation.sucrose.	MULTIPLE HITS: (sgn-u578195,sgn-u578061,sgn-u578305) sgn-u578195
13	CBF4/DREB1D	27.3.3 RNA.regulation of transcription.AP2/EREBP	(sgn-u563215): weakly similar to (145)AT5G51990
14	HTB1 (histone h2b.1)	28.1.3 DNA.synthesis/chromatin structure.histone	(sgn-u579894): weakly similar to (167)AT1G07790
15	histone H4	28.1.3 DNA.synthesis/chromatin structure.histone	(sgn-u580775): weakly similar to (161)AT5G59970
16	GST29 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE)	26.9 misc.glutathione S transferases	(sgn-u574509): moderately similar to (254)AT1G10360
17	NF-YC13 (nuclear factor Y, subunit C13)	27.3.16 RNA.regulation of transcription.	(sgn-u586292): weakly similar to (144)AT5G43250
18	EFE (ETHYLENE FORMING ENZYME)	17.5.1 hormone metabolism.ethylene.synthesis-degradation	(sgn-u579250): weakly similar to (148)AT1G05010
19	ENODL17	26.19 misc.plastocyanin-like	(sgn-u586153): weakly similar to (171)AT5G15350
20	FAD8 (FATTY ACID DESATURASE 8)	11.2.3 lipid metabolism.FA desaturation.omega 3 desaturase	(sgn-u575510): highly similar to (675)AT5G05580
21	COX19-1 (cytochrome c oxidase 19-1)	35.1 not assigned.no ontology	MULTIPLE HITS: (sgn-u569391,sgn-u595251) sgn-u569391
22	MOD1 (MOSAIC DEATH 1)	11.1.6 lipid metabolism.	(sgn-u568214): highly similar to (519)AT2G05990
23	glycosyl transferase family 28 protein	26.2 misc.UDP glucosyl and glucuronyl transferases	MULTIPLE HITS: (sgn-u592483,sgn-u578191) sgn-u592483
24	UNKNOWN	35.1 not assigned.no ontology	(sgn-u572365): very weakly similar to (87.0)AT2G22795
25	proline oxidase	13.2.2.2 amino acid metabolism.degradation.glutamate family.proline	(sgn-u578070): moderately similar to (492)AT5G38710
26	GA3OX1 (gibberellin 3-beta-dioxygenase)	17.5.1 hormone metabolism.ethylene.synthesis-degradation	(sgn-u584326): moderately similar to (372)AT1G15550
27	BGAL1 (BETA GALACTOSIDASE 1)	26.3 misc.gluco-, galacto- and mannosidases	(sgn-u578846): nearly identical (1380)AT3G13750
28	protease inhibitor p322 precursor	35.2 not assigned.unknown	MULTIPLE HITS: (sgn-u591780,sgn-u581633,sgn-u592912)
29	UNKNOWN	35.2 not assigned.unknown	(sgn-u566236): moderately similar to (245)AT1G13380
30	ATG6 (autophagy protein 6)	29.5.2 protein.degradation.autophagy AND 31.1 cell.organisation	(sgn-u578842): highly similar to (672)AT3G61710
31	DTX35 (DETOXIFYING EFFLUX CARRIER 35)	34.99 transport.misc	(sgn-u567585): moderately similar to (489)AT4G25640
32	ATAUR1 (ATAURORA1)	29.4 protein.postranslational modification	(sgn-u579755): highly similar to (537)AT4G32830

33	TSO2	23.5 nucleotide metabolism.deoxynucleotide metabolism	(sgn-u586318): highly similar to (539)AT3G27060
34	SCAMP (secretory carrier membrane protein)	34.99 transport.misc	MULTIPLE HITS: (sgn-u574316,sgn-u595752) sgn-u574316
35	CHL (CHLOROPLASTIC LIPOCALIN)	35.1 not assigned.no ontology	MULTIPLE HITS: (sgn-u575164,sgn-u575165) sgn-u575164
36	HBP1 (HAEM-BINDING PROTEIN 1)	35.1 not assigned.no ontology	(sgn-u584870): moderately similar to (242)AT1G17100
37	OXIDOREDUCTASE (LIPID)	35.2 not assigned.unknown	(sgn-u572004): Tomato 200607#2 [2 ESTs aligned]
38	DNAJ (heat shock protein)	20.2.1 stress.abiotic.heat	(sgn-u573193): weakly similar to (159)AT5G03030
39	HPR (HYDROXYPYRUVATE REDUCTASE)	13.2.5.2 amino acid metabolism.	(sgn-u586528): highly similar to (675)AT1G68010
40	UNKNOWN	35.2 not assigned.unknown	(sgn-u578377): Tomato 200607#2 [60 ESTs aligned]
41	UNKNOWN	35.2 not assigned.unknown	(sgn-u568351): Tomato 200607#2 [7 ESTs aligned]
42	PGR5 (PROTON GRADIENT REGULATION 5)	1.1.40 PS.lightreaction.cyclic electron flow-chlororespiration	MULTIPLE HITS: (sgn-u596234,sgn-u565739) sgn-u596234
43	PRXR1 (peroxidase 42)	26.12 misc.peroxidases	(sgn-u577555): highly similar to (540)AT4G21960
44	CYP707A1 (cytochrome P450)	26.10 misc.cytochrome P450	(sgn-u583027): highly similar to (691)AT4G19230
45	RPT2 (ROOT PHOTOTROPISM 2)	30.11 signalling.light	MULTIPLE HITS: (sgn-u577658,sgn-u592187) sgn-u577658
46	LRR family protein	20.1.7 stress.biotic.	(sgn-u573229): moderately similar to (301)AT2G34930
47	SPL3	33.99 development.unspecified	(sgn-u576708): very weakly similar to (100)AT2G33810
48	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family	16.1.4 secondary metabolism.isoprenoids.carotenoids	(sgn-u585188): moderately similar to (488)AT1G57770
49	RBCL (large subunit of RUBISCO)	1.3.1 PS.calvin cyle.rubisco large subunit	(sgn-u565452): moderately similar to (342)ATCG00490
50	LRR1 (LEUCINE RICH REPEAT PROTEIN 1)	30.2.3 signalling.receptor kinases.leucine rich repeat III	(sgn-u584710): highly similar to (568)AT5G16590
51	SPS1 (SOLANESYL DIPHOSPHATE SYNTHASE)	16.1.1.10 secondary metabolism.isoprenoids.	MULTIPLE HITS: (sgn-u573421,sgn-u573420) sgn-u573421
52	CDC20.1 (CELL DIVISION CYCLE 20.1)	35.1 not assigned.no ontology	(sgn-u571433): highly similar to (613)AT4G33270
53	MEE66 (maternal effect embryo arrest 66)	31.1 cell.organisation	MULTIPLE HITS: (sgn-u578297,sgn-u580714) sgn-u578297
54	ACO1 (ACC OXIDASE 1)	17.5.1 hormone metabolism.ethylene.synthesis-degradation	(sgn-u565391): moderately similar to (422)AT2G19590
55	MBF1C (MULTIPROTEIN BRIDGING FACTOR 1C)	17.5.3 hormone metabolism.ethylene.induced-regulated-responsive-activated	(sgn-u566716): weakly similar to (169)AT3G24500
56	CYP98A3 (CYTOCHROME P450)	26.10 misc.cytochrome P450	(sgn-u576405): highly similar to (774)AT2G40890
57	ABA3 (ABA DEFICIENT 3)	18 Co-factor and vitamene metabolism	(sgn-u585257): highly similar to (995)AT1G16540
58	UNKNOWN	35.2 not assigned.unknown	(sgn-u585906): Tomato 200607#2 [2 ESTs aligned]
59	MFP1 (MAR BINDING FILAMENT-LIKE PROTEIN 1)	27.3.34 RNA.regulation of transcription.Orphan family	(sgn-u581652): moderately similar to (438)AT3G16000
60	OHP2 (ONE-HELIX PROTEIN 2)	1.1.2.1 PS.lightreaction.photosystem I.LHC-I	(sgn-u574528): weakly similar to (176)AT1G34000
61	NSHB1 (HEMOGLOBIN 1)	21.3 redox.heme	(sgn-u567304): moderately similar to (224)AT2G16060
62	ALPHA/BETA-HYDROLASE PROTEIN	35.1 not assigned.no ontology	(sgn-u574078): moderately similar to (371)AT1G52510
63	PAP27 (purple acid phosphatase 27)	26.13 misc.acid and other phosphatases	(sgn-u586187): highly similar to (924)AT5G50400
64	Metallo-hydrolase/oxidoreductase superfamily protein	35.2 not assigned.unknown	(sgn-u574999): moderately similar to (409)AT1G29700
65	DNAJ (heat shock PROTEIN)	20.2.1 stress.abiotic.heat	(sgn-u563212): weakly similar to (140)AT3G08970
66	SBPASE (SEDOHEPTULOSE-BISPHOSPHATASE)	1.3.9 PS.calvin cyle.seduheptulose bisphosphatase	(sgn-u574431): highly similar to (598)AT3G55800

67	GSTU7 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 25)	26.9 misc.glutathione S transferases	(sgn-u575771): moderately similar to (223)AT2G29420
68	NUDT2 (Nudix hydrolase homolog 2)	35.1 not assigned.no ontology	(sgn-u576541): moderately similar to (297)AT5G47650
69	UNKNOWN	35.2 not assigned.unknown	NO_MATCH
70	ERF1 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1)	17.5.2 hormone metabolism.ethylene.signal transduction	(sgn-u574873): weakly similar to (101)AT3G23240
71	copper ion binding	26.19 misc.plastocyanin-like	(sgn-u578433): weakly similar to (106)AT1G45063
72	GF14 (G-BOX FACTOR14)	30.7 signalling.14-3-3 proteins	(sgn-u579244): Tomato 200607#2 [14 ESTs aligned]
73	ASR1	20. stress.	(sgn-u578294, sgn-u590260, sgn-u356349)
74	NADP-dependent oxidoreductase	26.7 misc.oxidases - copper, flavone etc.	(sgn-u577633): moderately similar to (476)AT5G16990
75	UNKNOWN	35.2 not assigned.unknown	MULTIPLE HITS: (sgn-u594986,sgn-u582618) sgn-u594986
76	Cystathionine beta-synthase (CBS) protein	35.1 not assigned.no ontology	(sgn-u585007): moderately similar to (372)AT1G15330
77	histone H3	28.1.3 DNA.synthesis/chromatin structure.histone	(sgn-u581228): moderately similar to (228)AT5G65360
78	EF-1-alpha (elongation factor 1-alpha)	29.2.4 protein.synthesis.elongation	(sgn-u580191): highly similar to (859)AT5G60390
79	RING/U-box superfamily protein	29.5.11.4.2 protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	(sgn-u568194): moderately similar to (202)AT3G14250
80	OSM34 (OSMOTIN 34)	20.1 stress.biotic	MULTIPLE HITS: (sgn-u581103,sgn-u591769) sgn-u581103
81	LOX1 (Lipoxygenase 1)	17.7.1.2 hormone metabolism.	MULTIPLE HITS: (sgn-u577893,sgn-u590203) sgn-u577893
82	DUT1 (DUTP-PYROPHOSPHATASE-LIKE 1)	23.5 nucleotide metabolism.	(sgn-u577318): moderately similar to (258)AT3G46940
83	proton-dependent oligopeptide transport (POT)	34.13 transport.peptides and oligopeptides	(sgn-u570891): moderately similar to (479)AT1G52190
84	CYP73A5 (CINNAMATE 4-HYDROXYLASE)	26.1 misc.misc2	(sgn-u585432): weakly similar to (191)AT2G30490
85	histone H3	28.1.3 DNA.synthesis/chromatin structure.histone	(sgn-u581005): moderately similar to (210)AT5G65360
86	DAC (DEFECTIVE ACCUMULATION OF CYTOCHROME)	35.2 not assigned.unknown	MULTIPLE HITS: (sgn-u585476,sgn-u587799) sgn-u585476
87	HTA6 (histone H2A)	28.1.3 DNA.synthesis/chromatin structure.histone	(sgn-u581058): weakly similar to (154)AT5G59870
88	RCA (RUBISCO ACTIVASE)	1.3.13 PS.calvin cyle.rubisco interacting	(sgn-u577570): highly similar to (693)AT2G39730
89	FOP1 (FOLDED PETAL 1)	35.2 not assigned.unknown	(sgn-u570811): moderately similar to (224)AT5G53390
90	PCR2 (PLANT CADMIUM RESISTANCE 2)	35.1 not assigned.no ontology	(sgn-u567416): moderately similar to (215)AT1G14870
91	PRL (PROLIFERA)	28.1 DNA.synthesis/chromatin structure	(sgn-u573875): nearly identical (1179)AT4G02060
92	UNKNOWN	35.2 not assigned.unknown	(sgn-u565082): moderately similar to (329)AT3G49720
93	geranylgeranyl reductase	16.1.1 secondary metabolism.isoprenoids.non-mevalonate pathway	MULTIPLE HITS: (sgn-u564571,sgn-u587275,sgn-u564570)
94	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	26.28 misc.GDSL-motif lipase	MULTIPLE HITS: (sgn-u566006,sgn-u587865) sgn-u566006
95	FPS2 (FARNESYL DIPHOSPHATE SYNTHASE 2)	16.1.2 secondary metabolism.isoprenoids	(sgn-u580757): highly similar to (545)AT4G17190
96	trypsin and protease inhibitor family protein	35.2 not assigned.unknown	(sgn-u573941): Tomato 200607#2 [98 ESTs aligned]
97	UNKNOWN	35.2 not assigned.unknown	MULTIPLE HITS: (sgn-u563842,sgn-u563843) sgn-u563842: moderately similar to (249)AT1G45688
98	TET3 (TETRASPANIN3)	33.99 development.unspecified	(sgn-u568276): moderately similar to (402)AT3G45600
99	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	26.28 misc.GDSL-motif lipase	(sgn-u563797): moderately similar to (431)AT3G48460

Tabla 16. Identificación de las sondas cuyos niveles de expresión resultaron significativamente aumentados ($p < 0,05$) en comparación con las plantas controles en al menos una de las líneas silenciadas AS5 o AS17 para *Asr1* bajo el promotor 35S. Se muestra para cada sonda en cada línea los niveles de cambio de su ARNm y el p-valor junto al nombre del gen que representa la sonda (A). En la tabla siguiente (B) se muestra la clasificación Mapman y la homología de la sonda con genes de la base de datos *Sol Genomics Network* (genes de tomate) y/o de la base de datos TAIR (genes de arabidopsis). Los p-valores estadísticamente significativos se marcaron en negrita ($p < 0,05$). A cada sonda se le asignó un número de identificación, que se encuentra en el margen izquierdo de cada tabla.

A	Identificación de la sonda	AS5 Niveles de cambio	p-valor	AS17 niveles de cambio	p-valor	Nombre del gen
1	Les.1988.1.A1_at	1,04	0,0466	0,73	0,2107	UNKNOWN
2	Les.1287.1.A1_at	1,10	0,0429	0,34	0,6700	UNKNOWN
3	Les.4721.1.S1_at	1,14	0,0429	1,00	0,0798	GUS1 (GLUCURONIDASE 1)
4	Les.5934.1.S1_at	2,01	0,0429	1,55	0,0798	FAD2 (FATTY ACID DESATURASE 2)
5	LesAffx.23969.1.A1_at	1,06	0,0429	0,86	0,1558	BRH1 (BRASSINOSTEROID-RESPONSIVE RING-H2)
6	LesAffx.344.3.S1_at	1,34	0,0429	1,20	0,0672	PAR1 protein
7	LesAffx.45315.4.S1_at	1,37	0,0429	1,09	0,1753	NIA2 (NITRATE REDUCTASE 2)
8	LesAffx.60384.1.S1_at	1,05	0,0429	0,76	0,1680	saposin B domain-containing protein
9	Les.4880.1.S1_at	1,25	0,0429	0,90	0,1135	TT7 (TRANSPARENT TESTA 7)
10	Les.132.1.S1_at	1,10	0,0399	0,48	0,3885	EFE (ETHYLENE FORMING ENZYME)
11	Les.3662.1.S1_at	1,11	0,0393	1,09	0,0525	ACS2 (1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 2)
12	Les.452.1.S1_at	1,13	0,0388	0,42	0,6167	TAP2 (transporter associated with antigen processing protein 2)
13	Les.4819.1.S1_at	1,20	0,0361	0,39	0,7018	HSP70-1 (HEAT SHOCK PROTEIN)
14	Les.4670.1.S1_at	1,09	0,0355	0,85	0,1372	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein
15	Les.3741.1.S1_at	1,10	0,0339	0,46	0,4852	ELI3-1 (ELICITOR-ACTIVATED GENE 3)
16	Les.323.1.S1_at	1,16	0,0326	0,53	0,5772	NAC083 (NAC domain containing protein 83)
17	Les.3730.1.S1_at	1,21	0,0325	1,03	0,0757	EXPA15 (EXPANSIN A15)
18	Les.5208.1.S1_at	1,60	0,0256	0,68	0,4181	EDS1 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1)
19	LesAffx.38740.1.S1_at	1,27	0,0243	0,88	0,1425	UGE5 (UDP-D-GLUCOSE/UDP-D-GALACTOSE 4-EPIMERASE)
20	Les.4589.1.S1_at	1,68	0,0230	0,99	0,1407	2S albumin superfamily protein
21	Les.123.1.S1_at	1,47	0,0205	0,79	0,4690	GSTU8 (Glutathione S-transferase (class tau) 8)
22	Les.2660.1.S1_at	1,44	0,0182	1,28	0,0507	TPR4/WSP2 (TOPLESS-RELATED 4)
23	Les.131.1.S1_at	1,44	0,0175	0,79	0,3885	GSTU8 (Glutathione S-transferase (class tau) 8)
24	Les.1724.3.A1_at	1,35	0,0172	0,94	0,0779	GSTL3 (Glutathione transferase L3)
25	Les.3777.1.S1_at	1,47	0,0143	0,97	0,1114	UDP-glycosyltransferase
26	LesAffx.64980.1.S1_at	1,39	0,0135	1,14	0,1123	SAUR-like auxin-responsive protein family
27	Les.4501.1.S1_at	2,14	0,0129	1,53	0,0685	GSTU8 (Glutathione S-transferase (class tau) 8)
28	Les.3792.1.S1_s_at	1,51	0,0120	1,15	0,1020	CYP72A15 (cytochrome P450)
29	Les.672.1.S1_at	1,65	0,0095	0,83	0,1552	CYP96A1 (cytochrome P450)
30	Les.3157.1.S1_at	1,67	0,0083	0,80	0,2441	SWEET11
31	Les.5139.1.S1_at	2,31	0,0059	2,68	0,0716	curculin-like (mannose-binding) lectin family protein
32	Les.5759.1.S1_at	2,07	0,0058	1,46	0,0525	UNKNOWN
33	LesAffx.4779.1.S1_at	2,52	0,0058	1,59	0,1072	PER12 (peroxidase 12)
34	Les.4496.1.S1_at	2,69	0,0044	1,36	0,1277	PR10 (pathogenesis-related protein 10)
35	Les.2474.2.A1_at	1,79	0,0036	1,04	0,1123	DWF1 (DIMINUTO 1)

36	Les.3779.1.S1_at	2,07	0,0028	1,01	0,1461	PR3/CHI-B (BASIC CHITINASE)
37	Les.2944.1.A1_at	0,66	0,5731	1,39	0,0357	TUB8 (tubulin beta-8)
38	Les.3762.1.S1_at	0,92	0,2057	1,44	0,0357	OPR3 (OPDA-REDUCTASE 3)
39	Les.1310.1.S1_at	1,01	0,1351	1,51	0,0354	starch synthase
40	Les.4808.1.S1_at	0,98	0,1566	1,50	0,0346	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
41	LesAffx.29797.1.S1_at	0,70	0,1362	1,54	0,0340	ST (steroid sulfotransferase)
42	LesAffx.69528.1.S1_at	0,90	0,2215	1,34	0,0340	RABA1f (Rab GTPase homolog A1f)
43	Les.3702.1.A1_at	0,84	0,2174	1,45	0,0316	IAA16 (indoleacetic acid-induced protein 16)
44	Les.1331.1.A1_at	0,87	0,2883	1,57	0,0308	NCRK (protein kinase family protein)
45	Les.3461.1.S1_at	0,20	0,9785	1,35	0,0308	CWINV4 (CELL WALL INVERTASE 4)
46	Les.4492.3.S1_at	1,21	0,0652	1,51	0,0308	LHCB6 (LIGHT HARVESTING COMPLEX PSII)
47	LesAffx.18932.1.S1_at	0,82	0,1285	1,26	0,0308	YAB5
48	LesAffx.4116.1.S1_at	0,95	0,0735	1,31	0,0308	NODULIN
49	LesAffx.42697.1.S1_at	0,88	0,2443	1,43	0,0308	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
50	LesAffx.51346.1.S1_at	1,02	0,1821	1,50	0,0294	UNKNOWN
51	Les.3242.1.A1_at	0,67	0,2403	1,34	0,0294	GAPB (GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE B SUBUNIT)
52	Les.4997.1.S1_at	1,27	0,0598	1,65	0,0294	disease resistance-responsive protein-related
53	Les.5112.1.S1_at	0,95	0,2037	1,66	0,0294	NIP4;2/NLM5 (NOD26-LIKE INTRINSIC PROTEIN 4;2)
54	Les.5682.1.S1_at	0,96	0,1085	1,40	0,0294	epoxide hydrolase
55	Les.3775.1.S1_at	0,85	0,3240	1,60	0,0280	LHCI type I/CAB (chlorophyll A-B binding protein)
56	Les.4275.1.S1_at	0,95	0,1717	1,53	0,0280	fructose-bisphosphate aldolase
57	LesAffx.31904.2.S1_at	1,00	0,1324	1,49	0,0280	NRS/ER (NUCLEOTIDE-RHAMNOSE SYNTHASE/EPIMERASE-REDUCTASE)
58	LesAffx.49534.1.S1_at	1,06	0,1010	1,44	0,0280	NDH-O (NAD(P)H:PLASTOQUINONE DEHYDROGENASE COMPLEX SUBUNIT)
59	Les.4300.1.A1_at	1,29	0,0663	1,58	0,0229	UNKNOWN
60	Les.5890.1.S1_at	0,90	0,1275	1,58	0,0221	NTT1 (ATP:ADP antiporter)
61	Les.4449.1.S1_s_at	1,16	0,0652	1,67	0,0219	(1-4)-beta-mannan endohydrolase
62	Les.5812.1.S1_at	0,98	0,1380	1,70	0,0184	PHOTOSYSTEM II SUBUNIT X, PSBX
63	Les.192.1.A1_at	0,69	0,2365	1,60	0,0159	dormancy/auxin associated family protein
64	Les.1248.2.S1_a_at	0,85	0,2264	1,61	0,0155	CYT1 (CYTOKINESIS DEFECTIVE 1)
65	LesAffx.11542.1.S1_at	0,67	0,3332	1,64	0,0155	(CML38) CALMODULIN-LIKE 38
66	Les.1701.1.S1_at	1,06	0,1234	1,60	0,0147	ATTK1A (THYMIDINE KINASE 1A)
67	Les.3297.1.S1_at	0,91	0,1561	1,69	0,0147	LHCA4 (Photosystem I light harvesting complex gene 4)
68	Les.376.1.S1_at	1,11	0,0740	1,73	0,0147	RuBisCO small subunit 2B (RBCS-2B)
69	Les.4798.1.S1_at	1,15	0,0640	1,65	0,0147	CAD (cinnamyl-alcohol dehydrogenase, putative)
70	Les.1472.1.S1_at	1,03	0,1331	1,88	0,0117	PSII-Q (PHOTOSYSTEM II SUBUNIT Q-2)
71	Les.5664.1.S1_at	0,75	0,4223	1,72	0,0117	EXL3 (EXORDIUM LIKE 3)
72	LesAffx.1276.2.S1_at	0,95	0,2450	1,80	0,0117	Pectin lyase-like superfamily protein
73	LesAffx.30198.1.S1_at	1,02	0,1085	1,72	0,0117	UNKNOWN
74	Les.4345.3.S1_x_at	0,88	0,1234	1,84	0,0113	LHCB1.3/CAB1 (CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 1)
75	Les.2377.1.S1_at	1,14	0,1107	2,02	0,0048	PSBX (PHOTOSYSTEM II SUBUNIT X)
76	Les.4345.2.A1_a_at	0,94	0,0948	1,98	0,0046	LHCB1.3/CAB1 (CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 1)
77	Les.3666.1.S1_at	0,08	0,9797	1,85	0,0044	GH9B1 (GLYCOSYL HYDROLASE 9B1)
78	Les.4345.1.S1_at	0,96	0,0796	2,06	0,0044	LHCB1.3/CAB1 (CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 1)
79	LesAffx.39098.1.S1_at	0,65	0,2443	1,13	0,0494	Transmembrane amino acid transporter family protein

80	Les.3297.2.S1_at	0,65	0,4721	1,23	0,0468	CAB4/LHCA4 (Photosystem I light harvesting complex gene 4);
81	Les.5738.1.S1_at	0,61	0,5611	1,34	0,0464	PPL1 (PSBP-LIKE PROTEIN 1)
82	Les.181.1.A1_at	1,16	0,0539	1,36	0,0457	BGAL8 (BETA-GALACTOSIDASE 8)
83	Les.2012.1.S1_at	1,07	0,0560	1,37	0,0436	inositol-3-phosphate synthase
84	LesAffx.25133.1.S1_at	0,71	0,3009	1,24	0,0430	NC domain-containing protein-related
85	LesAffx.25786.1.S1_at	0,94	0,2174	1,38	0,0430	UNKNOWN
86	LesAffx.67643.1.S1_at	0,63	0,2237	1,16	0,0430	L-asparaginase
87	Les.3308.3.S1_at	1,07	0,1064	1,26	0,0416	UBQ10 (POLYUBIQUITIN 10)
88	Les.4857.2.S1_at	1,03	0,1424	1,47	0,0384	RHA1 (Ras-related protein)
89	Les.4345.4.A1_at	0,39	0,7956	1,38	0,0384	LHCB1.3/CAB1 (CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 1)
90	Les.3225.3.S1_at	1,03	0,1676	1,39	0,0382	EFE (ETHYLENE FORMING ENZYME)
91	Les.3750.1.S1_at	1,00	0,0887	1,28	0,0382	CDKA;1 (CELL DIVISION CONTROL 2)
92	Les.124.1.S1_at	-0,09	1,0000	1,29	0,0357	DREB1A (DEHYDRATION RESPONSE ELEMENT B1A)
93	LesAffx.63775.1.S1_at	1,41	0,0162	1,32	0,0346	VAMP7C (VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN 7C)
94	Les.3087.2.S1_at	1,22	0,0354	1,63	0,0340	petM (cytochrome b6f complex subunit)
95	Les.778.1.A1_at	1,37	0,0230	1,31	0,0340	F-box family protein
96	Les.122.1.S1_at	2,73	0,0008	1,56	0,0308	CHIB (BASIC CHITINASE)
97	Les.2409.1.S1_at	1,64	0,0058	1,47	0,0308	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
98	Les.726.1.S1_at	2,02	0,0008	1,36	0,0308	RIP5 (ROP INTERACTIVE PARTNER 5)
99	LesAffx.54355.2.S1_at	1,10	0,0471	1,36	0,0308	UNKNOWN
100	LesAffx.58019.1.S1_at	1,29	0,0327	1,52	0,0308	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein
101	Les.67.1.S1_at	1,67	0,0086	1,68	0,0290	PME3 (pectin methylesterase 3)
102	Les.5864.1.S1_at	2,01	0,0014	1,60	0,0283	PLAT1 (PLAT DOMAIN PROTEIN 1)
103	Les.1258.1.S1_at	1,58	0,0087	1,59	0,0280	POP2 (POLLEN-PISTIL INCOMPATIBILITY 2)
104	Les.3974.1.A1_at	1,09	0,0429	1,51	0,0280	UNKNOWN
105	LesAffx.47717.1.S1_at	1,39	0,0166	1,49	0,0228	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
106	Les.3063.1.S1_at	1,32	0,0393	1,65	0,0219	photosystem II 5 kD protein
107	Les.4495.1.S1_at	1,86	0,0028	1,42	0,0219	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
108	Les.581.1.A1_at	1,26	0,0107	1,29	0,0217	nucleolar essential protein-related
109	Les.4460.1.S1_at	2,79	0,0008	1,88	0,0191	PR4 (PATHOGENESIS-RELATED 4)
110	Les.1645.1.A1_at	1,24	0,0230	1,40	0,0186	GSTU25 (Glutathione S-transferase 25)
111	Les.5293.1.S1_at	1,70	0,0050	1,71	0,0147	KCS11 (3-KETOACYL-COA SYNTHASE 11)
112	Les.24.1.S1_at	1,93	0,0033	1,72	0,0140	ATAGAL2 (ARABIDOPSIS THALIANA ALPHA-GALACTOSIDASE 2)
113	LesAffx.8850.1.S1_at	2,69	0,0058	2,04	0,0134	CXE20 (CARBOXYESTERASE 20)
114	LesAffx.46815.2.S1_at	1,38	0,0429	1,92	0,0130	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
115	Les.2316.2.A1_at	2,06	0,0000	1,58	0,0117	CSLG1 (Cellulose synthase-like G1)
116	Les.3187.1.S1_at	2,01	0,0042	1,83	0,0117	GOX1 (GLYCOLATE OXIDASE 1)
117	Les.3273.1.S1_at	1,75	0,0044	1,87	0,0117	CWLP (CELL WALL-PLASMA MEMBRANE LINKER PROTEIN)
118	Les.3519.1.S1_at	1,68	0,0071	1,86	0,0117	CYCD3;2 (cyclin-dependent protein kinase)
119	Les.4397.1.S1_at	1,15	0,0399	1,78	0,0117	RPL19B (60S ribosomal protein L19)
120	Les.744.1.S1_at	1,30	0,0428	1,77	0,0117	Lung seven transmembrane receptor family protein
121	Les.1397.1.A1_at	1,23	0,0396	1,89	0,0044	UNKNOWN
122	Les.2325.1.S1_at	1,96	0,0028	2,00	0,0044	SDR5 (SHORT-CHAIN DEHYDROGENASE REDUCTASE 5)
123	Les.2933.1.S1_at	1,25	0,0491	2,09	0,0044	GAPB

124	Les.397.1.S1_at	1,36	0,0120	1,81	0,0044	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
125	Les.4345.2.A1_x_at	1,21	0,0399	2,17	0,0044	LHCB1.3/CAB1 (CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 1)
126	Les.4885.1.S1_at	1,43	0,0129	1,94	0,0044	HXXXD-type acyl-transferase family protein
127	Les.5229.1.S1_at	2,87	0,0000	2,20	0,0044	tolB protein-related
128	Les.5494.1.S1_at	1,78	0,0044	2,05	0,0044	DCD (Development and Cell Death) domain protein
129	Les.84.1.S1_at	1,45	0,0107	2,23	0,0044	LAP2 (LEUCYL AMINOPEPTIDASE 2)
130	LesAffx.53035.1.S1_at	2,02	0,0008	1,93	0,0044	Alba DNA/RNA-binding protein
131	LesAffx.67017.1.S1_at	1,70	0,0033	1,99	0,0044	KNAT3 (KNOTTED1-LIKE HOMEBOX GENE 3)
132	Les.1013.1.A1_at	1,90	0,0039	2,25	0,0033	UNKNOWN
133	Les.1603.1.A1_at	1,56	0,0107	2,18	0,0033	LHCA3 (Photosystem I light harvesting complex)
134	Les.113.1.S1_at	2,08	0,0008	2,41	0,0010	UNKNOWN
135	Les.141.1.S1_at	1,50	0,0124	2,36	0,0010	EXPA3 (EXPANSIN A3)
136	Les.1850.1.A1_at	1,93	0,0020	2,37	0,0010	FAD5 (FATTY ACID DESATURASE 5)
137	Les.2696.1.S1_at	2,54	0,0000	2,83	0,0010	2S albumin superfamily protein
138	LesAffx.50432.1.S1_at	1,36	0,0428	2,35	0,0010	heat shock protein
139	LesAffx.63231.1.S1_at	2,07	0,0008	2,59	0,0010	Eukaryotic aspartyl protease family protein
140	Les.2946.2.S1_at	4,09	0,0000	3,56	0,0000	extensin-like protein
141	Les.4335.1.S1_at	3,00	0,0000	3,45	0,0000	UNKNOWN
142	Les.44.1.S1_at	3,68	0,0000	3,52	0,0000	phytoene synthase
143	Les.4701.1.S1_at	3,71	0,0000	3,97	0,0000	ATB2
144	LesAffx.51348.1.S1_at	1,53	0,0114	1,14	0,0494	Eukaryotic aspartyl protease family protein
145	LesAffx.43341.1.S1_at	1,10	0,0429	1,17	0,0384	WRKY70 (WRKY DNA-binding protein 70)

B	Nombre del gen	Clasificación por categorías Mapman	Secuencias ortólogas
1	UNKNOWN	35.2 not assigned.	(sgn-u563571): Tomato 200607#2 [3 ESTs aligned]
2	UNKNOWN	35.2 not assigned.	MULTIPLE HITS: (sgn-u592765,sgn-u579308) sgn-u592765
3	GUS1 (GLUCURONIDASE 1)	35.1 not assigned.	(sgn-u574619): highly similar to (652)AT5G61250
4	FAD2 (FATTY ACID DESATURASE 2)	11.2.4 lipid metabolism.	(sgn-u574777): highly similar to (582)AT3G12120
5	BRH1	29.5.11.4.2 protein.degradation.	(sgn-u581178): moderately similar to (201)AT3G61460
6	PAR1 protein	30.1 signalling.in sugar and nutrient physiology	MULTIPLE HITS: (sgn-u577576,sgn-u579798) sgn-u577576
7	NIA2 (NITRATE REDUCTASE 2)	12.1.1 N-metabolism.	(sgn-u579543): nearly identical (1406)AT1G37130
8	sapoin B domain-containing protein	35.1 not assigned.	(sgn-u576084): weakly similar to (197)AT3G51730
9	TT7 (TRANSPARENT TESTA 7)	26.10 misc.cytochrome P450	(sgn-u573255): moderately similar to (398)AT5G07990
10	EFE (ETHYLENE FORMING ENZYME)	17.5.1 hormone metabolism.ethylene.	MULTIPLE HITS: (sgn-u592438,sgn-u578701) sgn-u592438
11	ACS2 (1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 2)	17.5.1 hormone metabolism.ethylene.	(sgn-u567978): highly similar to (647)AT1G01480
12	TAP2	34.16 transport.ABC transporters.	(sgn-u571503): highly similar to (855)AT5G39040
13	HSP70-1 (HEAT SHOCK PROTEIN)	20.2.1 stress.abiotic.	(sgn-u578504): nearly identical (1141)AT5G02500
14	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	29.6 protein.folding	(sgn-u571803): highly similar to (912)AT5G20890
15	ELI3-1 (ELICITOR-ACTIVATED GENE 3)	16.2.1.10 secondary	(sgn-u572059): moderately similar to

16	NAC083 (NAC domain containing protein 83)	metabolism.phenylpropanoids. 33.99 development.	(350)AT4G37980 (sgn-u563196): moderately similar to (238)AT5G13180
17	EXPA15 (EXPANSIN A15)	10.7 cell wall.	(sgn-u584567): moderately similar to (389)AT2G03090
18	EDS1 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1)	20.1 stress.biotic	(sgn-u564893): moderately similar to (420)AT3G48090
19	UGE5	10.1.2 cell wall.precursor synthesis.	(sgn-u583215): highly similar to (557)AT4G10960
20	2S albumin superfamily protein	26.21 misc.lipid transfer protein (LTP) family protein	MULTIPLE HITS: (sgn-u593188,sgn- u577200) sgn-u593188
21	GSTU8 (Glutathione S-transferase (class tau) 8)	26.9 misc.glutathione S transferases	(sgn-u580000): moderately similar to (218)AT3G09270
22	TPR4/WSIP2 (TOPLESS-RELATED 4)	35.1 not assigned.	(sgn-u580205): highly similar to (651)AT3G15880
23	GSTU8 (Glutathione S-transferase (class tau) 8)	26.9 misc.glutathione S transferases	(sgn-u587908): moderately similar to (237)AT3G09270
24	GSTL3 (Glutathione transferase L3)	35.1 not assigned.	(sgn-u586347): moderately similar to (326)AT5G02790
25	UDP-glycosyltransferase	26.2 misc.UDP glucosyl and glucoronyl transferases	(sgn-u567691): highly similar to (516)AT4G34135
26	SAUR-like auxin-responsive protein family	17.2.3 hormone metabolism.auxin.	(sgn-u575063): weakly similar to (102)AT5G50760
27	GSTU8 (Glutathione S-transferase (class tau) 8)	26.9 misc.glutathione S transferases	(sgn-u579357): weakly similar to (182)AT3G09270
28	CYP72A15 (cytochrome P450)	26.10 misc.cytochrome P450	MULTIPLE HITS: (sgn-u578058,sgn- u593483) sgn-u578058
29	CYP96A1 (cytochrome P450)	26.10 misc.cytochrome P450	(sgn-u565581): moderately similar to AT2G23180
30	SWEET11	33.99 development.	(sgn-u581461): moderately similar to AT3G48740
31	curculin-like (mannose-binding) lectin family protein	26.16 misc.myrosinases	(sgn-u569601): moderately similar to AT1G78860
32	UNKNOWN	35.2 not assigned.	NO_MATCH
33	PER12 (peroxidase 12)	26.12 misc.peroxidases	MULTIPLE HITS: (sgn-u583085,sgn- u588273)
34	PR10 (pathogenesis-related protein 10)	20.1 stress.biotic AND 20.2.99 stress.abiotic.	(sgn-u578441): similar to AT1G02205.2
35	DWF1 (DIMINUTO 1)	17.3.1.2.8 hormone metabolism.	(sgn-u578468): highly similar to (882)AT3G19820
36	PR3/CHI-B (BASIC CHITINASE)	20.1 stress.biotic	MULTIPLE HITS: (sgn-u577231,sgn- u577871) s
37	TUB8 (tubulin beta-8)	31.1 cell.organisation	(sgn-u564009): highly similar to (836)AT5G23860
38	OPR3 (OPDA-REDUCTASE 3)	17.7.1.5 hormone metabolism.jasmonate.	(sgn-u576938): highly similar to (602)AT2G06050
39	starch synthase	2.1.2.2 major CHO metabolism.	MULTIPLE HITS: (sgn-u587821,sgn- u567281)
40	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	10.5.3 cell wall.cell wall proteins.	(sgn-u572169): moderately similar to AT2G19780
41	ST (steroid sulfotransferase)	11.8 lipid metabolism.'exotics'	(sgn-u567881): moderately similar to AT2G03760
42	RABA1f (Rab GTPase homolog A1f)	30.5 signalling.G-proteins	(sgn-u577848): moderately similar to AT5G60860
43	IAA16 (indoleacetic acid-induced protein 16)	27.3.40 RNA.regulation of transcription.	MULTIPLE HITS: (sgn-u593495,sgn- u581524)
44	NCRK (protein kinase family protein)	29.4.1.57 protein.	(sgn-u565135): highly similar to (562)AT2G28250
45	CWINV4 (CELL WALL INVERTASE 4)	2.2.1.3.2 major CHO metabolism.	(sgn-u584135): highly similar to 724)AT2G36190
46	LHCB6 (LIGHT HARVESTING COMPLEX PSII)	1.1.1.1 PS.lightreaction.photosystem II.	MULTIPLE HITS: (sgn-u579493,sgn- u577555)
47	YAB5	27.3.10 RNA.regulation of transcription.	MULTIPLE HITS: (sgn-u591723,sgn- u577176)
48	NODULIN	33.99 development.	(sgn-u571750): moderately similar to

49	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	26.1 misc.misc2	AT1G21140 MULTIPLE HITS: (sgn-u582248,sgn-u582249)
50	UNKNOWN	35.2 not assigned.	(sgn-u578500): weakly similar to (187)AT1G54520
51	GAPB	4.9 glycolysis.	(sgn-u577669): highly similar to (735)AT1G42970
52	disease resistance-responsive protein-related	20.1.7 stress.biotic.PR-proteins	(sgn-u584206): weakly similar to (194)AT2G21100
53	NIP4;2/NLM5 (NOD26-LIKE INTRINSIC PROTEIN 4;2)	34.19.1 transport.Major Intrinsic Proteins.	(sgn-u569106): moderately similar to AT5G37820
54	epoxide hydrolase	26.1 misc.misc2	MULTIPLE HITS: (sgn-u596613,sgn-u586023)
55	LHCI type I/CAB (chlorophyll A-B binding protein)	1.1.2.1 PS.lightreaction.photosystem I.LHC-I	MULTIPLE HITS: (sgn-u579166,sgn-u580126)
56	fructose-bisphosphate aldolase	1.3.6 PS.calvin cyle.aldolase	MULTIPLE HITS: (sgn-u578807,sgn-u581053)
57	NRS/ER (NUCLEOTIDE-RHAMNOSE SYNTHASE/EPIMERASE-REDUCTASE)	10.1.10 cell wall.precursor synthesis.RHM	(sgn-u574142): highly similar to (513)AT1G63000
58	NDH-O (NAD(P)H:PLASTOQUINONE DEHYDROGENASE COMPLEX)	1.1.6 PS.lightreaction.NADH DH	MULTIPLE HITS: (sgn-u565570,sgn-u589086)
59	UNKNOWN	35.2 not assigned.	(sgn-u577602): highly similar to (539)AT5G11420
60	NTT1 (ATP:ADP antiporter)	34.8 transport.metabolite transporters.	(sgn-u580138): highly similar to (882)AT1G80300
61	(1-4)-beta-mannan endohydrolase	10.6.2 cell wall.degradation.	(sgn-u579631): moderately similar to AT5G66460
62	PHOTOSYSTEM II SUBUNIT X, PSBX	35.2 not assigned.	MULTIPLE HITS: (sgn-u577448,sgn-u579443)
63	dormancy/auxin associated family protein	33.99 development.	(sgn-u582094): weakly similar to (112)AT1G56220
64	CYT1 (CYTOKINESIS DEFECTIVE 1)	2.1.2.1 major CHO metabolism.synthesis.starch.	(sgn-u568547): highly similar to (654)AT2G39770
65	(CML38) CALMODULIN-LIKE 38	30.3 signalling.calcium	(sgn-u566130): weakly similar to (142)AT1G76650
66	ATTK1A (THYMIDINE KINASE 1A)	23.3.2.3 nucleotide metabolism.salvage.	(sgn-u577123): moderately similar to (296)AT3G07800
67	LHCA4 (Photosystem I light harvesting complex gene 4)	1.1.1.1 PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	(sgn-u579906): moderately similar to (451)AT3G47470
68	RuBisCO small subunit 2B (RBCS-2B)	1.3.2 PS.calvin cyle.rubisco small subunit	MULTIPLE HITS: (sgn-u578246,sgn-u577820,sgn-u579604)
69	CAD (cinnamyl-alcohol dehydrogenase, putative)	16.8.3 secondary metabolism.flavonoids.	(sgn-u580430): moderately similar to (480)AT5G19440
70	PSII-Q (PHOTOSYSTEM II SUBUNIT Q-2)	1.1.1.2 PS.lightreaction.photosystem II.	(sgn-u579745): moderately similar to (226)AT4G05180
71	EXL3 (EXORDIUM LIKE 3)	35.1 not assigned.	(sgn-u572735): highly similar to (505)AT5G51550
72	Pectin lyase-like superfamily protein	10.6.3 cell wall.degradation.	(sgn-u585243): highly similar to (630)AT3G07010
73	UNKNOWN	35.2 not assigned.unknown	(sgn-u575124): moderately similar to (266)AT3G23760
74	LHCB1.3/CAB1 (CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 1)	1.1.1.1 PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	MULTIPLE HITS: (sgn-u580356,sgn-u577305,sgn-u578708)
75	PSBX (PHOTOSYSTEM II SUBUNIT X)	35.2 not assigned.unknown	MULTIPLE HITS: (sgn-u579499,sgn-u579131) sgn-u579499
76	LHCB1.3/CAB1 (CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 1)	1.1.1.1 PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	MULTIPLE HITS: (sgn-u579099,sgn-u580431,sgn-u591584)
77	GH9B1 (GLYCOSYL HYDROLASE 9B1)	26.3 misc.gluco-, galacto- and mannosidases	(sgn-u585850): highly similar to (763)AT1G70710
78	LHCB1.3/CAB1 (CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 1)	1.1.1.1 PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	(sgn-u579099): moderately similar to (471)AT1G29930
79	Transmembrane amino acid transporter family protein	34.3 transport.amino acids	(sgn-u574120): weakly similar to (140)AT1G47670
80	CAB4/LHCA4 (Photosystem I light harvesting complex gene 4);	1.1.1.1 PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	(sgn-u579906): moderately similar to (451)AT3G47470

81	PPL1 (PSBP-LIKE PROTEIN 1)	1.1.1.2 PS.lightreaction.photosystem II.	(sgn-u568092): moderately similar to (261)AT3G55330
82	BGAL8 (BETA-GALACTOSIDASE 8)	26.3 misc.gluco-, galacto- and mannosidases	(sgn-u576288): highly similar to (622)AT2G28470
83	inositol-3-phosphate synthase	3.4.3 minor CHO metabolism.	(sgn-u577578): highly similar to (917)AT5G10170
84	NC domain-containing protein-related	35.1 not assigned.no ontology	(sgn-u569968): moderately similar to (351)AT1G01225
85	UNKNOWN	35.2 not assigned.unknown	MULTIPLE HITS: (sgn-u591452,sgn-u578608): AT1G54520
86	L-asparaginase	13.2.3.1 amino acid metabolism.degradation.	(sgn-u583152): highly similar to (532)AT3G16150
87	UBQ10 (POLYUBIQUITIN 10)	29.5.11.1 protein.degradation.ubiquitin.	MULTIPLE HITS: (sgn-u578847,sgn-u590069,sgn-u592201)
88	RHA1 (Ras-related protein)	30.5 signalling.G-proteins	(sgn-u580477): moderately similar to (283)AT5G45130
89	LHCB1.3/CAB1 (CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 1)	1.1.1.1 PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	(sgn-u578505): moderately similar to (471)AT1G29930
90	EFE (ETHYLENE FORMING ENZYME)	17.5.1 hormone metabolism.ethylene.	(sgn-u577773): moderately similar to (468)AT1G05010
91	CDKA;1 (CELL DIVISION CONTROL 2)	29.4 protein.	(sgn-u572518): highly similar to (529)AT3G48750
92	DREB1A (DEHYDRATION RESPONSE ELEMENT B1A)	27.3.3 RNA.regulation of transcription.	(sgn-u570402): weakly similar to (200)AT4G25480
93	VAMP7C (VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN 7C)	31.4 cell.vesicle transport	(sgn-u581733): moderately similar to (335)AT4G32150
94	petM (cytochrome b6f complex subunit)	1.1.3 PS.lightreaction.cytochrome b6/f	(sgn-u572809): very weakly similar to (86.3)AT2G26500
95	F-box family protein	35.2 not assigned.unknown	(sgn-u571139): At5g67250
96	CHIB (BASIC CHITINASE)	20.1 stress.biotic	(sgn-u581507): moderately similar to (276)AT3G12500
97	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily	20.2.3 stress.abiotic.drought/salt	MULTIPLE HITS: (sgn-u585211,sgn-u585214)
98	RIP5 (ROP INTERACTIVE PARTNER 5)	31.1 cell.organisation	(sgn-u570838): moderately similar to (316)AT5G60210
99	UNKNOWN	35.2 not assigned.unknown	NO_MATCH
100	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily	26.18 misc.invertase/pectin methylesterase.	MULTIPLE HITS: (sgn-u591810,sgn-u579172)
101	PME3 (pectin methylesterase 3)	10.8.1 cell wall.pectin*esterases.PME	MULTIPLE HITS: (sgn-u589799,sgn-u575256)
102	PLAT1 (PLAT DOMAIN PROTEIN 1)	16.8.4 secondary metabolism.flavonoids.	MULTIPLE HITS: (sgn-u581131,sgn-u592241)
103	POP2 (POLLEN-PISTIL INCOMPATIBILITY 2)	13.1.1.3 amino acid metabolism.synthesis.	(sgn-u570903): highly similar to (714)AT3G22200
104	UNKNOWN	35.2 not assigned.unknown	NO_MATCH
105	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	35.2 not assigned.unknown	(sgn-u568319): moderately similar to (364)AT5G17670
106	photosystem II 5 kD protein	34.19.1 transport.	MULTIPLE HITS: (sgn-u592277,sgn-u577606)
107	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	26.1 misc.misc2	(sgn-u564411): weakly similar to (117)AT3G23600
108	nucleolar essential protein-related	35.1 not assigned.no ontology	(sgn-u583406): moderately similar to (320)AT3G57000
109	PR4 (PATHOGENESIS-RELATED 4)	20.1 stress.biotic	(sgn-u579235): weakly similar to (196)AT3G04720
110	GSTU25 (Glutathione S-transferase (class tau) 25)	26.9 misc.glutathione S transferases	(sgn-u580145): weakly similar to (157)AT1G17180
111	KCS11 (3-KETOACYL-COA SYNTHASE 11)	1.1.3 PS.lightreaction.cytochrome b6/f	(sgn-u572809): very weakly similar to (86.3)AT2G26500
112	ATAGAL2 (ARABIDOPSIS THALIANA ALPHA-GALACTOSIDASE 2)	3.8.2 minor CHO metabolism.	(sgn-u571081): highly similar to (583)AT5G08370
113	CXE20 (CARBOXYESTERASE 20)	35.1 not assigned.no ontology	(sgn-u578033): moderately similar to (239)AT5G62180
114	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	30.2.11 signalling.receptor kinases.	(sgn-u577694): moderately similar to (431)AT3G20820

115	CSLG1 (Cellulose synthase-like G1)	10.2.1 cell wall.cellulose synthesis.	(sgn-u569071): moderately similar to (266)AT4G24010
116	GOX1 (GLYCOLATE OXIDASE 1)	1.2.2 PS.photorespiration.	(sgn-u579320): highly similar to (614)AT3G14420
117	CWLP (CELL WALL-PLASMA MEMBRANE LINKER PROTEIN)	26.21 misc.protease inhibitor.	MULTIPLE HITS: (sgn-u580381,sgn-u579408)
118	CYCD3;2 (cyclin-dependent protein kinase)	31.3 cell.cycle	(sgn-u581093): moderately similar to (304)AT5G67260
119	RPL19B (60S ribosomal protein L19)	29.2.2 protein.synthesis.	(sgn-u578709): moderately similar to (325)AT3G16780
120	Lung seven transmembrane receptor family protein	35.1 not assigned.no ontology	MULTIPLE HITS: (sgn-u594315,sgn-u573831)
121	UNKNOWN	35.2 not assigned.unknown	MULTIPLE HITS: (sgn-u576371,sgn-u587265)
122	SDR5 (SHORT-CHAIN DEHYDROGENASE REDUCTASE 5)	26.22 misc. dehydrogenase/reductase	(sgn-u571543): moderately similar to (292)AT2G47140
123	GAPB	4.9 glycolysis.	(sgn-u578628): highly similar to (690)AT1G42970
124	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	35.1 not assigned.no ontology	(sgn-u574078): moderately similar to AT1G52510
125	LHCB1.3/CAB1 (CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 1)	1.1.1.1 PS.lightreaction.photosystem II.	MULTIPLE HITS: (sgn-u578708,sgn-u580431)
126	HXXXD-type acyl-transferase family protein	16.2 secondary metabolism.	(sgn-u565216): highly similar to (616)AT2G39980
127	tolB protein-related	35.1 not assigned.no ontology	(sgn-u584580): highly similar to (785)AT4G01870
128	DCD (Development and Cell Death) domain protein	4.13 glycolysis.PK	(sgn-u577215): moderately similar to (391)AT3G27090
129	LAP2 (LEUCYL AMINOPEPTIDASE 2)	29.5 protein.degradation	(sgn-u577971): highly similar to (696)AT4G30920
130	Alba DNA/RNA-binding protein	35.2 not assigned.unknown	(sgn-u580130): weakly similar to (184)AT1G29250
131	KNAT3 (KNOTTED1-LIKE HOMEBOX GENE 3)	27.3.22 RNA.regulation of transcription.	(sgn-u571927): moderately similar to (385)AT5G25220
132	UNKNOWN	35.2 not assigned.unknown	(sgn-u564644): Tomato 200607#2 [5 ESTs aligned]
133	LHCA3 (Photosystem I light harvesting complex gene 3)	1.1.2.1 PS.lightreaction.photosystem I.LHC-I	(sgn-u580836): moderately similar to (440)AT1G61520
134	UNKNOWN	35.2 not assigned.unknown	(sgn-u566050): Tomato 200607#2 [5 ESTs aligned]
135	EXPA3 (EXPANSIN A3)	10.7 cell wall.modification	(sgn-u580310): moderately similar to (443)AT2G37640
136	FAD5 (FATTY ACID DESATURASE 5)	11.2.1 lipid metabolism.FA desaturation.desaturase	MULTIPLE HITS: (sgn-u569117,sgn-u569116): highly similar to (533)AT3G15850
137	2S albumin superfamily protein	35.2 not assigned.unknown	(sgn-u577838): AT5G5450.1
138	heat shock protein	35.2 not assigned.unknown	(sgn-u566788): weakly similar to (115)AT1G22630
139	Eukaryotic aspartyl protease family protein	27.3.99 RNA.regulation of transcription.unclassified	(sgn-u564367): moderately similar to (480)AT1G09750
140	extensin-like protein	10.5.3 cell wall.cell wall proteins.LRR	(sgn-u584639): moderately similar to (286)UniRef90_O49946cluster
141	UNKNOWN	35.2 not assigned.unknown	NO_MATCH
142	phytoene synthase	16.1.4.1 secondary metabolism.isoprenoids.	(sgn-u580375): Tomato 200607#2 [16 ESTs aligned]
143	ATB2	3.5 minor CHO metabolism.others	(sgn-u571241): highly similar to (555)AT1G60710
144	Eukaryotic aspartyl protease family protein	27.3.99 RNA.regulation of transcription.unclassified	(sgn-u572038): moderately similar to (350)AT1G64830
145	WRKY70 (WRKY DNA-binding protein 70)	27.3.32 RNA.regulation of transcription.WRKY.	(sgn-u578656): weakly similar to (139)AT3G56400

Tabla 17. Validación técnica de los niveles del ARNm de algunos genes estadísticamente significativos en los microarreglos (tablas 15 y 16 del anexo) en frutos maduros de plantas de tomate que silencian *Asr1* bajo el promotor 35S en el experimento I medidos por *qPCR*. Se informa el nombre del gen, el código de identificación del gen de la *Sol Genomics Network* empleado para el diseño de los oligonucleótidos, y los datos de la medición de cada gen para las líneas AS5, AS17 y AS18 (los datos incluyen: el *ratio* o las veces de cambio de un gen en comparación con las plantas controles o WT transformado logarítmicamente, su error estándar (EE) y el p valor). Se marcaron con negrita los valores estadísticamente significativos (prueba de permutación, $p < 0,05$). N=3-5.

Gen	Número de identificación	AS5			AS17			AS18		
		$\text{Log}_2(\text{ratio})$	EE	p-valor	$\text{Log}_2(\text{ratio})$	EE	p-valor	$\text{Log}_2(\text{ratio})$	EE	p-valor
<i>Cbf4</i>	SGN-U563215	-3,55	2,89	0,077	0,55	2,69	0,390	1,24	3,07	0,289
<i>Eix</i>	SGN-U573229	-8,32	5,81	0,071	-7,79	5,36	0,166	-8,98	5,74	0,119
<i>Histone 3</i>	SGN-U581005	-3,82	1,5	0,018	-3,68	1,13	0,008	-4,2	1,28	0,014
<i>Histone 6</i>	SGN-U581058	-2,19	1,17	0,025	-2,37	0,94	0,023	-2,92	1,12	0,016
<i>Nadp or</i>	SGN-U577633	-0,71	1,53	0,192	-0,1	1,43	0,444	0,31	1,6	0,322
<i>Pri</i>	SGN-U573875	-1,93	1,28	0,067	-1,24	1,22	0,045	-1,52	1,32	0,042

Tabla 18. Validación biológica de los niveles del ARNm de genes estadísticamente significativos en los microarreglos (tablas 15 y 16 del anexo) en frutos maduros de plantas que silencian *Asr1* bajo el promotor 35S medidos por *qPCR* en un experimento independiente (experimento III). Se informa el nombre del gen, el código de identificación del gen de la *Sol Genomics Network* o de NCBI empleado para el diseño de los oligonucleótidos, y los datos de la medición de cada gen para las líneas AS5, AS17 y AS18 (los datos incluyen: el *ratio* o las veces de cambio de un gen en comparación con las plantas controles o WT transformado logarítmicamente, su error estándar (EE) y el p valor). Se marcaron con negrita los valores estadísticamente significativos (prueba de permutación, $p < 0,05$). N=3-5.

Nombre del Gen	Identificación del gen	AS5			AS17			AS18		
		Log ₂ (<i>ratio</i>)	EE	p-valor	Log ₂ (<i>ratio</i>)	EE	p-valor	Log ₂ (<i>ratio</i>)	EE	p-valor
<i>P18</i>	SGN-U585243	1,16	0,31	0,018	1,05	0,31	0,020	0,71	0,53	0,136
<i>Aco1</i>	SGN-U565391	1,59	0,79	0,050	1,07	0,78	0,154			
<i>Arr1</i>	SGN-U581778	0,75	0,45	0,024	0,52	0,71	0,036			
<i>Atb2</i>	SGN-U571241	2,81	1,24	0,042	2,41	1,07	0,032	0,07	0,96	0,471
<i>Basic Chitinase (CHI-B o PR3)</i>	SGN-U581507	3,13	0,88	0,032	2,05	0,37	0,011	-2	0,62	0,028
<i>Bgal1</i>	SGN-U578846	-0,52	0,25	0,162	-1,01	0,22	0,025	-0,6	0,68	0,110
<i>Cab</i>	Solyc02g070950	1,5	0,49	0,021	-0,34	0,5	0,232	1,01	0,98	0,122
<i>Cbf3/Dreb1a</i>	SGN-U570402	-0,35	0,41	0,225	-1,06	0,51	0,134	-0,84	0,54	0,049
<i>CBF4/DREB1D (C- REPEAT-BINDING FACTOR 4)</i>	SGN-U563215	1,67	0,44	0,012	0,38	0,43	0,263	-0,41	0,95	0,348
<i>Cnd70</i>	SGN-U564367	1,07	0,25	0,009	0,97	0,45	0,050	1,89	1,55	0,086
<i>Eds1</i>	SGN-U564893	0,1	0,28	0,400	-0,78	1,25	0,271	-1,37	0,61	0,046
<i>Eix</i>	SGN-U573229	1,21	0,6	0,025	0,42	0,55	0,155	-0,28	0,28	0,248
<i>EXPANSIN A15</i>	SGN-U584567	2,34	0,78	0,019	2,14	0,74	0,039	0,39	1,04	0,368
<i>Expansin A3</i>	SGN-U580310	1,38	0,39	0,014	1,04	0,21	0,020	1,1	0,82	0,093
<i>Faab</i>	SGN-U569117	1,63	0,47	0,010	0,65	0,54	0,142			
<i>GSTU8</i>	SGN-U580000	-1,9	0,84	0,059	-0,09	1,83	0,484	-2,41	1,04	0,020
<i>Histona 3</i>	SGN-U581005	3,03	1,21	0,050	1,65	2,42	0,235	7,18	0,78	0,011
<i>Histone H2A.1 o Hta6</i>	SGN-U581058	1,26	0,7	0,037	0,99	1,16	0,155	-0,26	0,78	0,320
<i>KNOTTED1-LIKE HOMEBOX GENE 3 (knat3)</i>	SGN-U571927	1,57	0,69	0,031	2,62	0,65	0,016	1,56	0,65	0,016
<i>Ku70</i>	Solyc09g098230	1,08	0,56	0,012	1,27	0,62	0,018	0,03	0,86	0,488
<i>Leucine-rich repeat/extensin 1 (Irr)</i>	SGN-U572169	1,19	0,5	0,022	0,86	0,44	0,036			
<i>NADP-dependent oxidoreductase</i>	SGN-U577633	0,55	0,18	0,036	0,94	0,18	0,027	0,24	0,71	0,354
<i>Pathogenesis-related protein p2 precursor (Pr4)</i>	SGN-U579235	0,82	0,58	0,104	1,77	0,29	0,009			
<i>Prl</i>	SGN-U573875	1,78	0,6	0,008	0,96	0,75	0,103	0,96	0,75	0,103
<i>TUB8 (tubulin beta-8)</i>	SGN-U564009	1,04	0,73	0,079	1,16	0,61	0,036	0,47	0,58	0,258
<i>2S albumin superfamily protein</i>	SGN-U577838	1,28	0,83	0,152	0,66	0,85	0,289			
<i>Aco4</i>	SGN-U579250	1,25	0,55	0,066	0,3	0,61	0,351	0,91	1,1	0,202
<i>Acs2 o Asf-2</i>	SGN-U567978	0,74	0,35	0,084	0,14	0,22	0,274	0,29	0,62	0,265
<i>Alpha/beta fold family protein</i>	SGN-U574078	0,59	0,41	0,129	0,47	0,35	0,194			
<i>Aterf1</i>	SGN-U574873	0,84	0,85	0,101	1,1	0,99	0,094			
<i>CBS domain-containing protein</i>	SGN-U585007	-0,17	0,54	0,409	-0,46	0,63	0,322			
<i>Cel1</i>	SGN-U585850	1,26	0,62	0,051	-1	0,8	0,208			
<i>Chalcone synthase (CHS)</i>	Solyc05g053550	-0,11	0,53	0,442	-0,01	0,71	0,489			
<i>Chymotrypsin inhibitor 2</i>	Solyc08g080630	1,26	1,11	0,081	0,78	1,32	0,230			
<i>DNAJ</i>	SGN-U566788	-0,26	0,57	0,197	-0,2	0,53	0,291			
<i>Enoyl reductase</i>	Solyc01g006450	0,99	0,56	0,131	1,1	0,57	0,116			
<i>ERD3</i>	SGN-U585211	0,88	0,66	0,066	0,46	0,81	0,235			

<i>Extensin-like protein</i>	SGN-U572169	0,61	0,36	0,073	0,5	0,42	0,224			
<i>GDSL-motif lipase/hydrolase family protein</i>	SGN-U566006	0,22	0,31	0,216	0,36	0,42	0,200			
<i>Gst-like</i>	Solyc09g011590	1,05	2,26	0,323	0,62	1,89	0,359			
<i>Gstu7 ó Gst25</i>	Solyc01g081310	1,2	0,61	0,121	0,79	0,9	0,246			
<i>Heat shock cognate 70 kDa protein 1 (Hsp70-1)</i>	SGN-U578504	0,24	0,88	0,390	-0,2	0,74	0,369			
<i>Ht1</i>	NP_001234849	-0,44	0,52	0,097	-0,43	0,5	0,118			
<i>Ku80</i>	XM_004229767	0,5	0,71	0,204	0,72	0,78	0,125			
<i>Mod1</i>	SGN-U568214	-1,20E-04	0,38	0,487	-0,13	0,42	0,399	-0,04	0,75	0,472
<i>Myb</i>	XM_004239876	-0,29	0,63	0,361	-1,49	1,34	0,123	-0,5	0,79	0,242
<i>NADP-dependent oxidoreductase</i>	Solyc06g063040	1,11	0,42	0,055	0,63	0,73	0,193			
<i>Np24 o osmotin34</i>	SGN-U579414	0,97	0,95	0,105	1,27	1,09	0,090			
<i>Nshb1</i>	SGN-U567304	0,15	0,7	0,399	-0,15	0,82	0,430	-0,37	0,91	0,300
<i>OHP2 (ONE-HELIX PROTEIN 2)</i>	SGN-U574528	-0,12	0,2	0,170	-0,28	0,2	0,164			
<i>p23 o osmotin34</i>	SGN-U581103	0,68	0,88	0,159	1,12	0,92	0,091			
<i>Pathogenesis-related homeodomain protein-like</i>	XM_004242767	0,84	0,54	0,143	1,2	0,62	0,064			
<i>Phytoene synthase (Psy1)</i>	SGN-U580375	-0,39	0,18	0,168	-0,03	0,37	0,467			
<i>Protein binding / zinc ion binding</i>	SGN-U568194	-0,14	0,25	0,402	0,22	0,36	0,361			
<i>Rbcs</i>	SGN-U578246	-0,19	0,5	0,399	-1,75	1,35	0,105	-0,9	0,88	0,143
<i>Rsip (Ribosomal subunit interface protein)</i>	Solyc06g073090	0,33	0,32	0,176	0,64	0,38	0,091			
<i>Transferase/transferring glycosyl groups</i>	Solyc03g118120	0,63	0,65	0,211	0,92	0,91	0,162			

Tabla 19. Lista de genes con el motivo *H-box* (Lindsay *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 1993) en 1500 pares de bases antes del codón ATG. La búsqueda se realizó con el programa FIMO (Grant *et al.*, 2011). Se indica: el nombre del gen y su código de identificación de la secuencia en la *Sol Genomics Network* (SGN), la cadena en la cual el motivo se encuentra (cadena 5'-3' o cadena positiva +, o cadena 3'-5' o cadena negativa -), la posición del motivo («inicio» y «final», respectivamente), el p valor, la secuencia coincidente con el motivo *H-box* y si existen datos de validación de los niveles del ARNm por *qPCR* (tabla 18 del anexo).

Gen	Nro de ID SGN	Cadena	Inicio	Final	p valor	Secuencia Coincidente	Datos de Validación
<i>Cnd70</i>	Solyc04g076190	+	1351	1365	4,74E-06	CCTACCACCCCAACT	sí
<i>TAP2</i>	Solyc03g114950	-	1022	1036	1,47E-05	CCGACCCGGCCTGCT	no
<i>EXPANSIN A3</i>	Solyc09g010860	+	1402	1416	3,42E-05	CCTTCCTCCCGCTCT	sí
<i>GSTU25</i>	Solyc07g056440	-	157	171	4,87E-05	CCTACCCCTCACCAT	no
<i>EXPANSIN A15</i>	Solyc03g115890	+	1362	1376	7,00E-05	CCCACCTCAGTCCCT	sí
<i>ST</i>	Solyc09g055500	+	465	479	7,00E-05	CCTCCCACGACCTCT	no
<i>PI8</i>	Solyc06g083580	-	60	74	7,00E-05	CCTACCACGCCTTCC	sí
<i>Transferring Glycosyl Groups</i>	Solyc03g118120	+	118	132	7,00E-05	CCTACCCCACTCACC	no
<i>PPL1</i>	Solyc03g114930	+	355	369	8,16E-05	CCTCCGGGTAACCT	no

Tabla 20. Lista de genes con el motivo GAAATCA (Sakai *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 2004) en 1500 pares de bases antes del codón ATG. La búsqueda se realizó con el programa FIMO (Grant *et al.*, 2011). Se indica: el nombre del gen y su código de identificación en la *Sol Genomics Network* (SGN), la cadena en la cual el motivo se encuentra (cadena 5'-3' o cadena positiva +, o cadena 3'-5' o cadena negativa -), la posición del motivo («inicio» y «final»), el p valor, la secuencia coincidente con el motivo GAAATCA y si existen datos de validación de los niveles del ARNm por *qPCR* (tabla 18 del anexo).

Gen	Nro de ID SGN	Cadena	inicio	Final	p valor	secuencia coincidente	Datos de validación
<i>ASPARTYL PROTEASE</i>	Solyc05g051240	-	704	710	7,93E-05	GAAATCA	no
<i>ASPARTYL PROTEASE</i>	Solyc05g051240	+	799	805	7,93E-05	GAAATCA	no
<i>ATAUR1 (ATAURORA1)</i>	Solyc12g095870	+	76	82	7,93E-05	GAAATCA	no
<i>Beta-fructosidase</i>	Solyc03g083910	-	395	401	7,93E-05	GAAATCA	no
<i>CDC20.1 (CELL DIVISION CYCLE 20.1)</i>	Solyc08g005420	+	157	163	7,93E-05	GAAATCA	no
<i>CDC20.1 (CELL DIVISION CYCLE 20.1)</i>	Solyc08g005420	+	321	327	7,93E-05	GAAATCA	no
<i>CHL (CHLOROPLASTIC LIPOCALIN)</i>	Solyc12g005180	-	290	296	7,93E-05	GAAATCA	no
<i>DNAI (heat shock protein)</i>	Solyc06g072330	+	10	16	7,93E-05	GAAATCA	no
<i>Geranylgeranyl reductase</i>	Solyc03g115980	+	248	254	7,93E-05	GAAATCA	no
<i>Geranylgeranyl reductase</i>	Solyc03g115980	+	424	430	7,93E-05	GAAATCA	no
<i>GST29 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 29)</i>	Solyc05g006740	+	404	410	7,93E-05	GAAATCA	no
<i>GST29 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 29)</i>	Solyc05g006740	+	416	422	7,93E-05	GAAATCA	no
<i>GST29 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 29)</i>	Solyc05g006740	+	608	614	7,93E-05	GAAATCA	no
<i>GSTU7 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 25)</i>	Solyc01g081310	-	131	137	7,93E-05	GAAATCA	sí
<i>Histone H3</i>	Solyc10g008910	-	1305	1311	7,93E-05	GAAATCA	sí
<i>HTA6 (histone H2A)</i>	Solyc01g099410	+	1142	1148	7,93E-05	GAAATCA	sí

HTB1 (histone h2b.1)	Solyc06g074790	-	868	874	7,93E-05	GAAATCA	no
HTB1 (histone h2b.1)	Solyc06g074790	+	1108	1114	7,93E-05	GAAATCA	no
LRR1 (LEUCINE RICH REPEAT PROTEIN 1)	Solyc11g011020	+	1437	1443	7,93E-05	GAAATCA	no
MFP1 (MAR BINDING FILAMENT-LIKE PROTEIN 1)	Solyc03g120230	-	374	380	7,93E-05	GAAATCA	no
MFP1 (MAR BINDING FILAMENT-LIKE PROTEIN 1)	Solyc03g120230	+	1471	1477	7,93E-05	GAAATCA	no
MOD1 (MOSAIC DEATH 1)	Solyc01g006450	+	1055	1061	7,93E-05	GAAATCA	sí
NUDT14 (Nudix hydrolase homolog 14)	Solyc08g079820	-	477	483	7,93E-05	GAAATCA	no
OHP2 (ONE-HELIX PROTEIN 2)	Solyc04g071930	-	715	721	7,93E-05	GAAATCA	sí
RBCL (large subunit of RUBISCO)	Solyc07g021200	+	1408	1414	7,93E-05	GAAATCA	sí
UNKNOWN	Solyc06g082520	-	815	821	7,93E-05	GAAATCA	no
UNKNOWN	Solyc09g082570	-	1485	1491	7,93E-05	GAAATCA	no
UNKNOWN	Solyc02g091890	-	109	115	7,93E-05	GAAATCA	no
UNKNOWN	Solyc03g058390	-	123	129	7,93E-05	GAAATCA	no
UNKNOWN	Solyc02g092000	-	1320	1326	7,93E-05	GAAATCA	no

Tabla 21. Listado de transcritos y metabolitos agrupados en cada neurona, obtenidos con el programa *omeSOM. H=hoja (indica metabolitos de hojas fuentes). F=fruto (indica metabolitos de frutos maduros). Inv=inverso (indica que los metabolitos o transcritos con niveles relativos con signo opuesto al ingresado son los que se agrupan en dicha neurona). El significado de las abreviaturas de los nombres de los transcritos se encuentra en la tabla de resultados de los microarreglos (tablas 15 y 16 del anexo).

Neurona 1

sacarosa H
 Ácido nonoico H
 Prolina H
 Ácido 5-trans-cafeoil-quinico H
 GST29 (inv)

Neurona 2

beta-Alanina H
 Ácido glicérico H
 Ácido 2-metil-málico H
 Putrescina H
 Serina H
 beta-Fruktosidasa (inv)
 CBF4 (inv)
 ENODL17 (inv)
 COX191 (inv)
 BGAL1 (inv)
 EFE
 TAP2
 HSP701
 ELI31
 NAC083

Neurona 3

Glicerol F
 Ácido trans-cafeico H
 Cisteína H
 Eritrosa H
 Ácido Fumárico H
 Glicerol H
 Glicina H
 Ácido heptadecanoico H
 Ácido metil-hexadecanoico-ester H
 Mioinositol H
 Isoleucina H
 Leucina H
 Ácido Maleico H
 Ácido Málico H
 Ácido Nicotínico H
 Ácido nodecanoico-metil-ester H
 Ácido fosfórico H
 Sacarosa H
 Ácido tertadecanoico-metil-ester H
 Treonina H
 Valina H
 HISTONEH2A5(inv)
 PEPTIDASEM48(inv)
 NUDT14(inv)
 HISTONEH32(inv)
 ASPARTYLPROTEASE(inv)
 WLIM1(inv)
 histoneh2b1(inv)
 histoneH4(inv)
 NFYC13(inv)
 ATG6(inv)
 SCAMP(inv)
 BRH1
 saposinB
 TT7
 TCP1
 EDS1
 UGE5
 GSTU8

Neurona 4

OctadecanoicacidF
 SerineF
 LOX2(inv)
 TET3(inv)
 PAR1
 NIA2
 2Salbumin
 TPR4
 UDPglycosyltransferase
 SAURlike
 CYP72A15
 CYP96A1
 SWEET11
 DWF1
 PR3CHIB
 VAMP7
 Fbox
 aspartylprotease

Neurona 5

AlaninebetaF
 AsparticacidF
 ProlineF
 PyroglutamicacidF
 ThreonineF
 AsparagineH
 DUT1(inv)
 histoneH3(inv)
 histoneH2A(inv)
 geranylgeranylreductase(inv)
 GDSL(inv)
 trypsinandproteaseinhibitor(inv)
 FAD2
 GSTU8
 PER12
 PR10
 RIP5
 PME3
 PLAT1
 alphabetaHydrolase
 KCS113
 ATAGAL2
 CSLG1
 GOX1(inv)
 CWLP
 SDR5
 AlbaDNARNAbindingprotein

Neurona 6

AsparagineF
 GlycineF
 GuanidineF
 IsoleucineF
 LeucineF
 MalicacidF
 MethionineF
 OctacosanenF
 Proline4hydroxytransF
 ValineF
 copperionbinding(inv)
 GF14(inv)
 PSY(inv)
 NADPdependentoxidoreductase(inv)
 CBS(inv)
 PSY(inv)
 histoneH3(inv)
 OSM34(inv)
 curculinlikemannosebinding
 CHIB
 PR4
 CXE20
 toIB
 FAD5
 2Salbumin
 aspartylprotease
 extensinlikeprotein
 phy
 ATB2

Neurona 9

Ácido 2-metil-cítrico F
 13-dihidroxiacetona H
 Ácido Aspártico H
 Trans-4-hidroxi-prolina H
 PyroglutamicacidH
 Ácido succínico H
 Ácido treónico H
 FAD8 (inv)
 MOD1 (inv)
 glycosyltransferase (inv)
 ATaur1 (inv)
 TSO2 (inv)

Neurona 7

Calistegina B2 H (inv)
 MEE66
 ACO1
 DREB1A(inv)

Neurona 11

GlutamicacidF
 PhosphoricacidF
 PCR2(inv)
 PRL(inv)
 FPS2FARNESYLDIPHOSPHATESYNTASE2(inv)
 disease resistance
 SadenosylMethionindependentmethyltransferase
 Plantinvertasepectinmethylesteraseinhibitor
 POP2
 alphabetaHydrolase
 photosystemII5kDprotein
 GSTU25
 Lungseventransmembranereceptor
 alphabetaHydrolase

Neurona 12

ErythronicacidF
 RINGUbox(inv)
 OSM34(inv)
 POT(inv)
 LeucinerichrepeatLRRfamilyprotein
 CYCD32
 GAPB
 LHCB13
 HXXXDtypeacyltransferasefamilyprotein
 DCD
 LAP2
 KNAT3
 LHCA3
 EXPA3
 heatshockprotein

Neurona 13

Fructosa F(inv)
 Glucosa H (inv)
 PGR5
 PRXR1peroxidase42
 RPT2
 LRRfamilyprotein
 FADNADPbindingoxidoreductase
 RBCL
 MBF1C
 CYP98A3
 MFP1
 OHP2
 NSHB1
 SBPASE
 NUDT2
 TUB8 (inv)
 Steroidsulfotransferase (inv)
 GAPB (inv)
 dormancyauxinassociatedfamilyprotein (inv)
 CML38 (inv)
 GH9B1 (inv)
 Transmembraneaminoacidtransporterfamilyprotein
 (inv)
 CAB4 (inv)
 PPL1 (inv)
 Ncdomaincontainingproteinrelated (inv)
 L-asparaginase (inv)
 LHCB13 (inv)

Neurona 14

Ácido cis-3-cafeoil-quinico H (inv)
 Ácido trans-3-cafeoil-quinico H (inv)
 ABA3
 PAP27
 Metallohydrolaseoxidoreductas
 DNAJheatshockPROTEIN
 GSTU7
 CWINV4 (inv)

Neurona 16

GlucoseF
 EicosanoicacidmethylesternF
 GalactoseF
 Gluconicacid2oxoF
 SuccinicacidF
 TyrosineF
 betacaroteneF
 lycopeneF
 fructoseH
 Adipicacid2aminoH
 EicosanoicacidmethylesternH
 Glucose6phosphateH
 GlutamicacidH
 MalonicacidH
 NoradrelinaH
 PhenylalanineH
 RhamnoseH
 SalicylicacidH
 SorboseH
 TyramineH
 CHL(inv)

Neurona 17

PutrescineF
 SPL3(inv)
 LRR1(inv)
 SPS1(inv)
 CDC201(inv)
 ALPHABETAHYDROLASEPROTEIN(inv)
 OPR3
 RABA1f
 IAA16
 YAB5
 NODULIN
 alphabetaHydrolase
 epoxidehydrolase
 PLASTOQUINONEDEHYDROGENASE
 BGAL8
 inositol3phosphatesynthase
 UBQ10
 RHA1
 EFE
 CDKA1

Neurona 18

HBP1(inv)
 OXIDOREDUCTASELIPID(inv)
 DNAJheatshockprotein(inv)
 HPRHYDROXYPYRUVATEREDUCTASE(inv)
 CYP707A1(inv)
 ERF1(inv)
 EF1alpha(inv)
 LOX1(inv)
 CYP73A5(inv)
 DAC(inv)
 RCA(inv)
 FOP1(inv)
 starchsynthase
 LeucinerichrepeatLRRfamilyprotein
 NCRKproteinkinase
 LHCB6
 NIP42
 LHCItypeI
 fructosebisphosphatealdolase
 EPIMERASEREDUCTASE
 NTT1
 14betamannanendohydrolase
 PHOTOSYSTEMIISUBUNITXPSBX
 CYT1
 ATTK1A
 LHCA4
 RuBisCOsmallsubunit2
 CAD
 PSII
 EXL3
 PI8 (pectin lyase)
 LHCB13
 PSBX
 LHCB13
 LHCB13
 LHCB13
 petMcytochromeb6fcomplexsubunit
 RPL19

Neurona 19

HBP1
 OXIDOREDUCTASELIPID
 DNAJ
 HPR
 CYP707A1
 ERF1
 EF1alpha
 LOX1
 CYP73A5
 DAC
 RCA
 FOP1
 starchsynthase (inv)
 LeucinerichrepeatLRRfamilyprotein (inv)
 NCRKproteinkinasefamilyprotein (inv)
 LHCB6 (inv)
 NIP42 (inv)
 LHCItypeI (inv)
 fructosebisphosphatealdolase (inv)
 EPIMERASEREDUCTASE (inv)
 NTT1(inv)
 14betamannanendohydrolase (inv)
 PHOTOSYSTEMIISUBUNITXPSBX (inv)
 CYT1 (inv)
 ATTK1 (inv)
 LHCA4 (inv)
 RuBisCOsmallsubunit2 (inv)
 CAD (inv)
 PSIIQPHOTOSYSTEMIISUBUNITQ2 (inv)
 EXL3 (inv)
 PI8 (pectin lyase) (inv)
 LHCB13 (inv)
 PSBXPHOTOSYSTEMIISUBUNITX (inv)
 LHCB13 (inv)
 LHCB13 (inv)
 LHCB13 (inv)
 petMcytochromeb6fcomplexsubunit (inv)
 RPL19 (inv)

Neurona 20

Putrescina F(inv)
 SPL3
 LRR1
 SPS1
 CDC201
 ALPHABETAHYDROLASEPROTEIN
 OPR3 (inv)
 RABA1f (inv)
 IAA16 (inv)
 YAB5 (inv)
 NODULIN (inv)
 alphabetaHydrolase (inv)
 epoxidehydrolase (inv)
 PLASTOQUINONEDEHYDROGENASE (inv)
 BGAL8 (inv)
 inositol3phosphatesynthase (inv)
 UBQ10 (inv)
 RHA1 (inv)
 EFE (inv)
 CDKA1 (inv)

Neurona 21

Glucosa F (inv)
 Ácido eicosanoico-metil-ester F (inv)
 Galactosa F (inv)
 Ácido oxoglucónico F (inv)
 Ácido succínico F (inv)
 Tirosina F (inv)
 beta-Caroteno F(inv)
 Licopeno F (inv)
 Fructosa H (inv)
 Ácido 2-amino-adípico H (inv)
 Ácido metil-eicosanoico-ester H (inv)
 Glucosa-6-fosfato H (inv)
 Ácido glutámico H (inv)
 Ácido malónico H (inv)
 Noradrelina H (inv)
 Fenilalanina H (inv)
 Ramnosa H (inv)
 Ácido salicílico H (inv)
 Sorbosa H (inv)
 Tiramina H (inv)
 CHL

Neurona 24

fructoseF
 GlucoseH
 PGR5(inv)
 PRXR1(inv)
 RPT2(inv)
 LRR(inv)
 FADNADPbindingoxidoreductase(inv)
 RBCL(inv)
 MBF1C(inv)
 CYP98A3(inv)
 MFP1(inv)
 OHP2(inv)
 NSHB1(inv)
 SBPASE(inv)
 NUDT2(inv)
 TUB8
 steroidsulfotransferase
 GAPB
 dormancyauxinassociated
 CML38
 GH9B1
 Transmembraneaminoacid
 CAB4
 PPL1
 NCdomaincontainingproteinrelated
 Lasparaginase
 LHCB13

Neurona 23

Quinicacid3caffeoylcisH
 Quinicacid3caffeoyltransH
 ABA3(inv)
 PAP27(inv)
 Metallohydrolaseoxidoreductasesuperfamily(inv)
 DNAJ(inv)
 GSTU7(inv)
 CWINV4

Neurona 25

Ácido eritrónico F (inv)
 RINGUboxsuperfamilyprotein
 OSM34OSMOTIN34
 POT
 LeucinerichrepeatLRRfamilyprotein (inv)
 CYCD32 (inv)
 GAPB (inv)
 LHCB13 (inv)
 HXXXDtypeacyltransferasefamilyprotein (inv)
 DCD (inv)
 LAP2 (inv)
 KNAT3 (inv)
 LHCA3 (inv)
 EXPA3 (inv)
 heatshockprotein (inv)

Neurona 26

Ácido glutámico F (inv)
 Ácido fosfórico F (inv)
 PCR2
 PRLPROLIFERA
 FPS2
 disease-resistance-responsive-protein-related (inv)
 Sadenosylmethionine-dependent-methyltransferase (inv)
 Plant-invertase-pectin-methyl-esterase-inhibitor (inv)
 POP2 (inv)
 alpha-beta-Hydrolase-superfamily-protein (inv)
 photosystem-II-5kD-protein (inv)
 GSTU25 (inv)
 Lung-seven-transmembrane-receptor-family-protein (inv)
 alpha-beta-Hydrolase (inv)

Neurona 27

Sacarosa F (inv)
 Ácido glicólico F (inv)
 Ácido hexadecanoico-metil-ester F (inv)
 Mioinositol F (inv)
 Fenilalanina F (inv)
 Ácido pirúvico F (inv)
 Metionina H (inv)
 Ácido octadecanoico H (inv)
 AHP1
 EFE
 prolineoxidase
 GA3OX1
 protease-inhibitor-p322-precursor
 DTX35
 GDSL
 GUS1(inv)
 ACS21 (inv)
 EXPA15 (inv)
 nucleolar-essential-protein-related (inv)
 WRKY70 (inv)

Neurona 28

Citric-acid-2-methyl-F
 13Dihydroxyacetone-H
 Aspartic-acid-H
 Proline-4-hydroxy-trans-H
 Pyroglutamic-acid-H
 Succinic-acid-H
 Threonic-acid-H
 FAD8(inv)
 MOD1(inv)
 glycosyltransferase(inv)
 ATAU1(inv)
 TSO2(inv)

Neurona 30

CalystegineB2H(inv)
 MEE66
 ACO1
 DREB1A(inv)

Neurona 31

Asparagina F
 Glicina F
 Guanidina F
 Isoleucina F
 Leucina F
 Ácido málico F
 Metionina F
 Octacosano F
 Trans-4-hidroxi-prolina F
 Valina F
 copper-ion-binding (inv)
 GF14 (inv)
 PSY (inv)
 NADP-dependent-oxidoreductase (inv)
 CBS (inv)
 PSY (inv)
 histoneH3 (inv)
 OSM34 (inv)
 curculin-like-mannose-binding
 CHIB
 PR4
 CXE20
 tolB
 FAD5
 2Salbumin
 aspartyl-protease
 extensin-like-protein
 phy
 ATB2

Neurona 32

beta-Alanina F
 Ácido aspártico F
 Prolina F
 Piroglutámico F
 Treonina F
 Asparagina H
 DUT1 (inv)
 histoneH3 (inv)
 histoneH2A (inv)
 geranylgeranylreductase (inv)
 GDSL(inv)
 trypsinandproteaseinhibitor (inv)
 FAD2
 GSTU8
 PER12
 PR10
 RIP5
 PME3
 PLAT1
 alphabetaHydrolase
 KCS113
 ATAGAL2
 CSLG1
 GOX1 (inv)
 CWLP
 SDR5
 AlbaDNARNAbindingprotein

Neurona 33

Ácido octadecanoico F
 Serina F
 LOX2 (inv)
 TET3 (inv)
 PAR1
 NIA2
 2Salbumin
 TPR4
 UDPglycosyltransferase
 SAURlike
 CYP72A15
 CYP96A1
 SWEET11
 DWF1
 PR3CHIB
 VAMP7
 Fbox
 aspartylprotease

Neurona 34

GlycerolF
 CaffeicacidtransH
 CysteineH
 ErythroseH
 FumaricacidH
 GlycerolH
 GlycineH
 HeptadecanoicacidH
 HexadecanoicacidmethylesterH
 InositolmyoH
 IsoleucineH
 LeucineH
 MaleicacidH
 MalicacidH
 NicotinicacidH
 NodcanoicacidmethylesterH
 PhosphoricacidH
 SucroseH
 TetradecanoicacidmethylesternH
 ThreonineH
 ValineH
 HISTONEH2A5(inv)
 PEPTIDASEM48(inv)
 NUDT14(inv)
 HISTONEH32(inv)
 ASPARTYLPROTEASE(inv)
 WLIM1(inv)
 histoneh2b1(inv)
 histoneH4(inv)
 NFYC13(inv)
 ATG6(inv)
 SCAMP(inv)
 BRH1
 saposinB
 TT7
 TCP1
 EDS1
 UGE5
 GSTU8
 GSTU8(II)
 GSTL3

Neurona 35

AlaninebetaH
GlycericacidH
Malicacid2methylH
PutrescineH
SerineH
betafructosidase(inv)
CBF4(inv)
ENODL17(inv)
COX191(inv)
BGAL1(inv)
EFE
TAP2
HSP701
ELI31
NAC083

Neurona 36

sucroseH
NonoicacidH
ProlineH
Quinicacid5caffeoyltransH
GST29(inv)

Tabla 22. Tabla de oligonucleótidos empleados. Se indica: gen, identificación de Pubmed o de *Sol Genomics Network*, secuencia del oligonucleótido *forward* y *reverse*, concentración de los oligonucleótidos a la cual se emplearon en las reacciones de PCR ([C]) y la temperatura de *annealing* (T°) de la reacción de PCR.

Gen	Identificación	Oligonucleótido <i>Forward</i>	Oligonucleótido <i>Reverse</i>	[C] (nM)	T° (°C)
<i>Asr1</i>	NM_001247703	5' CCTGTTCCACCACAAGGACAA3'	5' CGATTTGCTCGAGATGTTTATGG3'	100	60
<i>EF1 α</i>	AJ536671	5' GATTGGTGGTATTGGTACTGTC 3'	5' AGCTTCGTGGTGCATCTC 3'	100	60
<i>Ht1</i>	SGN-U446865	5' CCTGGGATTTGCATCAGTTT3'	5' TGGCGGAAGCTGAAATTAAT 3'	100	60
<i>Sut2</i>	SGN-U423251	5' GAGTTGGCACAGATGTTT 3'	5' AGCGATTGTTTCTTGAGT 3'	100	60
<i>Tmt3</i>	SGN-E129731	5' CTGCCCCACCAGAAATAAGA 3'	5' AGCCTCCTCATTGACCTT 3'	100	60
<i>Vgt</i>	SGN-U430963	5' GGCTCAGACTGAAGTTTCG 3'	5' CCACAAGACCAAGCTGAACA 3'	100	60
<i>Hexokinase1</i>	SGN-E750217	5' GAGGCATCAATTCCTCCAAA 3'	5' GCCCTTTGCCACCTCATAA 3'	100	60
<i>SnRK1.1</i>	SGN-E750838	5' AGATTCGTATGCACCCTTGG 3'	5' ACGCCACAGTACCCTCATTC 3'	100	60
<i>actina</i>	SGN-U339017	5' TGGCATCATACCTTTTACAA3'	5' TCCGGGCATCTGAACCTCT3'	100	58
<i>18s rRNA</i>	X98800	5' GGGCATTTCGTATTCATAGTCAGAG 3'	5' CGGTTCTTGATTAATGAAAACATCCT 3'	100	60
<i>Asr2</i>	XM_004237758.1	5' CTGGTGCTTTGGCCTTACAT 3'	5' GTGGTGTCCACCCTCAACTT 3'	100	60
<i>Asr3/5</i>	XM_004237757.1	5' AGCACCATAGCCATCTCCAG 3'	5' ATGGAATGCAAATCCACCAG 3'	100	60
<i>Asr4</i>	NM_001282319.1	5' TGAAGAACTTGGGGGACTTG 3'	5' CTTCCCTCAGCTTCTCCT 3'	100	62
<i>Expressed</i>	SGN-U346908	5' TGGGTGTGCCTTTCTGAATG 3'	5' GCTAAGAACGCTGGACCTAATG 3'	200	60
<i>CAC</i>	SGN-U314153	5' CCTCCGTTGTGATGTAAGTGG 3'	5' ATTGGTGGAAAGTAACATCATCG 3'	200	60
<i>TIP41</i>	SGN-U321250	5' ATGGAGTTTTGAGTCTTCTGC 3'	5' GCTGCGTTTCTGGCTTAGG 3'	200	60
<i>SAND</i>	SGN-U316474	5' TTGCTTGGAGGAACAGACG 3'	5' GCAAACAGAACCCTGAATC 3'	200	60
<i>ARR1</i>	SGN-U581778	5' GAAATGGACCTGCCTGTTA 3'	5' CTTCCACGCTTGTTGATTGA 3'	100	60
<i>ADHG</i>	Solyc06g063040	5' GGTGCTATTGCTGTGTGG3'	5' TTCGAGGCCTTCAGCTATGT3'	100	62
<i>CHY12</i>	Solyc08g080630	5' CAAAGGAAAGTTGGCCAGAA3'	5' TCAACCAACTTTGGGAGTTTG3'	100	62
<i>ENOYLR</i>	Solyc01g006450	5' CGTGAAGGAGGATTTGGAA3'	5' CCACCTGGGTTTATAATTGG3'	100	60
<i>GSTR</i>	Solyc01g081310	5' CTGAAGTTTATTGGGCACT3'	5' CGCCTTGGCTTTTATAAG3'	200	60
<i>RSIP</i>	Solyc06g073090	5' GGCGCTGTAGTCAAGAGG3'	5' ACCCCCTCTTTCTGCTGT3'	100	62
<i>CAB</i>	Solyc02g070950	5' GGCCCTGACCGTGAAGTA3'	5' CCTTGAACCACACAGCTTCA3'	100	60
<i>GSTRlike</i>	Solyc09g011590	5' TGGTGACCACTTTATTGG3'	5' GGCTCGATAACGGATAAGCA3'	200	60
<i>TTGG</i>	Solyc03g118120	5' CGGCGACCCAATACCTACTA3'	5' ATGACCTGCACTCTTGTCT3'	100	62
<i>Ht1</i>	NP_001234849	5' TGGTAACGTCGTGGAGACAA 3'	5' TGATTCATGAAGCCGGTGA 3'	200	58
<i>ERD3</i>	SGN-U585211	5' CACCAAGACTGCTGGTGAGA 3'	5' GCACGCTTTTATCTTGACA 3'	200	60

NP24	SGN-U579414	5'GGAGGAAAATGTCACGCAAT 3'	5'ACCAGGGCAAGTAAATGTGC 3'	200	60
CBF3	SGN-U570402	5'AGGGGAATCAGGAAGAGGAA 3'	5'ACAAGCAGAACGGCCTCTTA 3'	100	60
CBF4	SGN-U563215	5'GGCTGCACAAGCTTTTTCTC 3'	5'TTTCTTGCCATCCTTCCATC 3'	100	60
CER1	sgn-u578441	5'GCAGCGAATTGACACACACT 3'	5'CCACCATCTCCCTCAACAAT 3'	300	60
DRRPR	SGN-U584206	5'GGACCTGACCCAACCTTCAAA 3'	5'CAACGATAGCCATCTCACGA 3'	300	59
DNAJ	SGN-U566788	5'CGGAGTTAGGGAAAGTGCTG 3'	5'TCGCAGCGTAAAGAACACAC 3'	200	59
EDS1	SGN-U564893	5'TTTTGGATCCCCTCTTGTG 3'	5'CAACAGCCTCGTGCTGATAA 3'	100	60
EIX1	SGN-U573229	5'TGAGTCCCACCTTTCAAACC 3'	5'TTGAAGCCATTTTGGGAAAG 3'	100	60
Hsp70-1	SGN-U578504	5'AGCTCGGACGACAAGAAAAA 3'	5'ATAGGAACACCTGCGTCACC 3'	200	60
P23	SGN-U581103	5'TTGTTCACACAAGGTCCAT 3'	5'ATCTCCAAGGGGAAATTTGG 3'	200	60
PR3	SGN-U581507	5'ACAAGTGGAGGATCGGATTG 3'	5'GGGCATCCAAAATCCCTTAT 3'	100	60
PR4	SGN-U579235	5'GCTACGAACGTTAGGGCAAC 3'	5'CTCAAGCATCTACCCGATGA 3'	100	60
ACO4 EFE	SGN-U579250	5'CACAAGGAGCTGTGCAATGT 3'	5'CCGTGGTAGTTGATGGCATG 3'	100	60
ACS2	SGN-U567978	5'GAAAGCGCGATGAGGTTAGG 3'	5'CAAACGAAGATCCAGGCGAG 3'	100	62
α8 hydrolase	SGN-U574078	5'AGGGGTTTCTGTGGGTTCA 3'	5'ACATCAGCCTTCTCCAGCTT 3'	200	60
bgal1	SGN-U578846	5'GGCCTTGGCTTACGATCATG 3'	5'CAGTTAGTGAGACTGGCCCA 3'	100	60
gstu7	SGN-U575771	5'CCACTCCTCCCTGAAGATCC 3'	5'GCAGATGATCCAAGCAGACG 3'	200	59
gstu8	SGN-U580000	5'AGTTGTGAGATGGCAGGAGT 3'	5'ACTCACAATTGGCTTGCCA 3'	100	62
Irr	SGN-U572169	5'CAACAGTTTCACAGGCCCAA 3'	5'TCTCGGACCCATGTACCCTA 3'	100	60
mbf1c	SGN-U566716	5'TGGAGCACAAGTTCAAACGG 3'	5'CAACAACCTGCGTCTTTCA 3'	400	59
mod1	SGN-U568214	5'TACTTGCTTTCGAGGCTGGA 3'	5'GAGTGGCGATGCTAGGAATG 3'	100	60
ohp2	SGN-U574528	5'CCTTCAACTTCTTCGCCACC 3'	5'GGACCTTGATTCGCTTGCTC 3'	300	60
tubulina	SGN-U564009	5'TGGAGTAACTTGCTGCCTCA 3'	5'ATAACGGCCATGTCGAGGAT 3'	100	60
NSHB1	SGN-U567304	5'TGCCATTGGATCAAAATCCT 3'	5'AGTGCTCATCAACCACACCA 3'	200	59
MYB	XM_004239876	5'ACTAAGCCCTGGAAATGCT 3'	5'CCCTGCATTGGCACTATTCT 3'	200	60
ASF2	SGN-U567978	5'TCAGTATTGGCGCAACAGAG 3'	5'TTTGTCAAGCAAATGCAAGC 3'	100	60
CAB	Solyc02g070950	5'ACCGGAGTTACCAACGACAC 3'	5'ATGATCCCTGGAACAGCAAG 3'	100	60
RBCS	SGN-U578246	5'TGCCATTGGATCAAAATCCT 3'	5'AGTGCTCATCAACCACACCA 3'	100	60
CNDP70	sgn-u564367	5'GCAAGTCTTTGGCATGTCT 3'	5'TGAGTGGGACTCGACACAAA 3'	100	62
KNAT3	sgn-u571927	5'GAGCAGTTGACGGAGTCACA 3'	5'AAGATCCCAACAGCCATGA 3'	100	62
PRL	sgn-u573875	5'GACTCAGCGGTCAGAGGAAG 3'	5'ATCCGAACAACGTGTCACAA 3'	100	60
WRKY70	sgn-u578656	5'TTGATTCTCCAATGGATGG 3'	5'CGGAGGCTTCAAATGTTGTT 3'	100	60

HIST3	sgn-u581228	5' TGAAAAAGCCTCACCGTTTC 3'	5' CAACAAGGTACGCTTCAGCA 3'	100	60
HIST6	sgn-u581058	5' GGAATACCTTGCTGCTGAGG 3'	5' CTGCCGATTTCTTAGGCAAC 3'	100	60
PI8	sgn-u585243	5'ACAGATACCTTGCCCCAGTG 3'	5'GTCAAGAAAGTGACCAGCA 3'	100	60
ACO1	sgn-u565391	5' CAACACAGACTGGGAAAGCA 3'	5' GGCCAAGTTCTCACACATT 3'	100	60
AP2	sgn-u563215	5' GGCTGCACAAGCTTTTTCTC 3'	5' TTTCTTGCCATCCTCCATC 3'	100	60
ATERF1	SGN-U574873	5' TAGAAAGAGGCCATGGGGTA 3'	5' AGAGACCAAGGACCCCTCAT 3'	100	60
ATPME3	sgn-u589799	5' TGCAAAATCCCATTCATT 3'	5' ACTGACCCGAACCAGAACAC 3'	200	60
GDSL	sgn-u566006	5' GAAGTTGGGGTTCAATCCT 3'	5' TCATCGAGTCATTTCCACCA 3'	100	60
FADB	sgn-u569117	5' GGCGTGAATACTGGTGACT 3'	5' GGCCAATCCAATAGCTTGAA 3'	100	60
EXP15	sgn-u584567	5' TTTAGTGCTGGTGACGAACG 3'	5' CATCCAGCAGGGATAGCATT 3'	100	60
EXPANSINAA3	sgn-u580310	5' GCAAAATGGTGTCTTCCTGGT 3'	5' GCACGGTACAGTCCGATTTT 3'	100	62
CEL1	sgn-u585850	5' AAACACATTGCCAAACGTCA 3'	5' CTGTAAATTTGGCCCTCCA 3'	100	60
2SAlbumin	SGN-U577838	5' AAACCAAAGCCATCATGTCC 3'	5'AAAGACAAAGGGCAGCTTCA 3'	100	60
PSY1	sgn-u580375	5'GGTTTGCTGTCTGTGGTCT 3'	5' GGCAACAGACATTCTGAGCA 3'	100	60
LTP	sgn-u577838	5'TGCTGCAGAAAACCCAGAAG 3'	5' AGGCAGATTCATTGCAGCTT 3'	200	60
EXTENSIN-LIKE	sgn-u584639	5'GCAAGGTGAAGACTTGCAT 3'	5' ATCACTAGCAGGGCAACTCG 3'	100	60
ATB2	SGN-U571241	5' CAGAGGCTTCAGCATCAACA 3'	5' AGTCCTCAACCAGCTTTGGA 3'	100	62
CBS	sgn-u585007	5'CCACGCTGGCAGATAACAATA 3'	5' CGATAACCGTTTCAGCAAT 3'	100	60
CIP	sgn-u578433	5' CATTGTACATTGGGCCAGAA 3'	5' CCAGCCCAAATTATCTCCAA 3'	200	60
GRF	sgn-u579244	5'GCGGTGGTAATCTCCTTCA 3'	5'GCCATCGCTAACTTCGATTT 3'	200	59
NADP OR	sgn-u577633	5'GTCAGCTTGTGGGCAATTT 3'	5' TCCCTCCAACGTTCTCAAAG 3'	100	60
ZIB	sgn-u568194	5'GTATCGCCCTGAATCAAAG 3'	5' TTAATCGGTACCCCTTCCAG 3'	100	60
HOMEODOM	XM_004242767.1	5'CGCTTACAAGGAGGACGAG 3'	5' AGCAAATCCAGACGGTGAAC 3'	100	60
CHS	Solyc05g053550	5'GCCATTAAAGAATGGGGTCA 3'	5' GCTAAGTCCTTTGCCAGTCG 3'	100	60
KAP2-KU80	XM_004229767.1	5' AATGCCATCCTTGCACTTTC 3'	5' GAAACTGGAATCCCGAACA 3'	100	60
KAP2-KU70	XM_004247949.1	5' TCTTTTCTGCGGATGAGCTT 3'	5' GCTTAAGCCGCAACATTGAT 3'	100	62

Referencias bibliográficas

- Ainsworth E, Bush D** (2011) Carbohydrate export from the leaf: a highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. *Plant Physiol* 155: 64-69.
- Akhtar S, Briddon RW, Mansoor S.** (2011) Reactions of *Nicotiana* species to inoculation with monopartite and bipartite begomoviruses. *Virology* 428:475.
- Ambawat S, Sharma P, Yadav NR, Yadav RC.** (2013) MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiol Mol Biol Plants*. 19(3):307-321.
- Amitai-Zeigersona H, Scolnik P, Bar-Zvi D** (1995) Tomato *Asr1* mRNA and protein are transiently expressed following salt stress, osmotic stress and treatment with abscisic acid. *Plant Science* 110: 205-213.
- Andersen CL, Ledet-Jensen J, Orntoft T** (2004) Normalization of real-time quantitative RT-PCR data: a model based variance estimation approach to identify genes suited for normalization - applied to bladder- and colon-cancer data-sets. *Cancer Research*. 64: 5245-5250.
- Aoki K, Ogata Y, Igarashi K, Yano K, Nagasaki H, Kaminuma E, Toyoda A.** (2013) Functional genomics of tomato in a post-genome-sequencing phase. *Breed Sci*. 63(1):14-20.
- Aragüez I, Valpuesta V.** (2013) Metabolic engineering of aroma components in fruits. *Biotechnol J*. 8(10):1144-58.
- Arenas-Huertero F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, Leon P** (2000) Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes Dev* 14: 2085-2096.
- Arenhart RA, Margis R, Margis-Pinheiro M.** (2012) The rice ASR5 protein: a putative role in the response to aluminum photosynthesis disturbance. *Plant Signal Behav*. 7(10):1263-6.
- Arenhart RA, Bai Y, de Oliveira LF, Neto LB, Schunemann M, Maraschin Fdos S, Mariath J, Silverio A, Sachetto-Martins G, Margis R, Wang ZY, Margis-Pinheiro M.** (2014) New insights into aluminum tolerance in rice: the ASR5 protein binds the STAR1 promoter and other aluminum-responsive genes. *Mol Plant*. 2014 Apr;7(4):709-21.
- Ascencio-Ibáñez JT, Sozzani R, Lee TJ, Chu TM, Wolfinger RD, Cella R, Hanley-Bowdoin L.** (2008) Global analysis of Arabidopsis gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiol*. 148(1):436-54.
- Babiychuk E, Kushnir S, Belles-Boix E, Van Montagu M, Inzé D.** (1995) *Arabidopsis thaliana* NADPH oxidoreductase homologs confer tolerance of yeasts toward the thiol-oxidizing drug diamide. *J Biol Chem*. 270(44):26224-31.

- Baena-González E, Sheen J** (2008) Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci* 13: 474-482.
- Bar M, Sharfman M, Avni A.** (2011) LeEix1 functions as a decoy receptor to attenuate LeEix2 signaling. *Plant Signal Behav.* 6(3):455-7.
- Baranowskij N, Frohberg C, Prat S, Willmitzer L** (1994) A novel DNA binding protein with homology to Myb oncoproteins containing only one repeat can function as a transcriptional activator. *EMBO J* 13:5383-5392.
- Barker L, Kühn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward JM, Frommer WB** (2000) SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* 12(7):1153-64.
- Barrett DM, Weakley C, Diaz JV, Watnik M.** (2007) Qualitative and nutritional differences in processing tomatoes grown under commercial organic and conventional production systems. *J Food Sci.* 72(9):C441-51.
- Bastías A, López-Climent M, Valcárcel M, Rosello S, Gómez-Cadenas A, Casaretto JA.** (2011) Modulation of organic acids and sugar content in tomato fruits by an abscisic acid-regulated transcription factor. *Physiol Plant.* 141(3):215-26.
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcíarrubio A, Campos F, Covarrubias A** (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol* 148: 6-24.
- Beers EP, Jones AM, Dickerman AW.** (2004) The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in Arabidopsis. *Phytochemistry.* 65(1):43-58.
- Bertini L, Caporale C, Testa M, Proietti S, Caruso C.** (2009) Structural basis of the antifungal activity of wheat PR4 proteins. *FEBS Lett.* 583(17):2865-71.
- Biemelt S, Tschiersch H, Sonnewald U** (2004) Impact of Altered Gibberellin Metabolism on Biomass Accumulation, Lignin Biosynthesis, and Photosynthesis in Transgenic Tobacco Plants. *Plant Physiology* 135: 254–265.
- Bombarely, Menda, Tecle, Buels, Strickler, Fischer-York, Pujar, Leto, Gosselin and Mueller** (2011) The Sol Genomics Network (solgenomics.net): growing tomatoes using Perl. *Nucleic Acids Res.* 39: 1149–1155.
- Bolouri-Moghaddam M, Le Roy K, Xiang L, Rolland F, Van den Ende W** (2010) Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *FEBS Journal* 277: 2022–2037.
- Breeze E, Harrison E, McHattie S, Hughes L, Hickman R, Hill C, Kiddle S, Kim Y, Penfold C, Jenkins D, Zhang C, Morris K, Jenner C, Jackson S, Thomas B, Tabrett A, Legaie R, Moore J, Wild D, Ott S, Rand D, Beynon J, Denby K, Mead A, Buchanan-Wollaston V** (2011) High-Resolution Temporal Profiling of Transcripts during Arabidopsis Leaf Senescence Reveals a Distinct Chronology of Processes and Regulation. *The Plant Cell* 23: 873–894.

- Brenner WG, Schmülling T** (2012) Transcript profiling of cytokinin action in Arabidopsis roots and shoots discovers largely similar but also organ-specific responses. *BMC Plant Biol.* 12:112.
- Büttner M** (2007) The monosaccharide transporter(-like) gene family in Arabidopsis. *FEBS Lett* 581: 2318-2324.
- Çakir B, Agasse A, Gaillard C, Saumonneau A, Delrot S, Atanassova R** (2003) A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 2165-2180.
- Cantu D, Blanco-Ulate B, Yang L, Labavitch J, Bennett A, Powell A** (2009). Ripening-regulated susceptibility of tomato fruit to *Botrytis cinerea* requires NOR but not RIN or ethylene. *Plant Physiol.* 150: 1434–1449.
- Cantu D, Vincente A, Greve L, Dewey F, Bennett A, Labavitch J, Powell A** (2008). The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 859–864.
- Carli P, Arima S, Fogliano V, Tardella L, Frusciante L, Ercolano MR.** (2009) Use of network analysis to capture key traits affecting tomato organoleptic quality. *J Exp Bot.*60(12):3379-86.
- Carrari F, Fernie A, Iusem N** (2004) Heard it through the grapevine? ABA and sugar cross-talk: the ASR story. *Trends Plant Sci* 9: 57-59.
- Carrari F, Fernie A** (2006) Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *J. Exp. Bot.* 57: 1883–1897.
- Chae HS, Faure F, Kieber JJ** (2003) The *eto1*, *eto2*, and *eto3* mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in Arabidopsis by increasing the stability of ACS protein. *Plant Cell* 15: 545-559
- Chen JY, Liu DJ, Jiang YM, Zhao ML, Shan W, Kuang JF, Lu WJ.** (2011) Molecular characterization of a strawberry FaASR gene in relation to fruit ripening. *PLoS One.* 6(9):e24649.
- Cho YH, Yoo SD, Sheen J.** (2006) Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell.* 127(3):579-89.
- Chyi YS, Phillips GC.** (1987) High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lycopersicon* based on conditions favorable for regeneration. *Plant Cell Rep.* 6(2):105-8.
- Ciereszko I, Johansson H, Kleczkowski LA.** (2001) Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in *Arabidopsis*. *Biochem J.* 354(Pt 1):67-72.
- Clausen AR, Girandon L, Ali A, Knecht W, Rozpedowska E, Sandrini MP, Andreasson E, Munch-Petersen B, Piškur J.** (2012) Two thymidine kinases and one multisubstrate deoxyribonucleoside kinase salvage DNA precursors in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J.* 279(20):3889-97.

- Coenen C, Lomax TL.** (1998) The diageotropica gene differentially affects auxin and cytokinin responses throughout development in tomato. *Plant Physiol.* 117(1):63-72.
- Coxon KM, Chakauya E, Ottenhof HH, Whitney HM, Blundell TL, Abell C, Smith AG.** (2005) Pantothenate biosynthesis in higher plants. *Biochem Soc Trans.* 33(Pt 4):743-6.
- Dai JR, Liu B, Feng DR, Liu HY, He YM, Qi KB, Wang HB, Wang JF** (2011) MpAsr encodes an intrinsically unstructured protein and enhances osmotic tolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant Cell Rep.* 30(7):1219-30.
- Dai N, Schaffer A, Petreikov M, Shahak Y, Giller Y, Ratner K, Levine A, Granot D** (1999) Overexpression of Arabidopsis Hexokinase in Tomato Plants Inhibits Growth, Reduces Photosynthesis, and Induces Rapid Senescence. *The Plant Cell* 11: 1253–1266.
- Dayan J, Voronin N, Gong F, Sun T, Hedden P, Fromm H, Aloni R** (2012) Leaf-Induced Gibberellin Signaling Is Essential for Internode Elongation, Cambial Activity, and Fiber Differentiation in Tobacco Stems. *The Plant Cell* 24: 66-79.
- Dekkers B, Schuurmans J, Smeekens S** (2008) Interaction between sugar and abscisic acid signalling during early seedling development in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 67: 151–167.
- Dewitte W, Scofield S, Alcasabas AA, Maughan SC, Menges M, Braun N, Collins C, Nieuwland J, Prinsen E, Sundaresan V, Murray JA** (2007) Arabidopsis CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.*104(36):14537-42.
- Dharmawardhana P, Ren L, Amarasinghe V, Monaco M, Thomason J, Ravenscroft D, McCouch S, Ware D, Jaiswal P** (2013) A genome scale metabolic network for rice and accompanying analysis of tryptophan, auxin and serotonin biosynthesis regulation under biotic stress. *Rice (N Y).* 6(1):15.
- Di Rienzo J** (2009) fgStatistics, versión 2009. Córdoba, Argentina. <http://sites.google.com/site/fgstatistics>.
- Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW** (2008) *InfoStat, versión 2008*, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dóczy R, Kondrák M, Kovács G, Beczner F, Bánfalvi Z.** (2005) Conservation of the drought-inducible DS2 genes and divergences from their ASR paralogues in solanaceous species. *Plant Physiol Biochem.* 43(3):269-76.
- Dubois E, Córdoba-Cañero D, Massot S, Siaud N, Gakière B, Domenichini S, Guérard F, Roldan-Arjona T, Doutriaux MP** (2011) Homologous recombination is stimulated by a decrease in dUTPase in Arabidopsis. *PLoS One.* 6(4):e18658.
- Eden E, Lipson D, Yogev S, Yakhini Z** (2007) Discovering motifs in ranked lists of DNA sequences. *PLoS Comput Biol.* 3(3):e39.

- Ellerstrom M, Stalberg K, Ezcurra I, Rask L** (1996) Functional dissection of a napin gene promoter: identification of promoter elements required for embryo and endosperm-specific transcription. *Plant Mol Biol* 32:1019-1027.
- Evans JR** (2013) Improving photosynthesis. *Plant Physiol.* 162(4):1780-93.
- Eveland A, Jackson D** (2012) Sugars, signalling, and plant development. *J Exp Bot* 63: 3367-3377.
- Expósito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Pérez A, Pérez JA** (2008) Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol.* 8:131.
- Falk A, Feys BJ, Frost LN, Jones JD, Daniels MJ, Parker JE** (1999) EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(6):3292-7.
- Fehlberg V, Vieweg MF, Dohmann EM, Hohnjec N, Puhler A, Perlick AM, Kuster H** (2005) The promoter of the leghaemoglobin gene *VfLb29*: functional analysis and identification of modules necessary for its activation in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots. *J Exp Bot.* 56:799-806.
- Fei Z, Joung JG, Tang X, Zheng Y, Huang M, Lee JM, McQuinn R, Tieman DM, Alba R, Klee HJ, Giovannoni JJ** (2010) Tomato Functional Genomics Database: a comprehensive resource and analysis package for tomato functional genomics. *Nucleic Acids Res.* 39(Database issue):D1156-63.
- Fernandez AI, Viron N, Alhagdow M, Karimi M, Jones M, Amsellem Z, Sicard A, Czerednik A, Angenent G, Grierson D, May S, Seymour G, Eshed Y, Lemaire-Chamley M, Rothan C, Hilson P** (2009) Flexible tools for gene expression and silencing in tomato. *Plant Physiol.* 151(4):1729-40.
- Fernie A, Roscher A, Ratcliffe R, Kruger N** (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* 212: 250-263.
- Fillion L, Ageorges A, Picaud S, Coutos-Thévenot P, Lemoine R, Romieu C, Delrot S** (1999) Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. *Plant Physiol.* 120(4):1083-94.
- Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J, Sonnhammer EL, Tate J, Punta M** (2014) Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res.* 42(Database issue):D222-30.
- Fischer I, Camus-Kulandaivelu L, Allal F, Stephan W** (2011) Adaptation to drought in two wild tomato species: the evolution of the *Asr* gene family. *New Phytol.* 190(4):1032-44.

- Forcat S, Bennett MH, Mansfield JW, Grant MR.** (2008) A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress. *Plant Methods*.4:16.
- Francis D, Halford N** (2006) Nutrient sensing in plant meristems. *Plant Mol Biol* 60: 981-993.
- Frankel N, Hasson E, Iusem N, Rossi M** (2003) Adaptive Evolution of the Water Stress-Induced Gene *Asr2* in *Lycopersicon* Species Dwelling in Arid Habitats. *Molecular Biology and Evolution*. 20:1955-1962.
- Frankel N, Carrari F, Hasson E, Iusem N** (2006) Evolutionary history of the *Asr* gene family. *Gene* 378: 74-83.
- Frankel N, Nunes-Nesi A, Balbo I, Mazuch J, Centeno D, Iusem N, Fernie A, Carrari F** (2007) *ci21A/Asr1* expression influences glucose accumulation in potato tubers. *Plant Mol Biol* 63: 719–730.
- Fridman E, Carrari F, Liu YS, Fernie AR, Zamir D.** (2004) Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science*. 305(5691):1786-9.
- Frith MC** (2011) A new repeat-masking method enables specific detection of homologous sequences. *Nucleic Acids Research* 39(4):e23.
- Frommer W, Mielchen C, Martin T** (1994) Metabolic control of patatin promoters in transgenic tobacco and tomato plants. *Plant Physiology* 13: 329-334.
- Fujisawa M, Shima Y, Higuchi N, Nakano T, Koyama Y, Kasumi T, Ito Y** (2012) Direct targets of the tomato-ripening regulator RIN identified by transcriptome and chromatin immunoprecipitation analyses. *Planta*. 235(6):1107-22.
- Fukushima A, Nishizawa T, Hayakumo M, Hikosaka S, Saito K, Goto E, Kusano M** (2012) Exploring tomato gene functions based on coexpression modules using graph clustering and differential coexpression approaches. *Plant Physiol*. 158(4):1487-502.
- Furuta K, Kubo M, Sano K, Demura T, Fukuda H, Liu YG, Shibata D, Kakimoto T.** (2011) The CKH2/PKL chromatin remodeling factor negatively regulates cytokinin responses in *Arabidopsis* calli. *Plant Cell Physiol*. 52(4):618-28.
- Galili G, Höfgen R.** (2002) Metabolic engineering of amino acids and storage proteins in plants. *Metab Eng*. 4(1):3-11.
- Gallego-Giraldo L, Garcia-Martinez J, Moritz T, Lopez-Diaz I** (2007) Flowering in tobacco needs gibberellins but is not promoted by the levels of active GA1 and GA4 in the apical shoot. *Plant Cell Physiol* 48: 615-625.
- Gan S** (2010) The hormonal regulation of senescence. In Peter Davies, ed, *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*, Ed 3. Springer, pp 597-617.
- García, H. (2008).** Qué es análisis estadístico multivariado. *Revista SIGMA*, 7.

- Gautier H, Diakou-Verdin V, Bénard C, Reich M, Buret M, Bourgaud F, Poëssel JL, Caris-Veyrat C, Génard M** (2008) How does tomato quality (sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance? *J Agric Food Chem.* 56(4):1241-50.
- Ghillebert R, Swinnen E, Wen J, Vandesteene L, Ramon M, Norga K, Rolland F, Winderickx J** (2011) The AMPK / SNF1 / SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation. *FEBS Journal* 278: 3978–3990.
- Giovannoni JJ** (2007) Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Curr Opin Plant Biol.* 10(3):283-9.
- Goldgur Y, Rom S, Ghirlando R, Shkolnik D, Shadrin N, Konrad Z, Bar-Zvi D** (2007) Desiccation and zinc binding induce transition of tomato abscisic acid stress ripening 1, a water stress- and salt stress-regulated plant-specific protein, from unfolded to folded state. *Plant Physiol* 143:617–628
- Golldack D, Li C, Mohan H, Probst N** (2014) Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Front Plant Sci.* 5:151.
- González RM, Ricardi MM, Iusem ND** (2011) Atypical epigenetic mark in an atypical location: cytosine methylation at asymmetric (CNN) sites within the body of a non-repetitive tomato gene. *BMC Plant Biol.* 11(1):94.
- González R, Ricardi M, Iusem N** (2013) Epigenetic marks in an adaptive water stress-responsive gene in tomato roots under normal and drought conditions. *Epigenetics.* 8:864-872.
- Gowik U, Burscheidt J, Akyildiz M, Schlue U, Koczor M, Streubel M, Westhoff P** (2004) cis-Regulatory elements for mesophyll-specific gene expression in the C4 plant *Flaveria trinervia*, the promoter of the C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene. *Plant Cell.* 16:1077-1090.
- Grant CE, Bailey TL, Noble WS** (2011) FIMO: Scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics* 27(7):1017–1018.
- Gregersen P, Holm P, Krupinska K** (2008) Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biology* 10: 37-49.
- Haake V, Cook D, Riechmann JL, Pineda O, Thomashow MF, Zhang JZ** (2002) Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 130(2):639-48.
- Hackel A, Schauer N, Carrari F, Fernie AR, Grimm B, Kühn C.** (2006) Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. *Plant J.* 45(2):180-92.
- Hamamouch N, Li C, Seo PJ, Park CM, Davis EL.** (2011) Expression of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes during nematode infection. *Mol Plant Pathol.* 12(4):355-64.

- Han Y, Wang W, Sun J, Ding M, Zhao R, Deng S, Wang F, Hu Y, Wang Y, Lu Y, Du L, Hu Z, Diekmann H, Shen X, Polle A, Chen S.** (2013) *Populus euphratica* XTH overexpression enhances salinity tolerance by the development of leaf succulence in transgenic tobacco plants. *J Exp Bot.* 64(14):4225-38.
- Hanada K, Sawada Y, Kuromori T, Klausnitzer R, Saito K, Toyoda T, Shinozaki K, Li WH, Hirai MY.** (2011) Functional compensation of primary and secondary metabolites by duplicate genes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Biol Evol.* 28(1):377-82.
- Hanson J, Smeekens S** (2009) Sugar perception and signaling--an update. *Curr Opin Plant Biol* 12: 562-567.
- Hart CM, Fischer B, Neuhaus JM, Meins F Jr.** (1992). Regulated inactivation of homologous gene expression in transgenic *Nicotiana sylvestris* plants containing a defense-related tobacco chitinase gene. *Mol Gen Genet.* 235(2-3):179-88.
- Hashida SN, Takahashi H, Uchimiya H.** (2009) The role of NAD biosynthesis in plant development and stress responses. *Ann Bot.* 103(6):819-24.
- Hayes MA, Davies C, Dry IB.** (2007) Isolation, functional characterization, and expression analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) hexose transporters: differential roles in sink and source tissues. *J Exp Bot.* 58(8):1985-97.
- Henry IM, Carpentier SC, Pampurova S, Van Hoylandt A, Panis B, Swennen R, Remy S** (2011) Structure and regulation of the *Asr* gene family in banana. *Planta.* 234(4):785-98.
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Higo H** (1998) PLACE: a database of plant *cis*-acting regulatory DNA elements. *Nucleic Acids Res.* 26(1):358-9.
- Hille, J., M. Koornneef, M.S. Ramanna and P. Zabel** (1989) Tomato: a crop species amenable to improvement by cellular and molecular methods. *Euphytica* 42: 1–23.
- Hirai T, Kim YW, Kato K, Hiwasa-Tanase K, Ezura H.** (2011) Uniform accumulation of recombinant miraculin protein in transgenic tomato fruit using a fruit-ripening-specific E8 promoter. *Transgenic Res.* 20(6):1285-92.
- Hong SH, Kim IJ, Yang DC, Chung WI.** (2002) Characterization of an abscisic acid responsive gene homologue from *Cucumis melo*. *J Exp Bot.* 53(378):2271-2.
- Hsu YF, Yu SC, Yang CY, Wang CS** (2011) Lily ASR protein-conferred cold and freezing resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 49:937–945
- Hu G, deHart AK, Li Y, Ustach C, Handley V, Navarre R, Hwang CF, Aegerter BJ, Williamson VM, Baker B.** (2005) EDS1 in tomato is required for resistance mediated by TIR-class R genes and the receptor-like R gene *Ve*. *Plant J.* 42(3):376-91.
- Hu W, Huang C, Deng X, Zhou S, Chen L, Li Y, Wang C, Ma Z, Yuan Q, Wang Y, Cai R, Liang X, Yang G, He G.** (2013) TaASR1, a transcription factor gene in wheat, confers drought stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Environ.* 36(8):1449-64.

- Huang JC, Lin SM, Wang CS** (2000) A pollen-specific and desiccation-associated transcript in *Lilium longiflorum* during development and stress. *Plant Cell Physiol* 41:477–485.
- Huerta L, Forment J, Gadea J, Fagoaga C, Peña L, Perez-Amador M, Garcia-Martinez J** (2008) Gene expression analysis in citrus reveals the role of gibberellins on photosynthesis and stress. *Plant, Cell and Environment* 31: 1620–1633.
- Hunziker, Armando T.** 2001. *The Genera of Solanaceae*. A.R.G. Gantner Verlag K.G., Ruggell, Liechtenstein.
- Iqbal N, Nazar R, Iqbal R, Khan M, Masood A, Khan N** (2011) Role of gibberellins in regulation of source–sink relations under optimal and limiting environmental conditions. *Current Science* 100: 998-1007.
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP** (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4(2):249-64.
- Iusem ND, Bartholomew DM, Hitz WD, Scolnik PA.** (1993) Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening. *Plant Physiol.* 102(4):1353-4.
- Jeanneau M, Gerentes D, Foueillassar X, Zivy M, Vidal J, Toppan A, Perez P** (2002) Improvement of drought tolerance in maize: towards the functional validation of the *Zm-Asr1* gene and increase of water use efficiency by over-expressing C4-PEPC. *Biochimie* 84: 1127-1135.
- Jha B, Lal S, Tiwari V, Yadav SK, Agarwal PK.** (2012) The *SbASR-1* gene cloned from an extreme halophyte *Salicornia brachiata* enhances salt tolerance in transgenic tobacco. *Mar Biotechnol* 14(6):782-92.
- Jones, Scott** (1984) *Journal of the American Society for Horticultural Science* 109(3): 318–321.
- Jongbloed U, Szederkenyi J, Hartig K, Schobert C, Komor E** (2004) Sequence of morphological and physiological events during natural ageing and senescence of a castor bean leaf: sieve tube occlusion and carbohydrate back-up precede chlorophyll degradation. *Physiol Plant* 120: 338-346.
- Joo J, Lee YH, Kim YK, Nahm BH, Song SI.** (2013) Abiotic stress responsive rice ASR1 and ASR3 exhibit different tissue-dependent sugar and hormone-sensitivities. *Mol Cells.* 35(5):421-35.
- Kalifa Y, Gilad A, Konrad Z, Zaccari M, Scolnik P, Bar-Zvi D** (2004a) The water- and salt-stress-regulated *Asr1* (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein. *Biochem J* 381: 373–378.
- Kalifa Y, Perlson A, Gilad A, Konrad Z, Scolnik P, Bar-Zvi D** (2004b) Over-expression of the water and salt stress-regulated *Asr1* gene confers an increased salt tolerance. *Plant Cell Environ* 27: 1459-1468.

- Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D, Bohnert HJ** (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* 13, 889-905.
- Kieber J, Schaller G.** (2014) Cytokinins. *The arabidopsis book*. 12: e0168.
- Kim D, Cho YH, Ryu H, Kim Y, Kim TH, Hwang I** (2013) BLH1 and KNAT3 modulate ABA responses during germination and early seedling development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 75(5):755-66.
- Kim IS, Kim YS, Yoon HS** (2012) Rice ASR1 protein with reactive oxygen species scavenging and chaperone-like activities enhances acquired tolerance to abiotic stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cells.* 33(3):285-93.
- Knapp S** (2002) Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. *J Exp Bot.* 53(377):2001-22.
- Klee HJ, Giovannoni JJ** (2011) Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annu Rev Genet.* 45:41-59.
- Konrad Z, Bar-Zvi D** (2008) Synergism between the chaperone-like activity of the stress regulated ASR1 protein and the osmolyte glycine-betaine. *Planta* 227: 1213–1219.
- Kopka J, Schauer N, Krueger S, Birkemeyer C, Usadel B, Bergmueller E, Doermann P, Weckwerth W, Gibon Y, Stitt M, Willmitzer L, Fernie A and Steinhauser D** (2005) GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database, *Bioinformatics* 21: 1635-1638.
- Korfhage U, Trezzini GF, Meier I, Hahlbrock K, Somssich IE** (1994) Plant homeodomain protein involved in transcriptional regulation of a pathogen defense-related gene *Plant Cell* 6:695-708.
- Kühn C** (2011) Sucrose transporters and plant development. *Signaling and communication in plants.* 7: 225-251.
- Lalonde S, Tegeder M, Throne-Holst M, Frommer W, Patrick J** (2003) Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant, Cell and Environment* 26: 37–56.
- Lam E, Chua NH** (1989) ASF-2: A factor that binds to the cauliflower mosaic virus 35S promoter and a conserved GATA motif in cab promoters. *Plant Cell* 1:1147-1156.
- Lamesch P, Berardini TZ, Li D, Swarbreck D, Wilks C, Sasidharan R, Muller R, Dreher K, Alexander DL, Garcia-Hernandez M, Karthikeyan AS, Lee CH, Nelson WD, Ploetz L, Singh S, Wensel A, Huala E** (2012) The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Res.* 40(Database issue):D1202-10.
- Lastdrager J, Hanson J, Smeekens S.** (2014) Sugar signals and the control of plant growth and development. *J Exp Bot.* 65(3):799-807.
- Leggewie G, Kolbe A, Lemoine R, Roessner U, Lytovchenko A, Zuther E, Kehr J, Frommer W, Riesmeier J, Willmitzer L, Fernie A** (2003) Overexpression of the sucrose transporter

SoSUT1 in potato results in alterations in leaf carbon partitioning and in tuber metabolism but has little impact on tuber morphology. *Planta* 217: 158-167.

Leng P, Yuan B, Guo Y, Chen P (2014) The role of abscisic acid in fruit ripening and responses to abiotic stress. *J Exp Bot.* doi: 10.1093/jxb/eru204.

Less H, Angelovici R, Tzi V, Galili G (2011) Coordinated gene net-works regulating Arabidopsis plant metabolism in response to various stresses and nutritional cues. *Plant Cell* 23, 1264–1271.

Li J, Jiang J, Qian Q, Xu Y, Zhang C, Xiao J, Du C, Luo W, Zou G, Chen M, Huang Y, Feng Y, Cheng Z, Yuan M, Chong K (2011) Mutation of Rice BC12/GDD1, Which Encodes a Kinesin-Like Protein That Binds to a GA Biosynthesis Gene Promoter, Leads to Dwarfism with Impaired Cell Elongation. *The Plant Cell* 23: 628–640.

Li J, Jiang D, Zhou H, Li F, Yang J, Hong L, Fu X, Li Z, Liu Z, Li J, Zhuang C. (2011) Expression of RNA-interference/antisense transgenes by the cognate promoters of target genes is a better gene-silencing strategy to study gene functions in rice. *PLoS One.* 6(3):e17444.

Li J, Nie X, Tan JL, Berger F (2013) Integration of epigenetic and genetic controls of seed size by cytokinin in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(38):15479-84.

Li P, Zhou H, Shi X, Yu B, Zhou Y, Chen S, Wang Y, Peng Y, Meyer RC, Smeekens SC, Teng S (2014) The ABI4-induced Arabidopsis ANAC060 transcription factor attenuates ABA signaling and renders seedlings sugar insensitive when present in the nucleus. *PLoS Genet.* 10(3):e1004213.

Li RH, Liu GB, Wang H, Zheng YZ (2013) Effects of Fe³⁺ and Zn²⁺ on the structural and thermodynamic properties of a soybean ASR protein. *Biosci Biotechnol Biochem.* 77(3):475-81.

Liesche J, Martens HJ, Schulz A (2011) Symplasmic transport and phloem loading in gymnosperm leaves. *Protoplasma.* 248(1):181-90.

Lindsay WP, McAlister FM, Zhu Q, He XZ, Droge-Laser W, Hedrick S, Doerner P, Lamb C, Dixon RA (2002) KAP-2, a protein that binds to the H-box in a bean chalcone synthase promoter, is a novel plant transcription factor with sequence identity to the large subunit of human Ku autoantigen. *Plant Mol Biol* 49: 503-514.

Ling MH, Rabara RC, Tripathi P, Rushton PJ, Ge SX (2013) Extending MapMan Ontology to Tobacco for Visualization of Gene Expression. *Dataset Pap Biol.* pii: 706465.

Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc.* (1):387-96.

Liu HY, Dai JR, Feng DR, Liu B, Wang HB, Wang JF (2010) Characterization of a novel plantain Asr gene, MpAsr, that is regulated in response to infection of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense and abiotic stresses. *J Integr Plant Biol.* 52(3):315-23.

- Liu X, Prat S, Willmitzer L, Frommer W** (1990) *Cis* regulatory elements directing tuber-specific and sucrose-inducible expression of a chimeric class I patatin promoter-GUS-gene fusion. *Mol Gen Genet* 223: 401–406.
- Liu Y, Ji X, Zheng L, Nie X, Wang Y** (2013) Microarray Analysis of Transcriptional Responses to Abscisic Acid and Salt Stress in *Arabidopsis thaliana*. *Int J Mol Sci.* 2013 14(5):9979-98.
- Loake GJ, Faktor O, Lamb CJ, Dixon RA** (1992) Combination of H-box [CCTACC(N)7CT] and G-box (CACGTG) *cis* elements is necessary for feed-forward stimulation of a *chalcone synthase* promoter by the phenylpropanoid-pathway intermediate p-coumaric acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 9230-9234.
- Lohse M, Nunes-Nesi A, Krueger P, Nagel A, Hannemann J, Giorgi FM, Childs L, Osorio S, Walther D, Selbig J, Sreenivasulu N, Stitt M, Fernie AR, Usadel B** (2010) Robin: An intuitive wizard application for R-based expression microarray quality assessment and analysis. *Plant Physiology* 153:642-51.
- 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(5):732-7.
- MacMillan** (1997) Biosynthesis of the gibberellin plant hormones. *Natural Product Reports* 14: 221-243.
- Maeda H, Dudareva N.** (2012) The shikimate pathway and aromatic amino Acid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 63:73-105.
- Maskin L, Gudesblat G, Moreno J, Carrari F, Frankel N, Sambade A, Rossi M, Iusem N** (2001) *Plant Science.* 161:739
- Maskin L, Frankel N, Gudesblat G, Demergasso M, Pietrasanta L, Iusem N** (2007) Dimerization and DNA-binding of ASR1, a small hydrophilic protein abundant in plant tissues suffering from water loss. *Biochem Biophys Res Commun* 352: 831-835.
- Maskin L, Maldonado S, Iusem N** (2008) Tomato leaf spatial expression of stress-induced *Asr* genes. *Mol Biol Rep* 35: 501-505.
- Matsukura C, Aoki K, Fukuda N, Mizoguchi T, Asamizu E, Saito T, Shibata D, Ezura H** (2008) Comprehensive resources for tomato functional genomics based on the miniature model tomato micro-tom. *Curr Genomics.* 9(7):436-43.
- Matsuo S, Kikuchi K, Fukuda M, Honda I, Imanishi S** (2012) Roles and regulation of cytokinins in tomato fruit development. *J Exp Bot.* 63(15):5569-79.
- Matzke, Matzke** (1995) How and Why Do Plants Inactivate Homologous (Trans)genes? *Plant Physiol.* 1995 107(3):679-685.
- McAtee P, Karim S, Schaffer R, David K.** (2013) A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation, and ripening. *Front Plant Sci.* 4:79.

- Melis** (2013) Carbon partitioning in photosynthesis. *Curr Opin Chem Biol.* 17(3):453-6.
- Meyer P, Saedler H.** (1996) HOMOLOGY-DEPENDENT GENE SILENCING IN PLANTS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1996 47:23-48.
- Meyer S, Melzer M, Truernit E, Hummer C, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N** (2000) AtSUC3, a gene encoding a new Arabidopsis sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *The Plant Journal* 24: 869-882.
- Meyer S, Lauterbach C, Niedermeier M, Barth I, Sjolund R, Sauer N** (2004) Wounding Enhances Expression of AtSUC3, a Sucrose Transporter from Arabidopsis Sieve Elements and Sink Tissues. *Plant Physiology* 134: 684–693.
- Milone DH, Stegmayer GS, Kamenetzky L, López M, Lee JM, Giovannoni JJ, Carrari F** (2010) *omeSOM: a software for clustering and visualization of transcriptional and metabolite data mined from interspecific crosses of crop plants. *BMC Bioinformatics.* 11:438.
- Minagawa J.** (2013) Dynamic reorganization of photosynthetic supercomplexes during environmental acclimation of photosynthesis. *Front Plant Sci.* 4:513.
- Mondolot L, La Fisca P, Buatois B, Talansier E, de Kochko A, Campa C.** (2006) Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during *Coffea canephora* leaf development. *Ann Bot.* 98(1):33-40.
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng W, Liu Y, Hwang I, Jones T, Sheen J** (2003) Role of the Arabidopsis Glucose Sensor HXK1 in Nutrient, Light and Hormonal Signaling. *Science* 300: 332-336.
- Moore S, Payton P, Wright M, Tanksley S, Giovannoni J.** (2005) Utilization of tomato microarrays for comparative gene expression analysis in the Solanaceae. *J Exp Bot.* 56(421):2885-95.
- Mukherjee S, David A, Yadav S, Baluška F, Bhatla SC.** (2014) Salt stress-induced seedling growth inhibition coincides with differential distribution of serotonin and melatonin in sunflower seedling roots and cotyledons. *Physiol Plant.* doi: 10.1111/ppl.12218.
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497.
- Nagata T, Nemoto Y, Hasezawa S** (1992) Tobacco BY-2 Cell Line as the “HeLa” Cell in the Cell Biology of Higher Plants. In: Kwang, WJ.; Martin, F., editors. *International Review of Cytology.* Academic Press, p. 1-30.
- Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, Boller T, Jones JD.** (2004) The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol.* 135(2):1113-28.
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Lytovchenko A, Smith AM, Loureiro ME, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR** (2005) Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence

of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiol.* 137(2):611-22.

Nuruzzaman M, Sharoni AM, Kikuchi S. (2013) Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Front Microbiol.* 4:248.

Obata T, Fernie AR (2012) The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cell Mol Life Sci.* 69(19):3225-43.

Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M (1999) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 27(1):29-34.

Okabe Y, Ariizumi T, Ezura H (2013) Updating the Micro-Tom TILLING platform. *Breed Sci.* 63(1):42-8.

Okada T, Endo M, Singh MB, Bhalla PL (2005) Analysis of the histone H3 gene family in *Arabidopsis* and identification of the male-gamete-specific variant AtMGH3. *Plant J.* 44(4):557-68.

Okumoto S, Pilot G. (2011) Amino acid export in plants: a missing link in nitrogen cycling. *Mol Plant.* 4(3):453-63.

Ozaki S, Ogata Y, Suda K, Kurabayashi A, Suzuki T, Yamamoto N, Iijima Y, Tsugane T, Fujii T, Konishi C, Inai S, Bunsupa S, Yamazaki M, Shibata D, Aoki K (2010) Coexpression analysis of tomato genes and experimental verification of coordinated expression of genes found in a functionally enriched coexpression module. *DNA Res* 17: 105–116.

Paparelli E, Parlanti S, Gonzali S, Novi G, Mariotti L, Ceccarelli N, van Dongen JT, Kölling K, Zeeman SC, Perata P. (2013) Nighttime sugar starvation orchestrates gibberellin biosynthesis and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 25(10):3760-9.

Paul MJ, Foyer CH (2001) Sink regulation of photosynthesis. *J Exp Bot* 52: 1383-1400.

Perez-Diaz J, Wu TM, Perez-Diaz R, Ruiz-Lara S, Hong CY, Casaretto JA (2014) Organ- and stress-specific expression of the ASR genes in rice. *Plant Cell Rep* 33(1):61–73

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.

Pfaffl MW, Tichopád A, Prgomet C, Neuvians T (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 26: 509-515.

Philippe R, Courtois B, McNally KL, Mournet P, El-Malki R, Le Paslier MC, Fabre D, Billot C, Brunel D, Glaszmann JC, This D (2010) Structure, allelic diversity and selection of *Asr* genes, candidate for drought tolerance, in *Oryza sativa* L. and wild relatives. *Theor Appl Genet.* 121(4):769-87.

Pickett FB, Meeks-Wagner DR (1995) Seeing double: appreciating genetic redundancy. *Plant Cell.* 7(9):1347-56.

- Pourtau N, Mares M, Purdy S, Quentin N, Ruel A, Wingler A** (2004) Interactions of abscisic acid and sugar signalling in the regulation of leaf senescence. *Planta* 219: 765–772.
- Putri SP, Nakayama Y, Matsuda F, Uchikata T, Kobayashi S, Matsubara A, Fukusaki E** (2013) Current metabolomics: practical applications. *J Biosci Bioeng.* 115(6):579-89.
- Quadrana L, Rodriguez MC, López M, Bermúdez L, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Descalzo A, Asis R, Rossi M, Asurmendi S, Carrari F** (2011) Coupling virus-induced gene silencing to exogenous green fluorescence protein expression provides a highly efficient system for functional genomics in Arabidopsis and across all stages of tomato fruit development. *Plant Physiol.* 156(3):1278-91.
- Reuscher S, Akiyama M, Yasuda T, Makino H, Aoki K, Shibata D, Shiratake K** (2014) The sugar transporter inventory of tomato: genome-wide identification and expression analysis. *Plant Cell Physiol.* 55(6):1123-41.
- Reyes JC, Muro-Pastor MI, Florencio FJ** (2004) The GATA family of transcription factors in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol.* 134: 1718-1732.
- Ribeiro DM, Araújo WL, Fernie AR, Schippers JH, Mueller-Roeber B** (2012) Action of gibberellins on growth and metabolism of Arabidopsis plants associated with high concentration of carbon dioxide. *Plant Physiol.* 160(4):1781-94.
- Ricardi MM, Guaimas FF, González RM, Burrieza HP, López-Fernández MP, Jares-Erijman EA, Estévez JM, Iusem ND** (2012) Nuclear import and dimerization of tomato ASR1, a water stress-inducible protein exclusive to plants. *PLoS One.* 7(8):e41008.
- Ricardi MM, González RM, Zhong S, Domínguez PG, Duffy T, Turjanski PG, Salgado Salter JD, Alleva K, Carrari F, Giovannoni JJ, Estévez JM, Iusem ND** (2014) Genome-wide data (ChIP-seq) enabled identification of cell wall-related and aquaporin genes as targets of tomato ASR1, a drought stress-responsive transcription factor. *BMC Plant Biol.* 14:29.
- Riccardi F, Gazeau P, de Vienne D, Zivy M** (1998) Protein changes in response to progressive water deficit in maize: quantitative variation and polypeptide identification. *Plant Physiol.* 117:1253–1263.
- Riha K, Watson JM, Parkey J, Shippen DE** (2002) Telomere length deregulation and enhanced sensitivity to genotoxic stress in Arabidopsis mutants deficient in Ku70. *EMBO J.* 21(11):2819-26.
- Ritala A, Dong L, Imseng N, Seppänen-Laakso T, Vasilev N, van der Krol S, Rischer H, Maaheimo H, Virkki A, Brändli J, Schillberg S, Eibl R, Bouwmeester H, Oksman-Caldentey KM** (2014) Evaluation of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1) hairy roots for the production of geraniol, the first committed step in terpenoid indole alkaloid pathway. *J Biotechnol.* 176:20-8.

- Roach, Wulff** (1987) Maternal effects in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 209-235.
- Rocha-Sosa M, Sonnewald U, Frommer W, Stratmann M, Schell J, Willmitzer I** (1989) Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *The EMBO Journal* 8:23-29.
- Roessner U, Wagner C, Kopka J, Trethewey RN, Willmitzer L** (2000) Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant J.* 23(1):131-42.
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J** (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57: 675-709.
- Rom S, Gilad A, Kalifa Y, Konrad Z, Karpasas M, Goldgur Y, Bar-Zvi D** (2006) Mapping the DNA- and zinc-binding domains of ASR1 (abscisic acid stress ripening), an abiotic-stress regulated plant specific protein. *Biochimie* 88: 621–628.
- Ross EJ, Stone JM, Elowsky CG, Arredondo-Peter R, Klucas RV, Sarath G** (2004) Activation of the *Oryza sativa* non-symbiotic haemoglobin-2 promoter by the cytokinin-regulated transcription factor, ARR1. *J Exp Bot.* 55: 1721-1731.
- Rossi M, Lijavetzky D, Bernacchi D, Iusem N** (1996) Asr genes belong to a tomato gene family of at least three closely linked loci located to chromosome 4. *Molecular and general genetics.* 252:489-492.
- Rossi M, Carrari F, Cabrera-Ponce J, Vazquez-Rovere C, Herrera-Estrella L, Gudesblast G, Iusem N.** (1998) Analysis of an ABA-responsive gene promoter belonging to the Asr tomato gene family in homologous and heterologous systems. *Molecular and general genetics.* 258:1-8.
- Rubio S, Whitehead L, Larson TR, Graham IA, Rodriguez PL** (2008) The coenzyme a biosynthetic enzyme phosphopantetheine adenyltransferase plays a crucial role in plant growth, salt/osmotic stress resistance, and seed lipid storage. *Plant Physiol.* 148(1):546-56.
- Rubio V, Linhares F, Solano R, Martin AC, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J** (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.* 15: 2122-2133.
- Rubio-Somoza I, Martinez M, Abraham Z, Diaz I, Carbonero P** (2006) Ternary complex formation between HvMYBS3 and other factors involved in transcriptional control in barley seeds. *Plant J.* 47: 269-281.
- Ruijter J, Ramakers C, Hoogaars W, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff M, Moorman A** (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 37: e45.

- Saibo NJ, Lourenço T, Oliveira MM** (2009) Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Ann Bot.* 103(4):609-23.
- Sakai H, Aoyama T, Oka A.** Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators (2000) *Plant J.* 24: 703-711.
- Samach A, Onouchi H, Gold SE, Ditta GS, Schwarz-Sommer Z, Yanofsky MF, Coupland G** (2000) Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of Arabidopsis. *Science.* 288(5471):1613-6.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Ed 2. Coldspring Harbor Laboratory Press, Coldspring Harbor.
- Sanchez-Bel P, Egea I, Sanchez-Ballesta MT, Sevillano L, Del Carmen Bolarin M, Flores FB** (2012) Proteome changes in tomato fruits prior to visible symptoms of chilling injury are linked to defensive mechanisms, uncoupling of photosynthetic processes and protein degradation machinery. *Plant Cell Physiol.* 53(2):470-84.
- Sandal NN, Bojzen K, Marcker KA** (1987) A small family of nodule specific genes from soybean. *Nucleic Acids Res.* 15:1507-1519.
- Särkinen T, Bohs L, Olmstead RG, Knapp S.** (2013) A phylogenetic framework for evolutionary study of the nightshades (Solanaceae): a dated 1000-tip tree. *BMC Evol Biol.* 13:214.
- Sarry JE, Kuhn L, Ducruix C, Lafaye A, Junot C, Hugouvieux V, Jourdain A, Bastien O, Fievet JB, Vailhen D, Amekraz B, Moulin C, Ezan E, Garin J, Bourguignon J** (2006) The early responses of Arabidopsis thaliana cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics.* 6(7):2180-98.
- Saumonneau A, Agasse A, Bidoyen M, Lallemand M, Cantereau A, Medici A, Laloï M, Atanassova R** (2008) Interaction of grape ASR proteins with a DREB transcription factor in the nucleus. *FEBS Lett* 582: 3281-3287.
- Saumonneau A, Laloï M, Lallemand M, Rabot A, Atanassova R** (2012) Dissection of the transcriptional regulation of grape ASR and response to glucose and abscisic acid. *J Exp Bot* 63: 1495-1510.
- Schauer N, Fernie AR.** (2006) Plant metabolomics: towards biological function and mechanism. *Trends Plant Sci.* 11(10):508-16.
- Scholthof KB.** (2004) Tobacco mosaic virus: a model system for plant biology. *Annu Rev Phytopathol.* 42:13-34.
- Schunmann PH, Richardson AE, Smith FW, Delhaize E** (2004a) Characterization of promoter expression patterns derived from the Pht1 phosphate transporter genes of barley (*Hordeum vulgare L.*) *J Exp Bot.* 55: 855-865.

- Schunmann PH, Richardson AE, Vickers CE, Delhaize E.** (2004b) Promoter analysis of the barley Pht1;1 phosphate transporter gene identifies regions controlling root expression and responsiveness to phosphate deprivation. *Plant Physiol.* 136: 4205-4214.
- Seymour GB, Manning K, Eriksson EM, Popovich AH, King GJ** (2002) Genetic identification and genomic organization of factors affecting fruit texture. *J Exp Bot.* 53(377):2065-71.
- Seymour GB, Østergaard L, Chapman NH, Knapp S, Martin C.** (2013) Fruit development and ripening. *Annu Rev Plant Biol.* 64:219-41.
- Shachar-Hill Y.** (2013) Metabolic network flux analysis for engineering plant systems. *Curr Opin Biotechnol.* 24(2):247-55.
- Sheehy RE, Kramer M, Hiatt WR** (1988) Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(23):8805-9.
- Sheen J** (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* 2: 1027-1038.
- Shen B, Allen WB, Zheng P, Li C, Glassman K, Ranch J, Nubel D, Tarczynski MC** (2010) Expression of ZmLEC1 and ZmWRI1 increases seed oil production in maize. *Plant Physiol.* 153(3):980-7.
- Siemianowski O, Barabasz A, Kendziorek M, Ruszczynska A, Bulska E, Williams LE, Antosiewicz DM** (2014) HMA4 expression in tobacco reduces Cd accumulation due to the induction of the apoplastic barrier. *J Exp Bot.* 65(4):1125-39.
- Sierro N, Battey JN, Ouadi S, Bakaher N, Bovet L, Willig A, Goepfert S, Peitsch MC, Ivanov NV** (2014) The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nat Commun.* 5:3833. doi: 10.1038/ncomms4833.
- Singh KB** (1998) Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control. *Plant Physiol.* 118(4):1111-20.
- Slewinski TL** (2011) Diverse functional roles of monosaccharide transporters and their homologs in vascular plants: a physiological perspective. *Mol Plant* 4: 641-662.
- Snustad DP, Haas NA, Kopczak SD, Silflow CD.** (1992) The small genome of *Arabidopsis* contains at least nine expressed beta-tubulin genes. *Plant Cell.* 4(5):549-56.
- Soitamo AJ, Jada B, Lehto K** (2012) Expression of geminiviral AC2 RNA silencing suppressor changes sugar and jasmonate responsive gene expression in transgenic tobacco plants. *BMC Plant Biol.* 12:204.
- Somerville C, Somerville S** (1999) Plant functional genomics. *Science.* 285(5426):380-3.
- Springer PS, Holding DR, Groover A, Yordan C, Martienssen RA** (2000) The essential Mcm7 protein PROLIFERA is localized to the nucleus of dividing cells during the G(1) phase and is required maternally for early *Arabidopsis* development. *Development.* 127(9):1815-22.

- Srivastava A, Gupta AK, Datsenka T, Mattoo AK, Handa AK** (2010) Maturity and ripening-stage specific modulation of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit transcriptome. *GM Crops*. 1(4):237-49.
- Staniek A, Bouwmeester H, Fraser PD, Kayser O, Martens S, Tissier A, van der Krol S, Wessjohann L, Warzecha H** (2013) Natural products - modifying metabolite pathways in plants. *Biotechnol J*. 8(10):1159-71.
- Stein H, Honig A, Miller G, Erster O, Eilenberg H, Csonka LN, Szabados L, Koncz C, Zilberstein A** (2011) Elevation of free proline and proline-rich protein levels by simultaneous manipulations of proline biosynthesis and degradation in plants. *Plant Sci*. 181(2):140-50.
- Stitt M** (2013) Progress in understanding and engineering primary plant metabolism. *Curr Opin Biotechnol*. 24(2):229-38.
- Stougaard J, Jorgensen JE, Christensen T, Kuhle A, Marcker KA** (1990) Interdependence and nodule specificity of cis-acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin *lbc3* and *N23* gene promoters. *Mol Gen Genet*. 220: 353-360.
- Sturm A, Tang GQ** (1999) The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci*. 4(10):401-407.
- Sun L, van Nocker S** (2010) Analysis of promoter activity of members of the PECTATE LYASE-LIKE (PLL) gene family in cell separation in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol*. 10:152.
- Swartzberg D, Hanael R, Granot D** (2011) Relationship between hexokinase and cytokinin in the regulation of leaf senescence and seed germination. *Plant Biol*. 13(3):439-44.
- Swiedrych A, Lorenc-Kukuła K, Skiryecz A, Szopa J.** (2004) The catecholamine biosynthesis route in potato is affected by stress. *Plant Physiol Biochem*. 42:593-600.
- Takasaki H, Mahmood T, Matsuoka M, Matsumoto H, Komatsu S** (2008) Identification and characterization of a gibberellin-regulated protein, which is ASR5, in the basal region of rice leaf sheaths. *Mol Genet Genomics* 279:359–370
- Taniguchi M, Sasaki N, Tsuge T, Aoyama T, Oka A** (2007) ARR1 directly activates cytokinin response genes that encode proteins with diverse regulatory functions. *Plant Cell Physiol*. 48(2):263-77.
- Taylor CM, Karunaratne CV, Xie N.** (2012) Glycosides of hydroxyproline: some recent, unusual discoveries. *Glycobiology*. 22(6):757-67.
- Terzaghi WB, Cashmore AR** (1995) Light-regulated transcription. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46:445-474.
- Thelen JJ, Ohlrogge JB.** (2002) Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants. *Metab Eng*. 4(1):12-21.

- Thimm O, Blaesing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller LA, Rhee SY and M Stitt** (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.* 37(6):914-39.
- Thomma BP, Eggermont K, Penninckx IA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BP, Broekaert WF** (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(25):15107-11.
- Thomma BP, Eggermont K, Tierens KF, Broekaert WF** (1999) Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 121(4):1093-102.
- Tomato Genome Consortium** (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature.* 485(7400):635-41.
- Toubiana D, Fernie AR, Nikoloski Z, Fait A** (2013) Network analysis: tackling complex data to study plant metabolism. *Trends Biotechnol.* 31(1):29-36.
- Tumer NE, O'connell KM, Nelson RS, Sanders PR, Beachy RN, Fraley RT, Shah DM** (1987) Expression of alfalfa mosaic virus coat protein gene confers cross-protection in transgenic tobacco and tomato plants. *EMBO J.* 6(5):1181-8.
- Turgeon R, Wolf S** (2009) Phloem transport: cellular pathways and molecular trafficking. *Annu Rev Plant Biol* 60: 207-221.
- Truernit E, Siemerling KR, Hodge S, Grbic V, Haseloff J** (2006) A map of KNAT gene expression in the *Arabidopsis* root. *Plant Mol Biol.* 60(1):1-20.
- Tsai AY, Gazzarrini S** (2014) Trehalose-6-phosphate and SnRK1 kinases in plant development and signaling: the emerging picture. *Front Plant Sci.* 5:119.
- Twyman, RM.** Host plants, Systems and Expression Strategies for Molecular Farming. (2006) In: Fischer R, Schillberg S, editors. *Molecular Farming: Plant-Made Pharmaceuticals and Technical Proteins.* John Wiley & Sons; p. 338.
- Tzin V, Galili G.** (2010) New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Mol Plant.* 3(6):956-72.
- Ueda A, Yamamoto-Yamane Y, Takabe T.** (2007) Salt stress enhances proline utilization in the apical region of barley roots. *Biochem Biophys Res Commun.* 355(1):61-6.
- Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG** (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115.
- Vaidyanathan, R., Kuruvilla, S., and Thomas, G.** (1999). Characterization and expression pattern of an abscisic acid and osmotic stress responsive gene from rice. *Plant Sci.* 140, 21-30.
- Van der Hoeven R, Ronning C, Giovannoni J, Martin G and Tanksley S** (2002) Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on

analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *Plant Cell* 14: 1441–1456.

Van Leeuwen W, Ruttink T, Borst-Vreessen AW, van der Plas LH, van der Krol AR (2001) Characterization of position-induced spatial and temporal regulation of transgene promoter activity in plants. *J Exp Bot.* 52(358):949-59.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3(7):RESEARCH0034.

Varbanova M, Yamaguchi S, Yang Y, McKelvey K, Hanada A, Borochoy R, Yu F, Jikumaru Y, Ross J, Cortes D, Ma CJ, Noel JP, Mander L, Shulaev V, Kamiya Y, Rodermeil S, Weiss D, Pichersky E. (2007) Methylation of gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell.* 19(1):32-45.

Vaucheret H, Béclin C, Fagard M. (2001) Post-transcriptional gene silencing in plants. *J Cell Sci.* 114:3083-91.

Vieweg MF, Fruhling M, Quandt HJ, Heim U, Baumlein H, Puhler A, Kuster H, Andreas MP. (2004) The promoter of the *Vicia faba* L. leghemoglobin gene VfLb29 is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants. *Mol Plant Microbe Interact.* 17: 62-69.

Vignault C, Vachaud M, Cakir B, Glissant D, Dedaldechamp F, Buttner M, Atanassova R, Fleurat-Lessard P, Lemoine R, Delrot S (2005) VvHT1 encodes a monosaccharide transporter expressed in the conducting complex of the grape berry phloem. *J Exp Bot* 56: 1409-1418.

Virlouvet L, Jacquemot M, Gerentes D, Corti H, Bouton S, Gilard F, Valot B, Trouverie J, Tcherkez G, Falque M, Damerval C, Rogowsky P, Perez P, Noctor G, Zivy M, Coursol S (2011) The ZmASR1 protein influences branched-chain amino acid biosynthesis and maintains kernel yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiol* 157: 917-936.

Wagner U, Edwards R, Dixon DP, Mauch F (2002) Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Mol Biol.* 49(5):515-32.

Wang (2004). Lipid signaling. *Curr.Opin. PlantBiol.* 7; 329–336.

Wang C, Liu Z. (2006) *Arabidopsis* ribonucleotide reductases are critical for cell cycle progression, DNA damage repair, and plant development. *Plant Cell.* 18(2):350-65.

Wang H-J, Hsu C-M, Jauh GY, Wang C-S (2005) A lily pollen ASR protein localizes to both cytoplasm and nuclei requiring a nuclear localization signal. *Physiol Plant* 123:314–320

Wang Y, Li B, Qin G, Li L, Tian S (2011) Defense response of tomato fruit at different maturity stages to salicylic acid and ethephon. *Scientia Horticulturae* 129:183–188.

- Welinder KG, Justesen AF, Kjaersgård IV, Jensen RB, Rasmussen SK, Jespersen HM, Duroux L** (2002) Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem.* 269(24):6063-81.
- Welti R, Shah J, Li W, Li M, Chen J, Burke JJ, Fauconnier ML, Chapman K, Chye ML, Wang X** (2007). Plant lipidomics: discerning biological function by profiling plant complex lipids using mass spectrometry. *Front.Biosci.* 12:2494–2506.
- Wieczorek K, Golecki B, Gerdes L, Heinen P, Szakasits D, Durachko DM, Cosgrove DJ, Kreil DP, Puzio PS, Bohlmann H, Grundle FM** (2006) Expansins are involved in the formation of nematode-induced syncytia in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 48(1):98-112.
- Willis DM, Loewy AP, Charlton-Kachigian N, Shao JS, Ornitz DM, Towler DA** (2002) Regulation of osteocalcin gene expression by a novel Ku antigen transcription factor complex. *J Biol Chem.*277(40):37280-91.
- Wingler A, Delatte T, O'Hara L, Primavesi L, Jhurrea D, Paul M, Schluempmann H** (2012) Trehalose 6-phosphate is required for the onset of leaf senescence associated with high carbon availability. *Plant Physiol* 158: 1241-1251.
- Wormit A, Trentmann O, Feifer I, Lohr C, Tjaden J, Meyer S, Schmidt U, Martinoia E, Neuhaus HE** (2006) Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from *Arabidopsis* involved in vacuolar sugar transport. *Plant Cell* 18: 3476-3490.
- Wu F, Tanksley SD** (2010) Chromosomal evolution in the plant family *Solanaceae*. *BMC Genomics.* 11:182.
- Wubs AM, Ma Y, Heuvelink E, Marcelis LF** (2009) Genetic differences in fruit-set patterns are determined by differences in fruit sink strength and a source: sink threshold for fruit set. *Ann Bot.* 104(5):957-64.
- Xia B, Feng M, Xu G, Xu J, Li S, Chen X, Ding L, Zhou Y** (2014) Investigation of the Chemical Compositions in Tobacco of Different Origins and Maturities at Harvest by GC-MS and HPLC-PDA-QTOF-MS. *J Agric Food Chem.* 62(22):4979-87.
- Xu Z, Nakajima M, Suzuki Y, Yamaguchi I** (2002) Cloning and Characterization of the Abscisic Acid-Specific Glucosyltransferase Gene from Adzuki Bean Seedlings. *Plant Physiology* 129: 1285–1295.
- Yamaguchi S** (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol* 59: 225-251.
- Yanagisawa S** (2000) Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *Plant J* 21:281-288.
- Yanagisawa S, Schmidt RJ** (1999) Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *Plant J* 17:209-214.

- Yang C, Chen Y, Jauh G, Wang C** (2005) A lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol* 139: 836-846.
- Yang CY, Wu CH, Jauh GY, Huang JC, Lin CC, Wang CS** (2008) The LLA23 protein translocates into nuclei shortly before desiccation in developing pollen grains and regulates gene expression in Arabidopsis. *Protoplasma* 233:241–254
- Yi H, Sardesai N, Fujinuma T, Chan CW, Veena, Gelvin SB** (2006) Constitutive expression exposes functional redundancy between the Arabidopsis histone H2A gene HTA1 and other H2A gene family members. *Plant Cell*. 18(7):1575-89.
- Yang L, Zheng B, Mao C, Qi X, Liu F, Wu P** (2004). Analysis of transcripts that are differentially expressed in three sectors of the rice root system under water deficit. *Mol. Genet. Genomics* 272:433-442.
- Yoshida S, Ito M, Nishida I, Watanabe A** (2002) Identification of a novel gene HYS1/CPR5 that has a repressive role in the induction of leaf senescence and pathogen-defence responses in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* 29: 427-437.
- Yu EY, Kim SE, Kim JH, Ko JH, Cho MH, Chung IK** (2000) Sequence-specific DNA recognition by the Myb-like domain of plant telomeric protein RTBP1. *J Biol Chem*. 275(31):24208-14.
- Yu LM, Lamb CJ, Dixon RA** (1993) Purification and biochemical characterization of proteins which bind to the H-box cis-element implicated in transcriptional activation of plant defense genes. *Plant J* 3: 805-816.
- Zagorchev L, Kamenova P, Odjakova M** (2014) The Role of Plant Cell Wall Proteins in Response to Salt Stress. *The Scientific World Journal*. Volume 2014 (2014), Article ID 764089. doi: 10.1155/2014/764089.
- Zegzouti H, Jones B, Frasse P, Marty C, Maitre B, Latch A, Pech JC, Bouzayen M** (1999) Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display. *Plant J*. 18:589-600.
- Zhang X, Fowler SG, Cheng H, Lou Y, Rhee SY, Stockinger EJ, Thomashow MF** (2004) Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant Arabidopsis. *Plant J*. 39:905-19.
- Zhang Z, Thomma BP** (2014) Virus-induced gene silencing and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transient expression in *Nicotiana tabacum*. *Methods Mol Biol*. 1127:173-81.

Resumen

El estudio del control del metabolismo primario en general y del metabolismo de azúcares en particular es esencial para la mejora de especies de interés agronómico. Se ha probado que un miembro de la familia génica *Asr* (*ABA*, *stress*, *ripening*) participa en el control del transporte de azúcares en uva a través de la regulación de la expresión de un transportador de hexosas, *Ht1*. A su vez, se ha probado que la expresión de estos genes aumenta bajo distintas condiciones de estrés en numerosas especies. La hipótesis de esta Tesis es que las proteínas ASR regulan la expresión de transportadores de azúcares y consecuentemente el tráfico de asimilados. El objetivo general fue evaluar desde un punto de vista bioquímico, fisiológico y molecular plantas de tabaco y de tomate que sobreexpresan y silencian *Asr1*.

El silenciamiento de *Asr1* en plantas de tabaco produce un aumento de los niveles de glucosa en las hojas y una disminución de los niveles del transportador de hexosas *Ht1*. Asimismo las plantas poseen alteraciones en los niveles del ácido abscísico y de las giberelinas. Estas alteraciones redundan en hojas maduras necróticas y un acortamiento de los entrenudos. A través del análisis de las líneas silenciadas no sólo se probó la relación de ASR1 con el metabolismo de azúcares sino que además se estableció que esta proteína tiene un rol en la respuesta a giberelinas en las plantas de tabaco. Además se propuso que la interacción entre las vías de las hormonas y de los azúcares está mediada por la hexoquinasa 1 y *SnRk1*.

Por otro lado, la caracterización de tomates transgénicos reveló aspectos distintos de la función de ASR1. El principal efecto metabólico de ASR1 en frutos de tomate es sobre el metabolismo de los aminoácidos. A diferencia de lo observado en otras especies, las plantas silenciadas y sobreexpresantes no mostraron alteraciones en los niveles de hexosas ni de sus transportadores, tanto en frutos como en hojas. Análisis de microarreglos de ARNm revelaron que ASR1 reprime genes de respuesta a estrés en los frutos de tomate, a diferencia de lo observado en las hojas de esta especie y en tabaco. Esto sugiere que ASR1 tendría un rol dual en cuanto al control de la transcripción de genes asociados a estrés, que dependería del tejido. En los frutos de plantas que crecen en condiciones naturales, este rol favorecería la dispersión de las semillas a partir del aumento de la susceptibilidad a microorganismos. A su vez, ASR1 estaría involucrado en la maduración del fruto a través del control de la expresión de genes del metabolismo de la pared celular y de la vía de las citoquininas. En este sentido, los análisis presentados en esta Tesis aportan evidencias del rol de ASR1 sobre la modulación de la expresión del gen *ku70*, involucrado en la reparación del ADN, que a su vez regularía la expresión de genes involucrados en el metabolismo de la pared celular tal como la expansina A15. ASR1

modularía también de manera indirecta la expresión de ARR1, un factor de transcripción involucrado en la respuesta primaria a citoquininas.

Esta Tesis aporta nuevos conocimientos sobre el rol de ASR1 respecto de su papel en la determinación de las relaciones fuente-destino y la mediación de la respuesta a las giberelinas en plantas de tabaco. Por otro lado, se estableció que la proteína ASR1 está relacionada con el metabolismo de aminoácidos en los frutos de tomate y que su rol en la regulación de la transcripción en frutos sería opuesto a lo descrito en hojas.