



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Nuevas aproximaciones al estudio del metabolismo de los esteroides en tomate

Julio Bonilla Jaime

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Tesis Doctoral

NUEVAS APROXIMACIONES AL ESTUDIO DEL METABOLISMO DE LOS ESTEROLES EN TOMATE

Julio Bonilla

# NUEVAS APROXIMACIONES AL ESTUDIO DEL METABOLISMO DE LOS ESTEROLES EN TOMATE

Julio Bonilla Jaime  
Tesis Doctoral, 2015

NUEVAS APROXIMACIONES AL ESTUDIO DEL  
METABOLISMO DE LOS ESTEROLES EN  
TOMATE.

Julio Bonilla Jaime

Barcelona, 2015



Universidad de Barcelona  
Facultad de Biología  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



Programa doctoral de Biotecnología

## Nuevas aproximaciones al estudio del metabolismo de los esteroles en tomate.

Memoria presentada por Julio Bonilla Jaime, licenciado en Biología, para optar por el  
grado de doctor por la Universidad de Barcelona.

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,  
Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona y el Centro de Investigación en  
Agrigenómica (CRAG).

Director de tesis

Autor

Albert Boronat Margosa

Julio Bonilla Jaime



## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi esposa, mis hijas, mis padres y mis hermanos. Valeria, tú has sido el pilar fundamental en este largo viaje que hemos logrado caminar juntos. Tú, junto a mis hijas son el motor que me impulsa a seguir adelante y ser mejor cada día. Aunque este proyecto no fue fácil, siempre te tuve a mi lado dándome apoyo para lograr cumplir este duro objetivo. Te lo agradezco muchísimo mi amor. Mis padres, Uds. han sido la base de mi formación y son quienes me impulsaron a seguir creciendo como persona y profesional, gracias a Uds. hoy estoy aquí, les agradezco por todo el trabajo y sacrificio que han hecho por mí. Y a mis hermanos, ese brazo amigo e incondicional que solo sabe empujar hacia adelante con palabras de aliento que nunca dejan de animar.





## **AGRADECIMIENTO**

Es difícil agradecer a todas las personas que me han ayudado a lo largo de este trabajo, pero hay muchas que han sido muy importantes. Quiero empezar agradeciendo a todos mis amigos del CRAG, donde conocí grandes personas y logre entablar amistades inolvidables no solo en lo laboral, sino en lo personal. También quiero agradecer de manera muy especial a mis amigos del laboratorio de GMP, los "Boros": Irini, Francesc, Karel, Carmen e Idalia; por haberme abierto los brazos y haberme enseñado un sin número de cosas que me ayudaron a llegar hasta el final. Por todos esos grandes momentos que hemos vivido dentro y fuera del laboratorio. A mi tutor Albert Boronat, por su ayuda y paciencia para completar este trabajo. Y por último, pero no menos importante y de forma muy particular y extraordinaria:

A Francesc, por ser un gran amigo y muchas veces ser un profesor particular.

A todos les agradezco no solo por haberme ayudado a terminar esta etapa de mi vida, sino por estar presentes aportando buenas cosas a mi vida.

¡Muchísimas gracias a todos!



## CONTENIDO

<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>VII</b>
<b>Lista de Tablas</b> .....	<b>XI</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.    Introducción .....	3
1.1.    Importancia del tomate como alimento y en la economía mundial.....	3
1.2.    Tomate como modelo de estudio del metabolismo vegetal .....	5
1.3.    Biosíntesis y función de isoprenoides.....	7
1.4.    Ruta metabólica del mevalonato .....	11
1.5.    Importancia de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa en la biosíntesis de isoprenoides .....	11
1.6.    Biosíntesis y función de los esteroides vegetales .....	13
1.7.    Regulación del estigmasterol y $\beta$ -sitosterol mediante la esteroil-C22-desaturasa de <i>S. lycopersicum</i> .....	18
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.    Objetivos .....	23
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
3.    Resultados.....	27
3.1.    OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE TOMATE ( <i>S. LYCOPERSICUM</i> VAR. MICRO-TOM) AFECTADAS EN LA EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA SÍNTESIS Y EL METABOLISMO DE ESTEROLES.....	27
3.1.1.    Identificación y amplificación de los cDNAs correspondientes a la isoforma 2 de la HMG-CoA reductasa y la esteroil C22 desaturasa de tomate. ....	27

3.1.2. Generación de secuencias que codifican amiRNAs para el silenciamiento de HMGR2 y SD. ....	28
3.1.3. Construcción de vectores para la sobreexpresión y silenciamiento de la isoforma 2 de la HMG-CoA reductasa y la esterol C22 desaturasa de tomate. ....	30
3.1.4. Generación de plantas de tomate transgénicas para la sobreexpresión y silenciamiento de HMGR2 y SD. ....	33
3.1.5. Elaboración de un método para la estimación del número de copias de un transgén insertadas en el genoma. ....	37
3.1.6. Evaluación del número de copias del transgén insertadas y la homocigosis de las líneas transgénicas mediante Real –Time qPCR. ....	44
3.1.7. Análisis de plantas transgénicas con niveles de expresión silenciados de la enzima HMGR2. ....	49
3.1.7.1. Análisis de las plantas amiH2-PLI. ....	49
3.1.7.2. Análisis de las plantas amiH2.E8. ....	57
3.1.8. Análisis de plantas transgénicas con niveles de expresión silenciados de la enzima SD. ....	62
3.2. IDENTIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE GENES CANDIDATOS DE LA ENZIMA ESTERILGLUCÓSIDO ACILTRANSFERASA (SGAT) EN <i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> VAR MICRO-TOM. ....	64
3.2.1. Puesta a punto de un método no radiactivo para determinar la actividad de la enzima esterilglucósido aciltransferasa en muestras de fruto de tomate. ....	64
3.2.2. Purificación parcial de la esterilglucósido aciltransferasa de fruto de tomate. ...	68
3.2.3. Análisis proteómico de las fracciones enriquecidas en la actividad esterilglucósido aciltransferasa. ....	73
3.2.4. Análisis bioinformático de los genes y proteínas candidatas SISGAT1 y SISGAT2	81
3.2.5. Análisis filogenético de las proteínas candidatas SISGAT1 y SISGAT2. ....	83

3.2.6. Clonación y validación de los cDNAs que codifican para las enzimas candidatas SISGAT1 y SISGAT2.....	88
3.2.7. Estudio de localización subcelular de las proteínas candidatas .....	90
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>99</b>
4. Discusión .....	101
4.1. Obtención y caracterización de líneas transgénicas de tomate ( <i>S. lycopersicum</i> var. Micro-Tom) afectadas en la expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis y el metabolismo de esteroides.....	103
4.2. Identificación y clonación de genes candidatos de la enzima esterilglucósido aciltransferasa (SGAT) en <i>Solanum lycopersicum</i> var Micro-Tom. ....	108
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>115</b>
5. Conclusiones.....	117
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>121</b>
6. Materiales y Métodos.....	123
6.1. Material biológico utilizado en este trabajo .....	123
6.1.1. Recolección de semillas de tomate .....	123
6.1.2. Recolección y liofilización de material vegetal de tomate .....	123
6.1.3. Esterilización de semillas de tomate .....	124
6.1.4. Protocolo para la transformación de <i>Solanum lycopersicum</i> var. Micro-Tom ...	125
6.1.5. Cepas de bacterias utilizadas en este trabajo.....	130
6.1.6. Medios de cultivo para <i>E. coli</i> .....	131
6.1.7. Medios de cultivo para <i>A. tumefaciens</i> .....	133
6.1.8. Preparación de células competentes de <i>E.coli</i> por choque térmico.....	134
6.1.9. Transformación de células competentes de <i>E.coli</i> por choque térmico .....	136
6.1.10. Preparación de células electrocompetentes de <i>A.tumefaciens</i> .....	137

6.1.11. Transformación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i> por electroporación .....	138
6.1.12. Protocolo de agroinfiltración de hojas de <i>N. benthamiana</i> .....	139
6.2. Técnicas moleculares para análisis de DNA y RNA.....	140
6.2.1. Extracción de DNA genómico .....	140
6.2.2. Extracción de RNA de tomate .....	142
6.2.3. Separación electroforética de DNA .....	144
6.2.4. Separación electroforética de RNA .....	146
6.2.5. Síntesis de cDNA a partir de DNA .....	148
6.2.6. Reacción de PCR utilizando <i>Taq</i> DNA polimerasa .....	148
6.2.7. Reacción de PCR utilizando <i>Pfu</i> polimerasa .....	149
6.2.8. Técnica de Real-Time qPCR con SYBR Green .....	149
6.2.9. Purificación de DNA de geles de agarosa .....	150
6.2.10. Digestión de DNA con enzimas de restricción .....	151
6.2.11. Construcción de plásmidos mediante el sistema de recombinación MultiSite Gateway PRO.....	151
6.3. Determinación de esteroides .....	153
6.3.1. Detección de esteroides en TLC. ....	153
6.3.1.1. Revelado de grupos glucosilados mediante el reactivo de Molisch. ....	153
6.3.1.2. Revelado de lípidos teñidos con Primulina.....	154
6.3.2. Preparación de estándares internos para el análisis de esteroides.....	155
6.3.3. Extracción, purificación y separación de esteroides de tomate .....	155
6.3.4. Silinización de muestras de esteroides extraídas.....	159
6.4. Técnicas de análisis de proteínas .....	160
6.4.1. Extracción y deslipidización de proteínas de tomate .....	160

6.4.2. Ensayo de actividad de la proteína SGAT.....	162
6.4.3. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	164
6.4.4. Acondicionamiento de proteínas para SDS-PAGE.....	165
6.4.5. Preparación de geles de poliacrilamida.....	166
6.4.6. Separación electroforética de las proteínas (SDS-PAGE) .....	168
6.4.7. Tinción de geles de proteínas.....	169
6.4.7.1. Tinción con azul de Coomassie para geles de proteínas .....	169
6.4.7.2. Tinción de plata para geles de proteínas.....	170
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>173</b>
7. Bibliografía .....	175
<b>ANEXOS.....</b>	<b>193</b>
Anexo I: Lista de <i>primers</i> usados.....	195
Anexo II: Secuencia de la región codificante del gen HMGR2 en la base de datos SolGenomics.....	198
Anexo III: Secuencia de la región codificante del gen SD en la base de datos SolGenomics .....	199
Anexo IV: Lista de proteínas obtenidas del análisis por Shotgun Proteomics.....	200
Anexo V: Secuencias de aminoácidos de las proteínas SGAT, PSAT, ASAT y SGT de <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>S. tuberosum</i> , <i>S. melongena</i> , <i>Oryza sativa</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i> . Proteínas PLA2 y LCAT de <i>Homo sapiens</i> .....	206





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico de barras de la producción de alimentos a nivel mundial.....	3
Figura 2. Gráfico de barras de la producción de tomate a nivel mundial.....	4
Figura 3. Estadios de maduración del fruto de tomate. ....	6
Figura 4. Molécula de isopreno. ....	8
Figura 5. Compartimentalización subcelular de las rutas metabólicas del MVA y MEP en las células vegetales .....	9
Figura 6. Ruta metabólica del mevalonato. ....	10
Figura 7. Modelo hipotético de una balsa lipídica enriquecida en esteroides en la membrana plasmática vegetal.....	14
Figura 8. Esteroides libres .....	15
Figura 9. Ruta de producción de esteroides.....	16
Figura 10. Esteroides libres y conjugados. ....	17
Figura 11. Representación esquemática de los vectores pENTRY conteniendo los genes HMGR2 y SD. ....	28
Figura 12. Representación esquemática de los vectores pENTRY conteniendo las secuencias para el silenciamiento de los genes HMGR2 y SD.....	29
Figura 13. Representación esquemática de los vectores pENTRY conteniendo los promotores CaMV35S, E8 y PLI. ....	31
Figura 14. Representación esquemática del vector pENTRY que contiene la secuencia del terminador tNOS. ....	32
Figura 15. Esquema de la estrategia de recombinación múltiple del sistema Gateway. ....	32

Figura 16. Etapas de la generación de plantas transgénicas de tomate.....	36
Figura 17. Texturas de la epidermis de un fruto rojo amiHMGR2-PLI b y tomate Micro-Tom wt.....	51
Figura 18. Expresión del gen HMGR2 en líneas amiH2-PLI y tomate wt. ....	52
Figura 19. Expresión de las isoformas HMGR en Micro-Tom wt.....	54
Figura 20. Expresión de las isoformas HMGR en la planta transgénica amiH2-PLI g6.....	55
Figura 21. Expresión de las isoformas HMGR en la planta transgénica amiH2-PLI h7.....	56
Figura 22. Frutos de las líneas amiH2-E8b2 y amiH2-E8c4. ....	58
Figura 23. Expresión del gen HMGR2 en líneas amiH2-E8 y tomate wt. ....	59
Figura 24. Expresión de las isoformas HMGR en la planta transgénica amiHMGR2-E8 c3 y tomate wt.....	60
Figura 25. Expresión de las isoformas HMGR en la planta transgénica amiHMGR2-E8 b2....	61
Figura 26. Expresión del gen SD en la planta amiSD-E8a y Micro-Tom wt. ....	63
Figura 27. Ensayo enzimática para determinar la temperatura óptima de reacción.....	66
Figura 28. Ensayo enzimático para determinar la formación de ASG a partir de SG y PE.....	67
Figura 29. Curva de calibración de la columna de exclusión HiLoad 26/600 Superdex 200 pg. .....	70
Figura 30. TLC del ensayo enzimático de cada fracción obtenida de la columna de exclusión. .....	72
Figura 31. Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones que mostraron actividad SGAT. ...	73
Figura 32. Separación mediante por SDS-PAGE de las proteínas presentes en la fracción 61. .....	75
Figura 33. Alineamiento de las proteínas candidatas SGAT de <i>S. lycopersicum</i> . ....	78

Figura 34. Reacción EC 2.3.1.43.....	80
Figura 35. Reacción EC 3.1.1.32.....	80
Figura 36. Dominios conservados de las proteínas candidatas SISGAT1 y SISGAT2. ....	82
Figura 37. Alineamiento de las proteínas SGAT y PSAT de diversas especies.....	85
Figura 38. Alineamiento de las proteínas SGT y SGAT de diversas especies vegetales.....	86
Figura 39. Análisis filogenético molecular de las proteínas SGAT y otras relacionadas de <i>S. lycopersicum</i> junto a sus ortólogos en distintas especies. ....	87
Figura 40. Perfil de hidrofobicidad de las enzimas SISGAT1 y SISGAT2.....	91
Figura 41. Esquema de los vectores de expresión para la localización subcelular de SISGAT1 y SISGAT2. ....	92
Figura 42. Localización subcelular de las proteínas candidatas SISGAT1 y SISGAT2 en hojas de <i>N. benthamiana</i> .....	93
Figura 43. Gráfico ideal de un experimento FRAP. ....	94
Figura 44. Experimento de FRAP en células que expresan la eGFP.....	95
Figura 45. Experimento de FRAP en células que expresan la proteína SISGAT1 fusionada a eYFP. ....	97
Figura 46. Experimento de FRAP en células que expresan la proteína SISGAT2 fusionada a eYFP. ....	98



## Lista de Tablas

Tabla 1. Vectores de expresión creados por recombinación. ....	33
Tabla 2. Número de copias de la primera generación de plantas transgénicas. ....	40
Tabla 3. Cigosidad de las plantas de la segunda generación de las plantas amiH2-PLId.....	41
Tabla 4. Cigosidad de las plantas de la segunda generación de la planta amiH2-PLIg.....	42
Tabla 5. Cigosidad de las plantas de la segunda generación de la planta amiH2-PLIh.....	43
Tabla 6. Número de copias de plantas transgénicas de la primera generación (T0). ....	45
Tabla 7. Cigosidad de las plantas transgénicas de la segunda generación (T1). ....	47
Tabla 8. Número de copias de plantas transgénicas de la segunda generación (T1) de la construcción oeSD-E8. ....	48
Tabla 9. Compuestos y proteínas usadas para la calibración de la columna de exclusión.....	69
Tabla 10. Parámetros para identificar péptidos en la secuenciación de proteínas. ....	77
Tabla 11. Proteínas candidatas SGAT de <i>S. lycopersicum</i> . ....	79
Tabla 12. Alineamiento de la proteína SISGAT1 con secuencias similares en <i>A. thaliana</i> . ....	83
Tabla 13. Alineamiento de la proteína SISGAT2 con secuencias similares en <i>A. thaliana</i> . ....	83
Tabla 14. Lista de vectores pENTRYs generados por recombinación BP. ....	89



# **INTRODUCCIÓN**





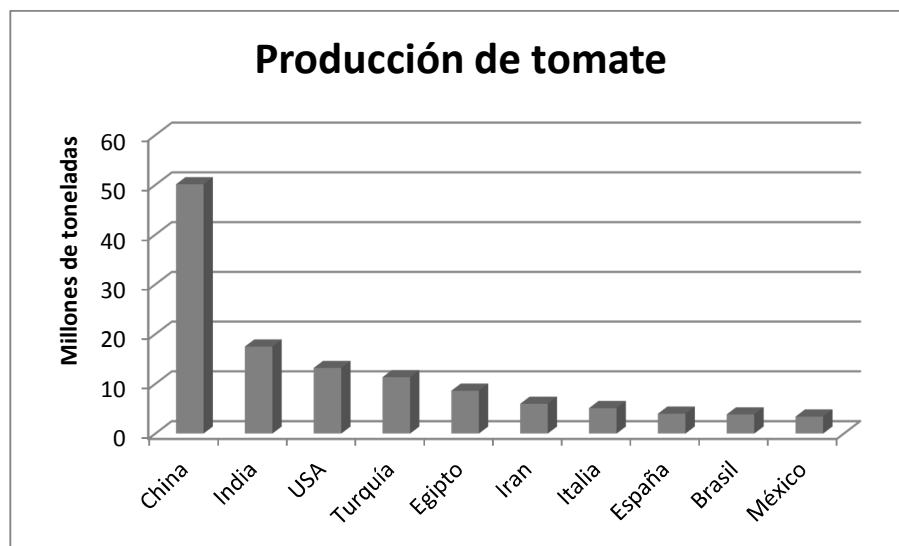
# 1. Introducción

## 1.1. Importancia del tomate como alimento y en la economía mundial

Hoy en día, los parientes salvajes del tomate cultivado ven sus orígenes nativos en la zona oeste de América del Sur, atravesando la costa y la sierra Andina de Ecuador, pasando por Perú, el norte de Chile e inclusive las Islas Galápagos. El ancestro más cercano al tomate que se consume en la actualidad es el tomate cherry salvaje, comúnmente identificado como *Solanum lycopersicum* var. cerasiforme, que se encuentra ampliamente distribuido en países como México, Colombia, Bolivia y otros países de América del Sur. El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las hortalizas más cultivadas a nivel mundial de acuerdo a datos de la FAO; durante el año 2012, el tomate tuvo una producción superior a las 160 millones de toneladas (MTon) (Figura 1). La mayor parte de la producción mundial se encuentra en los países del hemisferio norte siendo el principal productor China (50 MTon) seguida de la India (17.5 MTon) (Figura 2).



Figura 1. Gráfico de barras de la producción de alimentos a nivel mundial. Detalle de la producción de alimentos cultivados a nivel mundial en el año 2012, según la FAO



**Figura 2. Gráfico de barras de la producción de tomate a nivel mundial.** Detalle de la producción de tomate por países en el año 2012, según la FAO.

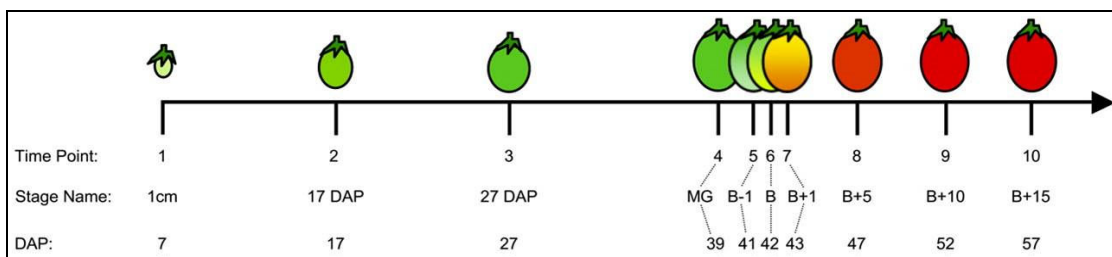
El tomate constituye una parte fundamental en la dieta de los seres humanos, siendo así una fuente muy importante para la ingesta de nutrientes. El tomate es consumido mayormente fresco, sin embargo, una parte muy importante se destina a la industria de procesados, la cual cubre desde la producción de tomate desecado hasta la elaboración de salsas o pastas. En el tomate fresco son importantes las características de color, sabor, aroma y textura determinadas para satisfacer el gusto del consumidor, mientras que el tomate destinado al procesamiento industrial debe tener propiedades reológicas adecuadas a tal fin, como son los pigmentos, azúcares, ácidos orgánicos, oligoelementos, antioxidantes y la proporción de materia seca. Otras características del fruto están relacionadas con la manipulación post-cosecha y la posterior comercialización, es por ello que los estudios de dichos aspectos han sido, y siguen siendo objetivos importantes en los programas de mejora del tomate.

## 1.2. Tomate como modelo de estudio del metabolismo vegetal

La importancia comercial del tomate, sus períodos de crecimiento y desarrollo relativamente cortos, su herencia diploide, la fácil propagación conjuntamente con su característico tamaño del genoma (950 Mb), organizado en 12 cromosomas, lo han convertido en el principal sistema de modelaje en el estudio de la maduración de frutos carnosos (Gillaspy et al., 1993; Giovannoni, 2004; Carvalho et al., 2011; Klee and Giovannoni, 2011). El tomate cv. Micro-Tom (MT) fue creado inicialmente para propósitos ornamentales y proviene del cruce de los cultivares Florida Basket y Ohio 4013-3, pero su pequeño tamaño (1.357 plantas/m<sup>2</sup>), rápido ciclo de vida (70 - 90 días desde la siembra hasta la maduración de los frutos) y fácil transformación lo llevó a ser el cultivar ideal para el estudio de plantas con frutos carnosos (Dan et al., 2006; Marti et al., 2006; Carvalho et al., 2011). Esta variedad de tomate se diferencia de los cultivares tradicionales (Moneymaker, Ailsa Craig y entre otros) principalmente por dos genes recesivos: *dwarf* (*d*) y *miniature* (*mnt*), los que le confieren su conocido fenotipo enano (Meissner et al., 1997).

En la actualidad el genoma del tomate se encuentra secuenciado (Tomato Genome, 2012) y está siendo anotado por el Grupo de Anotación Internacional del Tomate (ITAG), con el afán de encontrar, identificar y comprender los diferentes genes involucrados en el desarrollo y maduración del fruto de tomate. Esta información se encuentra disponible en la página web de *Sol Genomics Network* (<http://solgenomics.net/>) (Bombarely et al., 2011), donde también se puede encontrar toda la información acerca de los ESTs (*Expressed Sequenced Tags*) y de los Unigenes (conjunto de diferentes ESTs ensamblados que definen la secuencia de un determinado RNAm), conjuntamente con los mapas genómicos. Otros grupos de trabajo internacionales como el del Dr. James Giovannoni y el Bio-Analytic Resource for Plant Biology (BAR) han contribuido a la generación de bases de datos de expresión diferencial de distintos genes en diferentes estadios de desarrollo y maduración del fruto de tomate mediante análisis de MicroArray (Alba et al., 2005) y RNAseq (Matas et al., 2011), respectivamente.

El desarrollo y la maduración del fruto (Figura 3) es un proceso complejo programado a nivel genético, en el cual se activan una serie de procesos bioquímicos y metabólicos que modifican su textura, pigmentación, sabor y aroma (Klee and Giovannoni, 2011). En conjunto estos cambios confieren al fruto las características óptimas para su consumo y debido a la importancia económica del tomate, el estudio de los procesos relacionados con la calidad y la manipulación post-cosecha del fruto han sido, y continúan siendo una actividad muy relevante en el ámbito de la fisiología, la bioquímica y la biología molecular vegetal. Además, el hecho de que el tomate sea un fruto climatérico con un requerimiento absoluto del etileno para madurar, lo ha convertido también en un excelente modelo para el estudio de los mecanismos relacionados con la síntesis y la percepción del etileno en vegetales (Giovannoni, 2007).



**Figura 3. Estadios de maduración del fruto de tomate.** Imagen modificada de Alba et al. (2005) que describe los distintos estadios de maduración del fruto de tomate después de la polinización de la flor. DAP: días después de la polinización.

Los recientes avances en el campo de la bioinformática han llevado a un creciente interés por estudios basados en el uso de aproximaciones de tipo transcriptómico, proteómico y metabolómico que están contribuyendo de forma muy relevante, no solo a una mejor comprensión de los procesos bioquímicos y metabólicos relacionados con la calidad del fruto indicados anteriormente, sino también a la identificación de nuevos procesos metabólicos cuya función en la biología del fruto es muchas veces desconocida (Alba et al., 2005; Lemaire-Chamley et al., 2005; Carrari et al., 2006; Carrari and Fernie, 2006; Faurobert et al., 2007; Fraser et al., 2007; Moco et al., 2007; Barsan et al., 2010; Osorio et al., 2011; Palma et al., 2011). Dentro de este marco podemos citar al metabolismo de los esteroides, el cual es un proceso que podría tener un papel relevante tanto en el desarrollo y la maduración

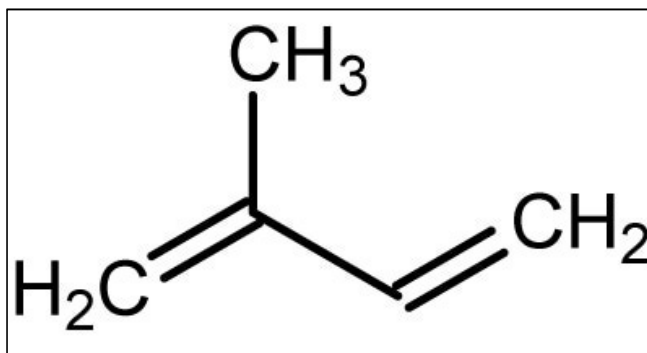
del fruto como en la respuesta a diferentes tipos de estreses bióticos y abióticos (Amemiya et al., 2006) no solo en el fruto sino también en toda la planta.

### **1.3. Biosíntesis y función de isoprenoides**

Las rutas metabólicas son las encargadas del control de la producción biológica de los compuestos necesarios para la vida de los organismos, desde el desarrollo celular hasta la interacción entre organismos y con el ecosistema. Los isoprenoides o terpenoides son los productos mayoritarios de las rutas metabólicas primarias y secundarias, habiendo sido identificados hasta 50000 distintos compuestos y siendo la gran mayoría sintetizados por plantas o bacterias (Hemmerlin et al., 2012). Los isoprenoides representan al grupo más amplio de metabolitos estructurales y funcionales, teniendo los isoprenoides vegetales roles esenciales en la fluidez de las membranas, respiración celular, síntesis y regulación del crecimiento y desarrollo (Vranova et al., 2013). Los isoprenoides son metabolitos especializados que participan en respuesta a factores abióticos y bióticos, estando relacionados con el último en las interacciones planta-patógeno para proteger a las plantas de herbívoros y patógenos (insectos, bacterias, hongos, virus, etc..) con productos de defensa (pesticidas naturales) así como en la función de atraer a polinizadores y animales para la dispersión de semillas (Duke, 1990). Muchos isoprenoides tienen gran importancia e interés biológico y económico debido a su utilización en drogas, nutracéuticos, fragancias, pigmentos, productos agroquímicos, entre otros (Bohlmann and Keeling, 2008) y es por esto que es necesario comprender la regulación bioquímica y molecular de la síntesis de isoprenoides.

Otto Wallach (1912) fue el primer científico en proponer la regla característica de los isoprenos con la siguiente fórmula:  $(C_5H_8)_n$ , y posteriormente Ruzicka (1953) fue quien describió la regla biogenética de los isoprenos (Figura 4). Los primeros estudios de isoprenoides fueron realizados en animales y levaduras, demostrando así que la biosíntesis de estos metabolitos se originaban del precursor mevalonato (MVA), asumiendo que esta sería la única ruta metabólica disponible para la síntesis de isoprenoides en la naturaleza,

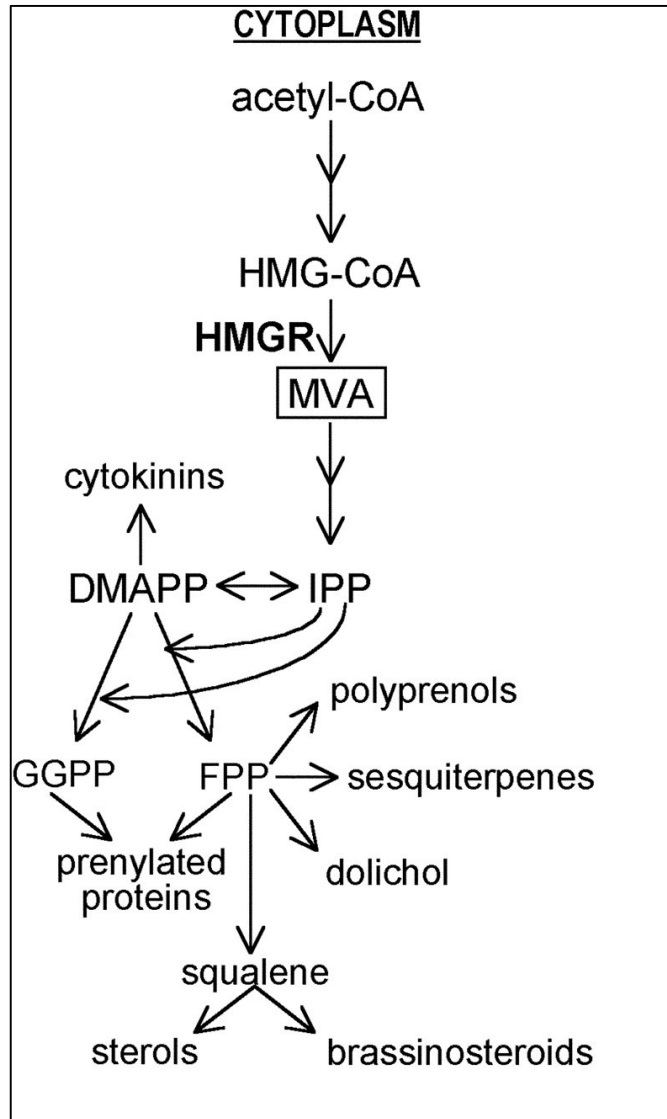
incluyendo bacterias y plantas (Goodwin, 1958; Modi and Patwa, 1961; Ramasarma and Ramakrishnan, 1961; Durr and Shwayri, 1964). Pero Irving Zabin, en 1957, concluyó en su estudio con tomates, que la producción de isoprenoides necesarios para la biosíntesis de licopeno en el fruto podría provenir del mismo precursor (IPP) pero ser formado por distintas reacciones, una diferente ruta metabólica, en diversos organismos. Varios años después, esta declaración probó ser cierta cuando varios investigadores describieron una ruta alternativa para la síntesis de isopentil difosfato (IPP)/dimetilalil difosfato (DMAPP) en bacterias y plantas vasculares (Pandian et al., 1981; Rohmer et al., 1993; Lichtenthaler et al., 1997). Esta nueva ruta metabólica tiene lugar en los plastos y es independiente del mevalonato, tomando como precursores a intermediarios como el piruvato y D-gliceraldehido 3-fosfato (GAP) para formar 1-deoxy-D-xilulosa 5-fosfato (DXP), el cual posteriormente pasa a través de un rearrreglo molecular y es reducido a 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) (Figura 5).



**Figura 4. Molécula de isopreno.** Estructura molecular de una unidad de isopreno.

La existencia de ambas rutas metabólicas para la biosíntesis de isoprenoides y su compartimentalización (ruta del MVA: citoplasma y mitocondria; ruta del MEP: plastos) (Figura 5) demuestra la versatilidad de las plantas vasculares para el uso de distintas fuentes de carbono para satisfacer de manera rápida y eficiente la necesidad por ciertos productos finales, así como la posibilidad de la síntesis independiente de isoprenoides con funciones múltiples o específicas. A pesar de la compartimentalización de las rutas metabólicas y de un origen bioquímico distante, existe una interacción a través de un intercambio de metabolitos, denominado “cross-talk”, aunque los mecanismos reguladores para su interacción no están





**Figura 6. Ruta metabólica del mevalonato.** Descripción de los pasos enzimáticos en la ruta del Mevalonato para la producción de isoprenoides y sus derivados en el citosol. La imagen ha sido modificada de Rodríguez-Concepción et al. (2004)



## 1.4. Ruta metabólica del mevalonato

Como se ha mencionado anteriormente, los precursores para la síntesis de isoprenoides en el citoplasma y la mitocondria se originan en la ruta metabólica del MVA. La reacción inicial para la biosíntesis de IPP citoplasmática comprende la condensación de 2 moléculas de Acetil-Coenzima A (Ac-CoA) en acetoacetil-CoA (AcAc-CoA) en la reacción catalizada por la enzima AcAc-CoA tiolasa (AACT). Mediante una reacción termodinámicamente favorable se cataliza una condensación aldólica de la AcAc-CoA con Ac-CoA, dando lugar a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), reacción llevada a cabo por la enzima HMG-CoA sintasa. La HMG-CoA es luego convertida en ácido mevalónico (MVA) en dos pasos de reducción, cada uno con requerimientos de NADPH como el elemento reductor y la enzima encargada de esta catálisis es la **HMG-CoA reductasa (HMGR)**. En dos pasos sucesivos catalizados por la MVA kinasa y la fosfo-MVA kinasa el MVA es convertido en MVA 5-difosfato (MVADP) para finalmente ser convertido en IPP mediante una descarboxilación dependiente de ATP por la enzima MVA difosfato descarboxilasa (MPDC) (Hemmerlin et al., 2012; Vranova et al., 2013) (Rodríguez-Concepción et al., 2004) (Figura 6).

La molécula de IPP es luego isomerizada en dimetilalil-difostato (DMAPP) por la enzima isopentil-difostato  $\Delta$ -isomerasa (IDI), la cual es una reacción reversible que se encarga de controlar el cambio de IPP (molécula poco reactiva) a DMAPP (molécula muy reactiva), siendo DMAPP la molécula de isopreno químicamente activa con la cual la biosíntesis de los metabolitos se inicia.

## 1.5. Importancia de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa en la biosíntesis de isoprenoides

La 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa, comúnmente abreviada como HMGR, es la enzima encargada de la reducción de HMG-CoA en MVA y es considerada el paso limitante

en la biosíntesis de isoprenoides en plantas (Figura 6). La HMGR es una proteína transmembrana y que se encuentra unida a la membrana del retículo endoplasmático con el sitio catalítico orientado hacia el citosol (Campos and Boronat, 1995; Denbow et al., 1996; Re et al., 1997; Leivar et al., 2005). Las plantas sintetizan esteroides a partir de precursores estructurales producidos a través de la ruta del MVA en la que la HMGR es la principal enzima reguladora (Bach and Benveniste, 1997). Esta enzima limitante juega un papel importante en la biosíntesis de productos finales de isoprenoides, teniendo gran control sobre la síntesis de metabolitos primarios, particularmente de fitosteroides (Bach, 1986; Godoy-Hernández et al., 1998; Suzuki et al., 2004; Enfissi et al., 2005). Al ser una enzima tan importante para el crecimiento y desarrollo de las plantas, es normal que sea susceptible a diversos estímulos externos como pueden ser la luz, lesiones, patógenos, y exposición a metales pesados; y respondiendo mediante la modulación de su expresión génica, síntesis de proteína y/o actividad enzimática (Learned and Fink, 1989; Yang et al., 1991; Choi et al., 1992; Ji et al., 1992; Choi et al., 1994; Maldonado-Mendoza et al., 1994; Kondo et al., 2003).

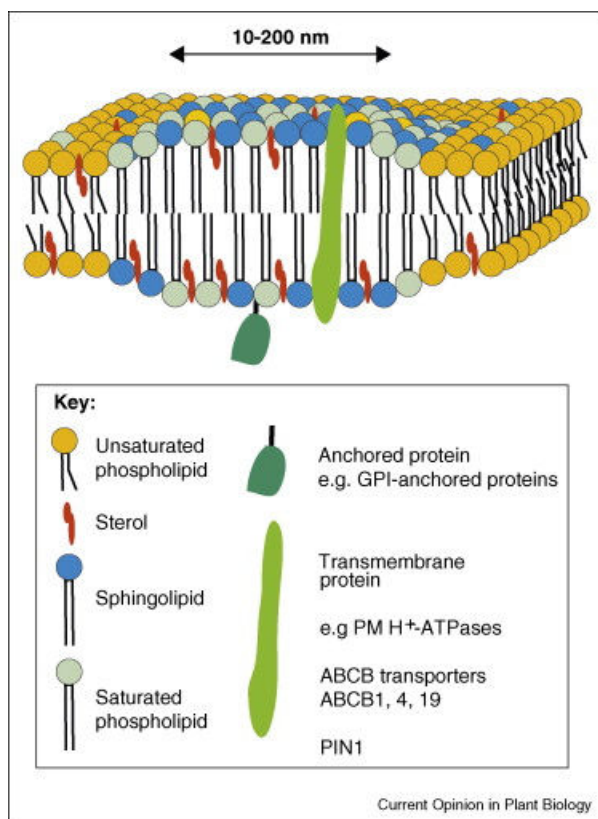
En las plantas, la familia de genes para HMGR codifica al menos tres isoformas, dependiendo de la especie vegetal, y cada isoforma parece tener un rol particular durante la vida de la planta. En el caso de *S. lycopersicum* existen 4 isoformas de HMGR, siendo las isoformas HMGR1 y HMGR2 las más ampliamente estudiadas al ser las más expresadas (Park et al., 1992; Jenkins, 1996). La isoforma HMGR1 ha sido descrita como la enzima encargada de la división y expansión celular, estando involucrada en la biosíntesis de esteroides para la formación de nuevas membranas y crecimiento de la planta (Gillaspy et al., 1993). En cambio la isoforma HMGR2 se ha descrito como la enzima detrás de la maduración del fruto de tomate, aumentando y cambiando sus niveles de expresión inversamente proporcional a los de HMGR1 a medida que el fruto madura (Rodríguez-Concepcion and Gruissem, 1999). A su vez, experimentos de lesión en hojas en tomate han mostrado que la HMGR1 disminuye sus niveles de expresión cuando las hojas son lesionadas y aumenta los niveles de transcritos de HMGR2 intercambiando así sus niveles de expresión, reportando de esta forma una expresión diferencial en respuesta a un estrés y demostrando que cada isoforma cumple un rol especial y específico durante el crecimiento, desarrollo e interacción con factores bióticos y abióticos en la planta (Daraselia et al., 1996). Experimentos adicionales llevados a cabo por la Dra. Irini

Pateraki (comunicación personal) mostraron que el fruto de tomate cuando es sometido a estrés por lesión en el pericarpio, los niveles de expresión de HMGR2 y HMGR1 se intercambian, el cual sigue el patrón de intercambio de expresión entre las isoformas de HMGR.

## **1.6. Biosíntesis y función de los esteroides vegetales**

Las membranas celulares están compuestas por una variedad de moléculas, principalmente por lípidos y proteínas, donde de los primeros los esteroides son componentes fundamentales por ser responsables de la fluidez y permeabilidad de la membrana gracias a sus propiedades fisicoquímicas (Hartmann, 1998). La síntesis de esteroides ocurre a través de la ruta metabólica del mevalonato donde la principal enzima reguladora es la HMGR (Hemmerlin et al., 2012).

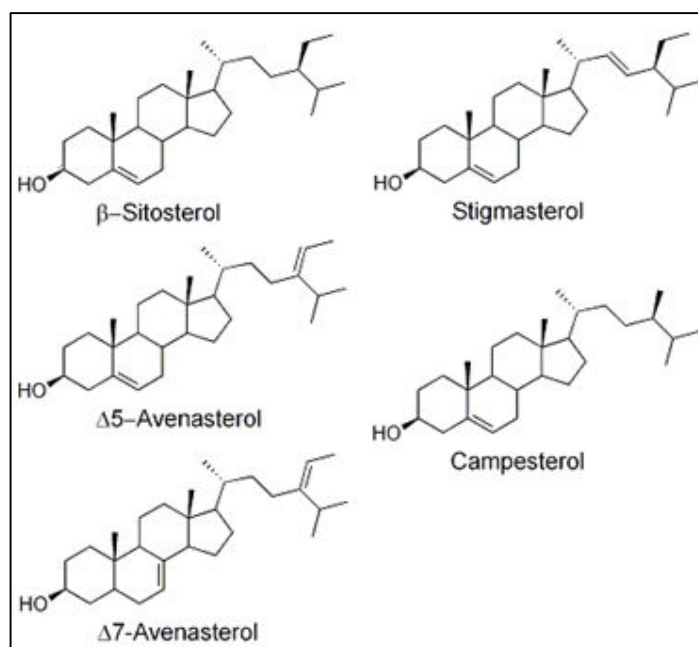
Los esteroides, los glicerolípidos y los esfingolípidos componen los tres grupos principales de lípidos que se encuentran en las membranas celulares. De estos grupos, los esteroides localizan su síntesis en su mayor parte en el retículo endoplasmático (RE), desde donde ocurre su distribución al resto de membranas celulares. Los esteroides se encuentran concentrados en microdominios denominados balsas lipídicas, que están enriquecidas también en esfingolípidos y en distintos tipos de proteínas (Figura 7). Estas estructuras sirven de plataforma para procesos tan diversos como el establecimiento y el mantenimiento de la polaridad celular, la transmisión de señales extracelulares para la proliferación y la diferenciación celular, la secreción polarizada, la organización del citoesqueleto e incluso la penetración de agentes patógenos (Pike, 2003; Martin et al., 2005). Las plantas producen una mezcla compleja de esteroides que difiere con el resto de la naturaleza, que se denominan fitoesteroides, en la que los mayoritarios son el campesterol, el  $\beta$ -sitosterol y el estigmasterol (Figura 8), siendo los dos últimos los implicados en el mantenimiento de la estructura y la función de las membranas (Hartmann, 1998) y el campesterol el precursor de los brassinosteroides (Fujioka et al., 2002).



**Figura 7. Modelo hipotético de una balsa lipídica enriquecida en esteroides en la membrana plasmática vegetal** (Boutté and Grebe, 2009). Modelo de una balsa lipídica que muestra la exclusión de los fosfolípidos insaturados (amarillo) y una concentración de esteroides (rojo), esfingolípidos (azules) y fosfolípidos saturados (gris) hacia el centro de la balsa.

En la naturaleza los esteroides se encuentran en cuatro formas principales: como esteroides libres (FS), esteril esterificados (ES), esteril glucosilados y por último como acil-esteril glucosilados (ASG) (Figura 9 y Figura 10) (Moreau et al., 2002; Grille et al., 2010). La composición de FS determina las propiedades fisicoquímicas de las membranas y por ende su función biológica, ya que modulan la permeabilidad y la fluidez de las mismas (Schuler et al., 1991). Los ES son esteroides que han sido esterificados a un ácido graso en el grupo hidroxilo de la posición C3, que se encuentran depositados en partículas lipídicas citoplasmáticas. Su

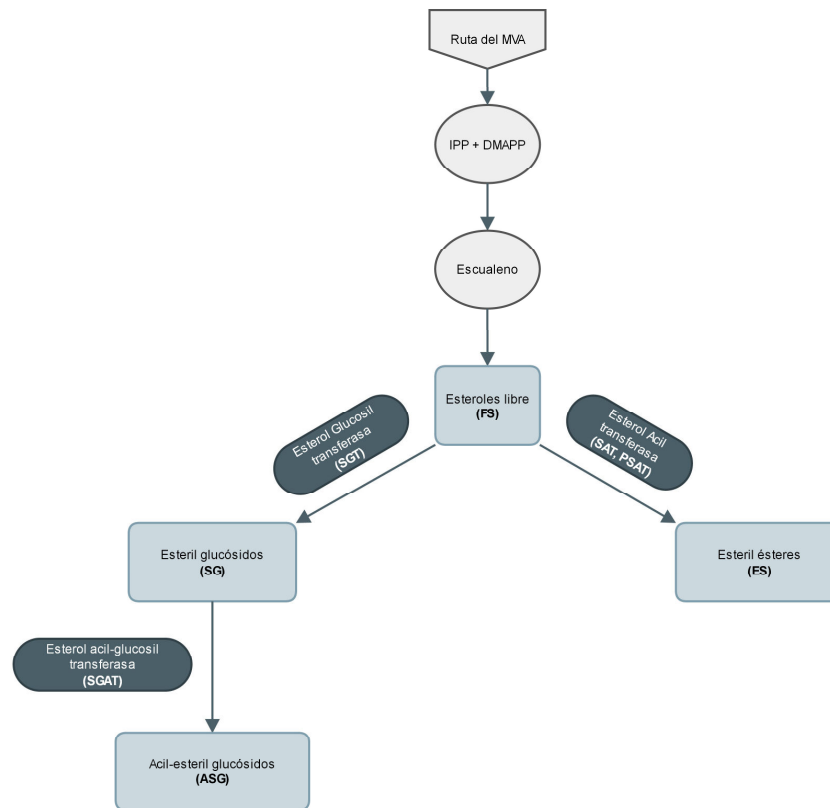
baja afinidad por la membrana ha sugerido un rol en el control de la homeostasis de FS en la membrana (Silvestro et al., 2013). Los SG consisten de un carbohidrato unido al grupo hidroxilo de una molécula de esterol. La fracción esteril puede estar compuesta por cualquiera de los fitoesteroles mencionados antes, mientras que fracción glucosídica está compuesta mayormente por glucosa aunque puede presentar xilosa e incluso arabinosa (Schrack et al., 2012). Los ASG se forman cuando un ácido graso se encuentra acilado al grupo hidroxilo primario (C6) del carbohidrato de una molécula de SG, donde el ácido graso suele ser el ácido palmítico (Potocka and Zimowski, 2008; Schrack et al., 2012).



**Figura 8. Esteroles libres.** Estructura molecular de los esteroles vegetales más comunes.

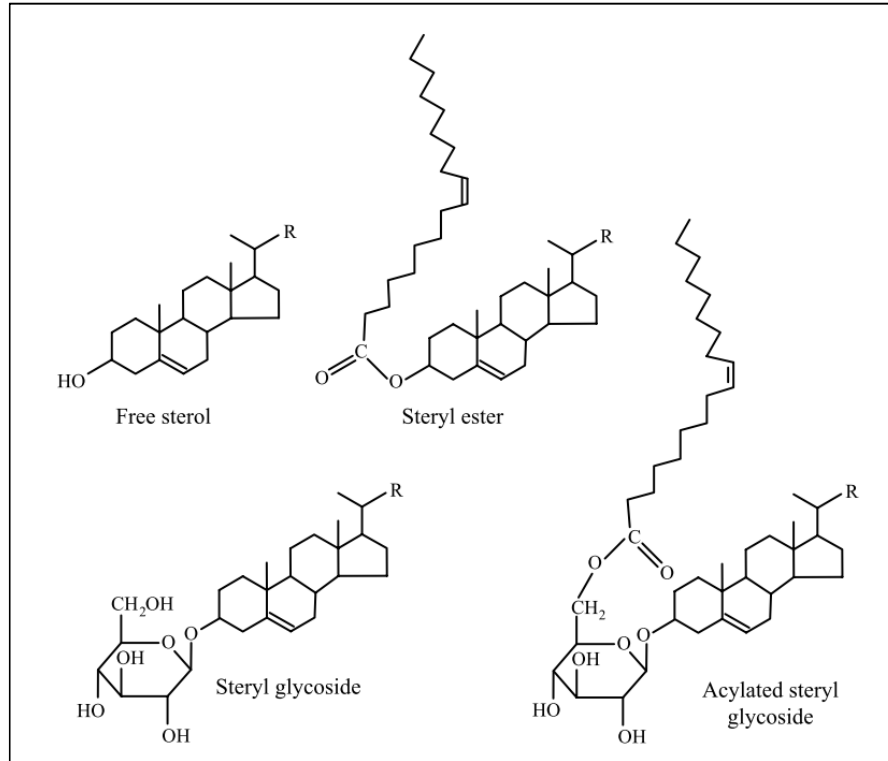
En las plantas, las proporciones de ASG y SG suelen ser pequeñas cuando son comparadas con FS y ES, pero las plantas del género *Solanum* son uno de los casos excepcionales a la regla, en el cual los ASG y SG se acumulan en cantidades superiores a los FS y ES (Dupéron et al., 1984; Moreau et al., 2002; Nyström et al., 2012). El fruto del tomate es capaz de acumular SG y ASG a cantidades superiores al 85 - 90% del contenido total de esterol (Dupéron et al.,

1984; Whitaker, 1988, 1991). Ambos tipos de compuestos se localizan principalmente en la membrana plasmática, aunque también se encuentran en el tonoplasto y el retículo endoplasmático, pero en proporciones muy variables dependiendo de la planta y de las condiciones de crecimiento (Yoshida and Uemura, 1986; Uemura and Steponkus, 1994; Uemura et al., 1995).



**Figura 9. Ruta de producción de esteroides.** Síntesis de esteroides a partir de la ruta metabólica del MVA y la descripción de los distintos tipos de esteroides presentes en la naturaleza.

Cambios en las proporciones relativas de SG y ASG afectan las funciones y permeabilidad de la membrana celular gracias a las propiedades hidrofílicas de los mismos con respecto a los FS (Yamaguchi and Kasamo, 2001).



**Figura 10. Esteroles libres y conjugados.** Estructura básica de los esteroles libres y conjugados, donde la cadena lateral -R varía entre los distintos tipos de esteroles.

Aunque actualmente muchas de las enzimas participantes en el proceso de conjugación de esteroles han sido descritas en distintos organismos, existe poca información y estudios centrados en la función y caracterización de las enzimas involucradas en la biosíntesis de esteroles conjugados. La acil-CoA aciltransferasa (ASAT1) y fosfolípido:esterol aciltransferasa (PSAT1) en *Arabidopsis thaliana* (Banas et al., 2005; Chen et al., 2007; Bouvier-Nave et al., 2010) son encargadas de sintetizar SE a partir de acil-CoA y fosfolípidos, respectivamente. Los SG son sintetizados a partir de una reacción catalizada por la enzima UDP-glucosa:esterol glucosiltransferasa (SGT), la cual ha sido descrita en *A. thaliana*, *Avena sativa* y *Withania somnifera* (Warnecke et al., 1997; Sharma et al., 2007; DeBolt et al., 2009; Chaturvedi et al., 2012). La SGT posee varias isoformas identificadas hasta el momento, variando su número entre los distintos organismos, como es el ejemplo del tomate, *S. lycopersicum*, en el cual se han identificado 4 isoformas a partir del genoma secuenciado. La SGT posee una actividad enzimática significativa en la síntesis de esteroles porque es el enlace

con las formas no glucosiladas (FS y SE) con el de las glucosiladas (SG y ASG) (Figura 9). En cuanto a la síntesis de ASG, es importante resaltar que hasta la fecha no se ha descrito el clonaje de ningún gen en ningún organismo que codifique para una esteroil acil-glucosil transferasa (SGAT) (Figura 10).

Como se mencionó anteriormente, la planta de tomate junto a otras especies del género *Solanum* poseen niveles de esteroides muy distintos a las del resto de plantas en la naturaleza y no solo en el fruto sino también en la planta, volviéndose aún más evidente durante la maduración del fruto donde aumenta de forma sustancial la síntesis de esteroides libres y conjugados, logrando así que el contenido de FS y SG aumente a costas de la disminución de ASG, mientras que el contenido de SE incrementa más de 10 veces. En conjunto, se produce un aumento de la relación entre las formas no glucosiladas (FS + SE) y glucosiladas (SG + ASG) de los esteroides (Chow and Jen, 1978; Duperon et al., 1984; Whitaker, 1988; Whitaker and Gapper, 2008). Estos cambios se encuentran asociados primordialmente con el proceso de maduración del fruto, ya que en plantas mutantes afectadas en la maduración de los frutos (nor y rin) los niveles de esteroides y sus conjugados no se ven alterados de forma significativa (Whitaker, 1988; Whitaker and Gapper, 2008).

### **1.7. Regulación del estigmasterol y $\beta$ -sitosterol mediante la esteroil-C22-desaturasa de *S. lycopersicum***

Los esteroides son componentes importantes durante la maduración del fruto de tomate como se mencionó antes, pero existe un cambio particular que ocurre durante este proceso que está asociado al incremento de la relación estigmasterol: $\beta$ -sitosterol. La proporción relativa de estigmasterol: $\beta$ -sitosterol aumenta alrededor de 2.5 veces en el total de esteroides, mientras que la relación entre las formas libres aumenta hasta 5 veces, llegando incluso a invertirse. En tomate se ha descrito un solo gen involucrado en esta función de conversión, la esteroil C22 desaturasa (CYP710A11) y a la cual se asocia su inducción durante la maduración del fruto (Whitaker and Gapper, 2008). La proteína esteroil C22 desaturasa (SD)



se ha clonado y caracterizado enzimáticamente, describiendo de esta manera la función de convertir  $\beta$ -sitosterol a estigmasterol (Morikawa et al., 2006) y cuya expresión durante la maduración del fruto se induce en paralelo al incremento de la relación estigmasterol: $\beta$ -sitosterol (Whitaker y Gapper, 2008). El estigmasterol se diferencia del  $\beta$ -sitosterol solamente en un doble enlace situado entre las posiciones C22 y C23 de la cadena lateral (Figura 8). Experimentos realizados por Whitaker and Gapper (2008) mostraron que en frutos de plantas mutantes nor y rin no ocurre la inducción de SD, lo que corrobora que en estos mutantes no se altere la relación estigmasterol: $\beta$ -sitosterol.

Los fitoesteroles poseen múltiples funciones como se ha mencionado anteriormente, pero una posible implicación en las interacciones planta-patógeno es una función que llama mucho la atención. En *Arabidopsis* se ha descrito que cuando es infectada por *Pseudomonas syringae* se induce un aumento de la relación estigmasterol: $\beta$ -sitosterol. Durante la infección por *P. syringae* se observa un aumento de la relación estigmasterol: $\beta$ -sitosterol, la cual favorece la multiplicación del patógeno y aumenta la susceptibilidad de las plantas (Griebel and Zeier, 2010). En tomate cuando el fruto es infectado por *Botrytis cinerea*, la infección es estimulada por los cambios relacionados a la maduración del fruto y entre estos cambios la relación entre estigmasterol: $\beta$ -sitosterol (Cantu et al., 2009). En ambos casos la alteración en la relación de estigmasterol: $\beta$ -sitosterol influye en la susceptibilidad de la planta a ser afectada por patógenos y aunque estos esteroides se diferencian por tan poco, los efectos que estos tienen sobre la permeabilidad y fluidez de las membranas es muy diferente (Schuler et al., 1990; Schuler et al., 1991).

A pesar de la información presentada arriba, se desconoce aún el efecto que los cambios en las proporciones relativas de estigmasterol: $\beta$ -sitosterol pueden tener sobre la sensibilidad del fruto del tomate a la infección por patógenos. La mayoría de estudios sobre esteroides y enzimas asociadas a su conjugación o producción en tomate se han llevado a cabo en un pequeño número de áreas, dejando así un espacio en blanco de las posibles funciones que estos compuestos tienen durante el crecimiento, desarrollo y maduración de los frutos de tomate.



# **OBJETIVOS**



## 2. Objetivos

A diferencia del resto de especies vegetales, el tomate, junto con otras especies del género *Solanum*, presenta una composición atípica en el contenido y perfil de esteroides, siendo de destacar los niveles extraordinariamente elevados de esteroides conjugados. Además, durante la maduración del fruto se producen cambios muy importantes en los niveles y proporciones relativas de los esteroides libres y conjugados. La significación biológica y evolutiva del peculiar metabolismo de los esteroides en el tomate es totalmente desconocida. Estudios recientes indican que los esteroides juegan un papel esencial en el crecimiento y desarrollo de las plantas y en su respuesta a diferentes tipos de estrés. A partir de estas observaciones, y teniendo en cuenta que el conocimiento sobre las enzimas implicadas en el metabolismo de los esteroides conjugados es todavía muy limitado, se ha planteado un proyecto de tesis orientado al estudio del metabolismo de dichos compuestos en el tomate. En base a estos antecedentes se han abordado los objetivos siguientes:

- Obtención y caracterización de líneas transgénicas de tomate (*S. lycopersicum* var. Micro-Tom) afectadas en la expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis y el metabolismo de esteroides.
- Identificación y clonación de genes candidatos de la enzima esterilglucósido aciltransferasa (SGAT) en *Solanum lycopersicum* var Micro-Tom.



# **RESULTADOS**





### 3. Resultados

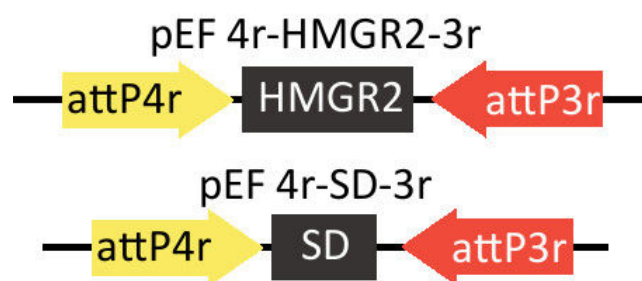
#### 3.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE TOMATE (*S. LYCOPERSICUM* VAR. MICRO-TOM) AFECTADAS EN LA EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA SÍNTESIS Y EL METABOLISMO DE ESTEROLES.

##### 3.1.1. Identificación y amplificación de los cDNAs correspondientes a la isoforma 2 de la HMG-CoA reductasa y la esterol C22 desaturasa de tomate.

Los genes diana utilizados en el presente trabajo han sido los que codifican para la isoforma 2 de enzima HMG-CoA reductasa (HMGR2, Solyc02g038740.2.1) y la enzima esterol C22 desaturasa (SD, Solyc02g070580.1.1). Mientras que la sobreexpresión o el silenciamiento de HMGR2 afectaría de forma general el flujo de precursores utilizados en la biosíntesis de esteroides (tanto libres como conjugados), la sobreexpresión o el silenciamiento de la SD afectaría específicamente el ratio  $\beta$ -sitosterol/estigmasterol.

La región codificante de los mRNA correspondientes a las enzimas HMGR2 y SD es de 1863 y 1506 nucleótidos, respectivamente (ver Anexos II y III). Para clonar los cDNAs conteniendo la secuencia codificante de HMGR2 y SD se procedió a extraer muestras de RNA de frutos de tomate en distintos estadios desarrollo y maduración, de las cuales posteriormente se preparó cDNA mediante transcripción reversa utilizando el kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription" (Applied Biosystems). Una vez obtenida la primera cadena de cDNA se hizo un tratamiento con la endonucleasa DNase I, para digerir cualquier residuo de DNA genómico que hubiera podido quedar durante la extracción de RNA y/o durante la síntesis de cDNA. A continuación se diseñaron *primers* específicos para ambas

secuencias (ver Anexo I), añadiendo al extremo 5' de cada uno de ellos una secuencia adicional correspondientes a las secuencia attB4r en el caso de los *primers* “forward” y a attB3r en caso el de los *primers* “reverse” (ver Anexo I). Estas secuencias attB son necesarias para la clonación de los productos amplificados mediante el sistema de recombinación Gateway (Life Technologies). Estos *primers* incluyeron los codones de inicio (*primer* forward) y terminación de la traducción (*primer* reverse) de cada cDNA. Las secuencias de interés fueron amplificadas mediante PCR utilizando los juegos de *primers* indicados anteriormente y una DNA polimerasa “proof-reading” (*Pfx50* DNA Polymerase, Life Technologies). Tras la purificación de los productos de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa éstos se validaron mediante secuenciación. Dichos productos de PCR fueron reamplificados con *primers* que contenían las secuencias de los sitios attB3r y attB4r completas y se recombinaron con el plásmido pDONR221 P4r-P3r del sistema Gateway para generar los vectores pENTRY denominados pEF 4r-HMGR2-3r y pEF 4r-SD-3r (Figura 11).

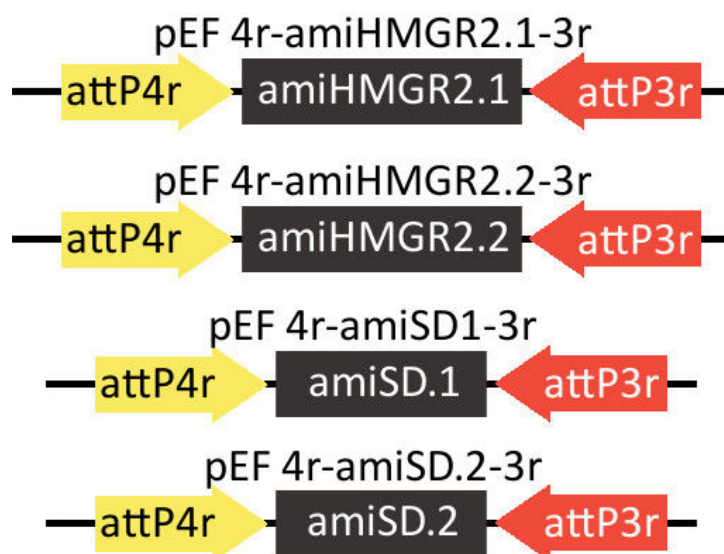


**Figura 11. Representación esquemática de los vectores pENTRY conteniendo los genes HMGR2 y SD.** Representación esquemática (no dibujada a escala) de los vectores pENTRY pEF 4r-HMGR2-3r y pEF 4r-SD-3r generados mediante la recombinación BP de las secuencias de los genes HMGR2 y SD con el vector pDONR221 P4r-P3r.

### 3.1.2. Generación de secuencias que codifican amiRNAs para el silenciamiento de HMGR2 y SD.

Para el silenciamiento de los genes que codifican para HMGR2 y SD se usaron microRNAs artificiales (amiRNAs) que fueron obtenidos mediante “overlapping PCR” con

*primers* diseñados para el silenciamiento específico de dichos genes (ver Anexo I). Dichos *primers* fueron diseñados según se describe en el sitio web <http://wmd3.weigelworld.org> (Schwab et al., 2006) y utilizando el plásmido pRS300 especialmente preparado para introducir las secuencias de amiRNAs en el precursor *miR319a*. Durante el último paso de “overlapping PCR” se utilizaron dos oligonucleótidos alternativos, attB4r\_amiRNA\_For y attB3r\_amiRNA\_Rev (ver Anexo I) para añadir los sitios de recombinación attB4r (extremo 5’) y attB3r (extremo 3’) en el producto de PCR final. Con estos *primers* es posible amplificar cualquier amiRNA derivado de un precursor *miR319a*. Para cada uno de los genes a silenciar se prepararon 2 variantes de amiRNA distintas (amiRNA.1 y amiRNA.2) con el objetivo de asegurar el correcto funcionamiento de al menos una de ellas. Dichos productos de PCR contenían las secuencias de los sitios attB3r y attB4r que se recombinaron con el plásmido pDONR221 P4r-P3r del sistema Gateway mediante recombinación BP para generar los vectores pENTRY denominados pEF 4r-amiHMGR2.1-3r, pEF 4r-amiHMGR2.2-3r, pEF 4r-amiSD.1-3r y pEF 4r-amiSD.2-3r.

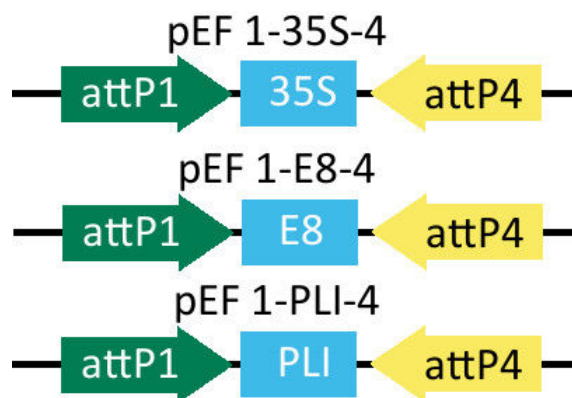


**Figura 12. Representación esquemática de los vectores pENTRY conteniendo las secuencias para el silenciamiento de los genes HMGR2 y SD.** Representación esquemática (no dibujada a escala) de los vectores pENTRY pEF 4r-amiHMGR2.1-3r, pEF 4r-amiHMGR2.2-3r, pEF 4r-amiSD.1-3r y pEF 4r-amiSD.2-3r generados mediante la recombinación BP de las 2 variantes de las

secuencias para el silenciamiento de los genes HMGR2 y SD con el vector pDONR221 P4r-P3r.

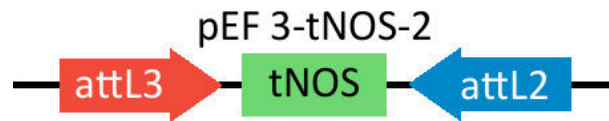
### **3.1.3. Construcción de vectores para la sobreexpresión y silenciamiento de la isoforma 2 de la HMG-CoA reductasa y la esterol C22 desaturasa de tomate.**

Para generar las construcciones de sobreexpresión y silenciamiento de HMGR2 y SD se utilizaron tres promotores distintos. Uno de ellos fue el promotor del virus del mosaico de la coliflor CaMV 35S, de expresión fuerte y constitutiva. Los otros dos fueron los promotores E8 y PLI, que se expresan de forma específica en distintas etapas del desarrollo y maduración del fruto. El promotor E8 presenta una expresión muy baja en el estadio verde maduro y se induce fuertemente durante la maduración del fruto, llegando a su expresión máxima en el fruto maduro (He et al., 2008; Estornell et al., 2009). El promotor PLI codifica la proteína plastídica ELIP (“early light-inducible protein”) y se expresa desde las primeras etapas de desarrollo del fruto con un incremento constante a lo largo del desarrollo y maduración del fruto (Estornell et al., 2009). Los vectores Gateway conteniendo los promotores 35S, E8 y PLI fueron obtenidos del repositorio de plásmidos Addgene (Estornell et al., 2009). Estos vectores poseen la secuencia de dichos promotores entre los sitios attL1 y attL4 y fueron designados pEF 1-35S-4, pEF 1-E8-4, pEF 1PLI-4 (Figura 13).

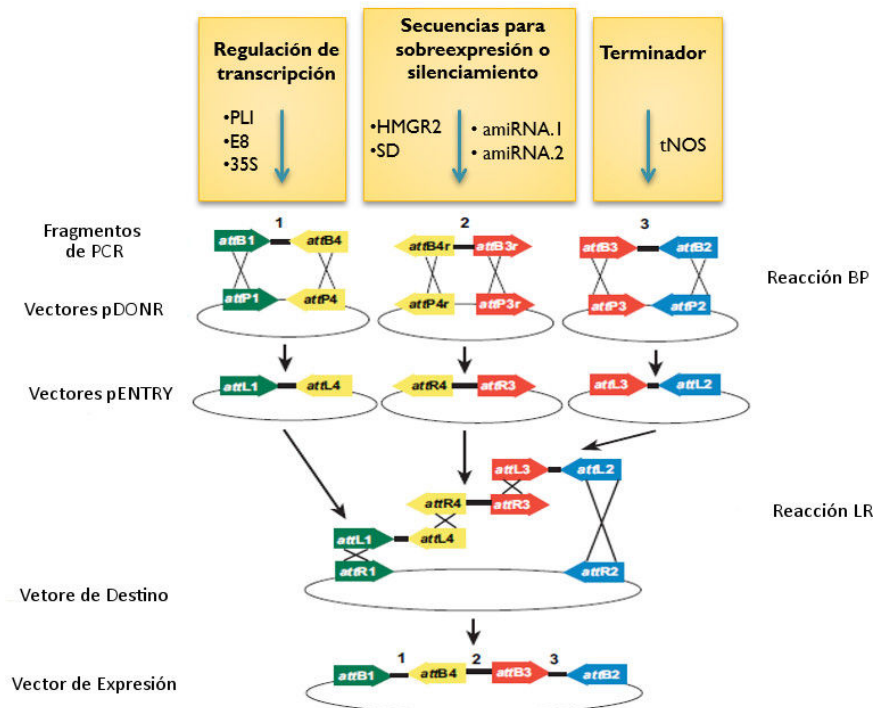


**Figura 13. Representación esquemática de los vectores pENTRY conteniendo los promotores CaMV35S, E8 y PLI.** Representación esquemática (no dibujada a escala) de los vectores pENTRY pEF 1-35S-4, pEF 1-E8-4 y pEF 1-PLI-4 generados mediante la recombinación BP de las secuencias de los promotores CaMV35S, E8 y PLI con el vector pDONR221 P1-P4 (Estornell et al., 2009)

Como secuencia terminadora de la expresión de las secuencias clonadas en las construcciones de interés se utilizó el gen de la nopalina sintasa (tNOS) de *Agrobacterium tumefaciens*. Para amplificar dicha secuencia se diseñaron *primers* específicos que contenían las secuencias attB3 en el extremo 5' del *primer* "forward" y attB2 en el extremo 5' del *primer* "reverse" (ver Anexo I). Los productos de amplificación fueron separados en un gel de agarosa, purificados y verificados mediante secuenciación. La secuencia del terminador tNOS flanqueada con los sitios de recombinación attB3 y attB2 fue recombinada del mismo modo con el vector pDONR221 para generar el vector pENTRY denominado pEF 3-tNOS-2.



**Figura 14. Representación esquemática del vector pENTRY que contiene la secuencia del terminador tNOS.** Representación esquemática (no dibujada a escala) del vector pENTRY pEF 3-tNOS-2 generado mediante la recombinación BP de la secuencia del terminador del gen nopalina sintasa y el vector pDONR221 P3-P2.



**Figura 15. Esquema de la estrategia de recombinación múltiple del sistema Gateway.**

Figura ilustrativa de la estrategia de la triple recombinación para generar los distintos vectores de expresión.

Como vector de destino final para generar las construcciones que se utilizaron para la generación de las plantas transgénicas se usó el vector binario pKGW,0 (Karimi et al., 2002). Los vectores de expresión y silenciamiento se obtuvieron mediante la recombinación de los

plásmidos descritos anteriormente en distintas combinaciones y siguiendo la estrategia mostrada en la Figura 15. Los vectores pENTRY utilizados y los vectores de expresión resultantes se indican en la Tabla 1. Todos los vectores de expresión generados fueron digeridos con enzimas de restricción diagnósticas para comprobar que la recombinación se había producido de forma correcta y posteriormente secuenciados para la verificación de la secuencia de nucleótidos y que la pauta de lectura fuera la correcta.

**Tabla 1. Vectores de expresión creados por recombinación.** Lista de vectores creados mediante recombinación LR de los plásmidos pENTRYs con el vector pKGW,0 para generar los plásmidos de expresión para el estudio de la regulación de la biosíntesis de esteroides en tomate.

Vector de destino	pENTRYs recombinados		Vector de expresión resultante	
pKGW,0	pEF 1-35S-4	pEF 4r-HMGR2-3r	pEF 3-tNOS-2	pXC 35S:H2
		pEF 4r-SD-3r		pXC 35S:SD
		pEF 4r-amiHMGR2.1/.2-3r		pXC 35S:amiH2.1/.2
		pEF 4r-amiSD.1/.2-3r		pXC 35S:amiSD.1/.2
	pEF 1-E8-4	pEF 4r-HMGR2-3r	pEF 3-tNOS-2	pXC E8:H2
		pEF 4r-SD-3r		pXC E8:SD
		pEF 4r-amiHMGR2.1/.2-3r		pXC E8:amiH2.1/.2
		pEF 4r-amiSD.1/.2-3r		pXC E8:amiSD.1/.2
	pEF 1-PLI-4	pEF 4r-HMGR2-3r	pEF 3-tNOS-2	pXC PLI:H2
		pEF 4r-SD-3r		pXC PLI:SD
		pEF 4r-amiHMGR2.1/.2-3r		pXC PLI:amiH2.1/.2
		pEF 4r-amiSD.1/.2-3r		pXC PLI:amiSD.1/.2

### 3.1.4. Generación de plantas de tomate transgénicas para la sobreexpresión y silenciamiento de HMGR2 y SD.

El protocolo de transformación puesto a punto para la generación de plantas transgénicas de tomate consistió en una modificación de los protocolos descritos por

McCormick (1997) y Fernandez et al. (2009). El método utilizado se basa en la infección de cotiledones de tomate con una cepa de *A. tumefaciens* portadora del plásmido Ti que contiene el T-DNA con las construcciones de interés. Dicho método se describe con detalle en el apartado 6.1.4 de Materiales y Métodos.

De forma previa a la transformación, los distintos vectores generados en el apartado anterior fueron introducidos en la cepa de *A. tumefaciens* EHA105 mediante electroporación. Tras la transformación se realizó la comprobación de que los clones seleccionados contuvieran el plásmido Ti correcto mediante análisis por PCR y digestiones con enzimas de restricción diagnósticas para cada construcción.

El proceso de transformación utilizado dura entre 5 y 7 meses. Este periodo cubre desde la etapa inicial de transformación de los cotiledones hasta la obtención de las semillas de la primera generación de plantas transgénicas (T1). El tiempo y el espacio físico que se necesita para el manejo del material biológico que se genera a lo largo del proceso de transformación hizo necesario generar las plantas transgénicas en distintas tandas. Para la puesta a punto del sistema de transformación se utilizaron las construcciones pXC E8:amiSD.1 y pXC E8:amiSD.2, diseñadas para el silenciamiento de la enzima SD durante la maduración de fruto. A título ilustrativo se indican a continuación las distintas etapas del proceso de transformación correspondientes a dichas construcciones.

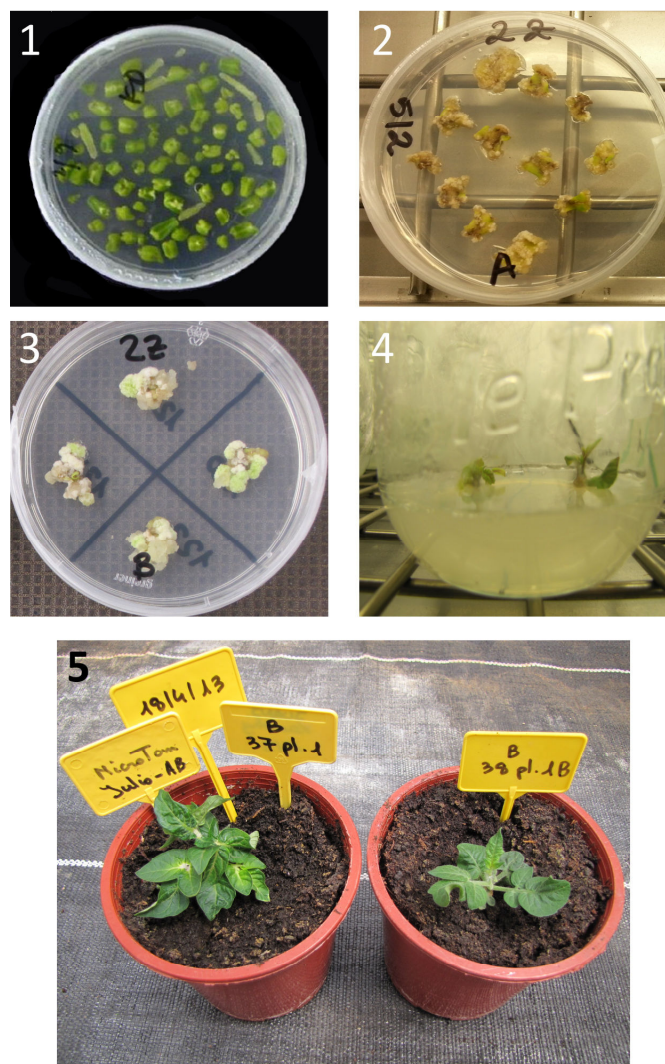
Tras la transformación de los cotiledones de tomate se colocan en placas de Petri (Figura 16 - 1), donde se inicia la formación de callos en los explantes (Figura 16 - 2) para dar paso a la regeneración de brotes en los mismos (Figura 16 - 3). Con la regeneración de brotes, se da un primer trasplaso de los brotes a nuevas jarras para su consiguiente enraizamiento (Figura 16 - 4) previo al paso final de ser trasplantados a tierra y aclimatados en invernadero (Figura 16 - 5).



Se regeneraron un total de 10 plantas T0 (6 plantas para la construcción pXC E8:amiSD.1 y 4 plantas para la construcción pXC E8:amiSD.2) de las cuales 9 mostraron contener el transgén correspondiente tras un análisis mediante PCR utilizando *primers* específicos para cada transgén. Dichas plantas dieron frutos que, desafortunadamente, no contenían semillas. Las causas de ello no se han podido determinar pero ciertamente creó un problema grave ya que no permitió continuar el posterior análisis de estas líneas transgénicas.

Para la segunda tanda de transformación se utilizaron las construcciones pXC PLI:amiH2.1 y PLI:amiH2.2, diseñadas para el silenciamiento de HMGR2 durante el desarrollo y maduración del fruto. En este caso se regeneraron 14 plantas, de las cuales se identificaron 11 que contenían al menos una copia del transgén tras el análisis mediante PCR utilizando *primers* específicos. De las 11 plantas que tenían el transgén: 3 contenían la construcción pXC PLI:amiH2.1 y 8 la construcción pXC PLI:amiH2.2. Estas plantas se nombraron amiH2-PLIa, amiH2-PLIb, amiH2-PLIc, amiH2-PLId, amiH2-PLIe, amiH2-PLIf, amiH2-PLIg and amiH2-PLIh, amiH2-PLIi, amiH2-PLIj and amiH2-PLIk. De cada una de estas plantas se recolectaron muestras de hoja y de frutos en distintos estadios de desarrollo. En todos los casos se pudieron obtener semillas.

La tercera tanda de transformación se realizó con los vectores pXC-E8:SD, pXC-E8:amiH2.1 y pXC E8:amiH2.2, diseñadas para la sobreexpresión de SD (construcción pXC E8:SD) y el silenciamiento de HMGR2 (construcciones E8:amiH2.1 y pXC E8:amiH2.2) durante la maduración del fruto. En el caso de la construcción pXC-E8:SD1 se obtuvieron 4 plantas T0 que se denominaron oeSD-E8a, oeSD-E8b, oeSD-E8c y oeSD-E8d. Solamente 2 de estas plantas (oeSD-E8a, oeSD-E8b) produjeron una cantidad considerable de frutos antes de morir y solo oeSD1-E8a dio frutos con semillas. Al tener únicamente una planta con frutos que produjeran semillas, se dejó madurar todos los frutos a expensas de no poder recolectar muestras de frutos para su posterior análisis. En el caso de pXC E8.amiH2.1 y pXC E8.amiH2.2 se regeneraron 12 plantas T0, de las cuales 10 contenían al menos una copia del transgén insertado en el genoma. Estas plantas se denominaron amiH2-E8a, amiH2E-8b, amiH2-E8c, amiH2-E8d, amiH2-E8e, amiH2-E8f, amiH2-E8g, amiH2-E8h, amiH2-E8i y amiH2-E8j.



**Figura 16. Etapas de la generación de plantas transgénicas de tomate.** Descripción de las diferentes fases que ocurren durante la transformación de tomate. 1) Cotiledones transformados en medio 2Z. 2) Cotiledones durante la generación de callos. 3) Explantes regenerados en los callos de los cotiledones transformados. 4) Plantas regeneradas en medio para enraizamiento. 5) Plantas transformadas aclimatadas después del traspaso de plantas enraizadas a tierra.

En la cuarta tanda de transformación se utilizaron los vectores pXC 35S:amiSD.1, pXC E8:amiSD.1, pXC E8:amiSD.2, pXC 35S:SD1, pXC 35S:H2 y pXC E8:H2. Las plantas transgénicas seleccionadas se encuentran creciendo en el invernadero, hecho por el cual no han podido ser caracterizadas en el presente trabajo.

### **3.1.5. Elaboración de un método para la estimación del número de copias de un transgén insertadas en el genoma.**

Con la generación de las plantas transgénicas de tomate es necesario identificar las plantas en las próximas generaciones que sean homocigotas para el transgén de análisis. De manera convencional la homocigosis se alcanza en la 3<sup>ra</sup> o 4<sup>ta</sup> generación mediante la identificación a la resistencia al marcador de selección en la población segregante, pero esto demanda mucho tiempo y trabajo, es por esto que se evaluó un método que lograra discernir entre líneas homocigotas, heterocigotas o acigotas en la segunda generación de plantas.

La transformación genética de plantas se ha vuelto un procedimiento básico para el estudio y análisis funcional de genes en plantas, es por esto que es necesario determinar con rapidez, confianza y con un método de fácil y bajo costo la cigosidad de las plantas. Con el desarrollo constante de nuevas tecnologías, la Real-Time qPCR resultó ser una herramienta poderosa para la cuantificación del número de copias de un gen mediante su amplificación.

La inserción de nuevo material genético, DNA, mediante transformación por *A. tumefaciens* resulta ser totalmente aleatorio en el genoma de la planta, donde uno o más eventos pueden ocurrir de forma simultánea. En organismos transformados donde más de 2 eventos de integración de un mismo gen han ocurrido, es donde se presentan los niveles de expresión más bajos e incluso una expresión inestable. Debido a esto, la correcta determinación del número de transgenes insertados a una planta transformada es de vital

importancia para el correcto análisis de las distintas características que las plantas transgénicas pueden presentar.

El número de copias transgénicas usualmente es estimado mediante análisis de Southern Blot, un método de biología molecular más clásica. Este procedimiento indica el número de copias integradas en el genoma usando sondas específicas del gen de interés para ser hibridadas en el gDNA previamente digerido con enzimas de restricción, pero esto puede ser un protocolo costoso, demandante de tiempo y se necesita gran cantidad de material de partida. Además, si existe la presencia de copias integradas que han sido genéticamente “rearrregladas” la estimación puede ser incorrecta. Este proceso de selección creó la necesidad de implementar un método más rápido al momento de diferenciar y seleccionar las líneas homocigotas en las primeras generaciones. La técnica de Real-Time qPCR es una herramienta muy versátil que gracias a su fácil implantación, bajos costos, sensibilidad y alta confiabilidad permite hacer un análisis del número de copias insertadas en el genoma de un organismo partiendo de muy poco material genético (Ingham et al., 2001; Weng et al., 2004; Shepherd et al., 2009; Chen and Lin, 2010).

Usando esta técnica de Real-Time qPCR se han desarrollado anteriormente otros métodos para estimar el número de copias insertadas en plantas transgénicas. La desventaja de estos métodos es la necesidad de contar con algún tipo de control que permita normalizar los resultados. Schmidt and Parrott (2001) Establecieron un método de cuantificación absoluta usando curvas estándares a partir de un plásmido con la secuencia analizada del cual se conoce con exactitud la concentración de DNA y el peso molecular. Por otra parte Mason et al. (2002) y Shou et al. (2004) utilizan una cuantificación relativa, obviando la necesidad de crear una curva estándar para la cuantificación precisa del material genético usado pero teniendo la necesidad de una planta calibradora donde se conozca con certeza el número de copias, mediante otro método como el Southern Blotting (Shou et al., 2004), o asumiendo que una planta de las transgénicas generadas posee una sola inserción del transgén en su genoma (Mason et al., 2002). Ingham et al. (2001) demostraron un método muy confiable para la discriminación entre 1 o 2 copias insertadas en plantas transformadas usando el

método comparativo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  pero al costo de nuevamente la necesidad de una planta control, donde el número de inserciones es conocido, y usando sondas TaqMan.

En este estudio se usó la técnica de Real-Time qPCR usando SYBRGreen para la detección de la fluorescencia en las fases de amplificación, combinada con el método comparativo  $2^{-\Delta Ct}$ , donde no hace falta tener una planta control, ni un gen calibrador para la normalización de la cantidad de DNA usada en cada reacción. Usando como gen calibrador el Lat52 (Yang et al., 2005) es posible determinar evaluar el número de copias en el genoma de las plantas transformadas en la T0, y el posterior análisis de las plantas segregante para determinar la cigosidad de las mismas, y que puede ser fácilmente aplicado a cualquier material vegetal donde se conozca un gen homocigoto de copia única.

Un componente limitante para conocer el número estimado de copias de un transgén insertadas en el genoma de un organismo transformado, es el previo conocimiento de un gen que se encuentre y haya sido determinado como uno de copia única en el genoma del organismo de estudio. En este contexto Yang et al. (2005) validaron el gen Lat52 como un referente endógeno de copia única específico de tomate para la detección cuantitativa y cualitativa de tomates transgénicos. Para nuestro estudio usaremos la misma información generada por Yang y colaboradores para determinar el número de copias de un transgén transferidos al genoma de tomate mediante la transformación por *A. tumefaciens* en plantas T0, de las cuales luego se determinará la cigosidad.

Con este antecedente se analizaron por Real-Time qPCR, 8 plantas de la T0 de las plantas transgénicas con la construcción pXC PLI:amiH2.1 y pXC PLI:amiH2.2 para detectar el número de copias insertadas en el genoma (Tabla 2). Como primer paso diseñaron y evaluaron los *primers* para el gen Lat52 y para la construcción pXC PLI:amiH2.1 y PLI:amiH2.2 (ver Anexo I). La eficiencia de los *primers* fue evaluada y se determinó que fue de 96.28% para los primers Lat1 y Lat2.1 (gen Lat52) y de 99.04% para los *primers* qPCR.PLI.amiH2.fw y qPCR.PLI.amiH2.fw (pXC PLI:amiH2.1/.2).

Para calcular el número de copias insertadas en el genoma de las plantas transgénicas de tomate, se usó el gDNA extraído de las hojas de las plantas antes mencionadas. La reacción de Real-Time qPCR se realizó usando SYBR Green como indicador de la reacción. Se realizaron reacciones por triplicado para cada pareja de *primers* en cada planta analizada, los valores de Ct obtenidos del software LightCycler 480 luego fueron analizados. Para obtener el número de copias de cada planta se usó la diferencia entre el Ct de los *primers* qPCR.amiH2 ( $C_{t\text{amiH2}}$ ) y los *primers* para el gen Lat52 ( $C_{t\text{Lat}}$ ) y 2 elevado a esta diferencia ( $2^{C_{t\text{amiH2}} - C_{t\text{Lat}}}$ ).

**Tabla 2. Número de copias de la primera generación de plantas transgénicas.**

Tabla de líneas generadas en la T0 donde se analizó el número de eventos insertados en el genoma de las plantas transformadas.

Plantas	$\Delta Ct$	$\sigma \Delta Ct$	# de copias	$\sigma$ # de copias
amiH2-PLIa	-0.25333	0.179536	<b>0.838</b>	0.104404
amiH2-PLIb	-1.42667	0.080416	<b>0.371</b>	0.020735
amiH2-PLIc	-11.8633	0.471275	<b>0</b>	8.77E-05
amiH2-PLId	-0.97333	0.077889	<b>0.509</b>	0.027498
amiH2-PLIe	-0.00667	0.03	<b>0.995</b>	0.020699
amiH2-PLIf	0.153333	0.084656	<b>1.112</b>	0.065259
amiH2-PLIg	-0.56667	0.130384	<b>0.675</b>	0.061019
amiH2-PLIh	-1.05	0.099499	<b>0.482</b>	0.033309

La Tabla 2 nos indica el número de copias para las plantas transgénicas usadas para este experimento, los valores cercanos o aproximados a 0.5 indican que el número de copias del transgén evaluado es igual a la mitad del número de copias encontradas del gen Lat52 en el genoma del tomate. Como se mencionó antes, se conoce que el gen Lat52 es un gen homocigoto de copia única en el tomate, lo que entonces señala que el transgén está presente de forma hemocigota en el genoma, encontrándose por tanto un solo evento de inserción durante la transformación. Los valores cercanos a 1 muestran un doble evento de inserción

del transgén, ya que posee el mismo valor que el gen homocigoto Lat52, mientras que por obvias razones, los valores de 0 indican una ausencia de transgén en la muestra.

Con el conocimiento del número de copias del transgén insertadas en las líneas de la primera generación, T0, es posible calcular el número de copias de la segunda generación y de esta manera inferir la homocigosis o heterocigosis de las plantas. Cuando la línea parental posee una copia insertada, la generación que continúa por consiguiente solo podrá presentar 3 escenarios: plantas homocigotas, hemicigotas o acigotas. La Tabla 3, Tabla 4 y Tabla 5 presentan a las líneas amiH2-PLId, amiH2-PLIg y amiH2-PLIh respectivamente, mostrando el resultado del análisis de la cigosidad de las plantas de la segunda generación, T1. En el análisis de la segunda generación de plantas transgénicas se busca un valor de 1, a diferencia del análisis de la T0 donde se buscaban valores aproximados a 0.5. Esto es debido a que en la T1, se pretende identificar líneas homocigotas al transgén de estudio, por lo que es importante tener valores similares o iguales que el gen control Lat52.

De acuerdo a los resultados de la Tabla 3 obtenidos y basados en que la planta amiH2-PLId posee una sola inserción hemicigota, se deduce que se han generado 1 planta homocigota, 1 planta heterocigota y 2 plantas acigotas.

**Tabla 3. Cigosidad de las plantas de la segunda generación de las plantas amiH2-PLId.** Tabla de las plantas de la T1 de la planta amiH2-PLId en donde se analizó la cigosidad de las plantas.

<b>amiH2-PLId</b>				
<b>Plantas</b>	<b><math>\Delta Ct</math></b>	<b><math>\sigma \Delta Ct</math></b>	<b># de copias</b>	<b><math>\sigma</math> # de copias</b>
<b>amiH2-PLId1</b>	-11.355	0.474	<b>0</b>	0
<b>amiH2-PLId2</b>	0.127	0.073	<b>1.092</b>	0.055
<b>amiH2-PLId 3</b>	0	0	<b>0</b>	0
<b>amiH2-PLId 4</b>	-1.053	0.096	<b>0.482</b>	0.032

**Tabla 4. Cigosidad de las plantas de la segunda generación de la planta amiH2-PLlg.** Tabla de las plantas de la T1 de la planta amiH2-PLlg en donde se analizó la cigosidad de las plantas.

<b>amiH2-PLlg</b>				
<b>Plantas</b>	<b><math>\Delta Ct</math></b>	<b><math>\sigma \Delta Ct</math></b>	<b># de copias</b>	<b><math>\sigma</math> # de copias</b>
<b>amiH2-PLlg1</b>	-0.527	0.048	<b>0.694</b>	0.023
<b>amiH2-PLlg 2</b>	0.5	0.047	<b>1.414</b>	0.046
<b>amiH2-PLlg 3</b>	-0.58	0.094	<b>0.669</b>	0.044
<b>amiH2-PLlg 4</b>	0.573	0.056	<b>1.488</b>	0.058
<b>amiH2-PLlg 5</b>	-0.54	0.098	<b>0.688</b>	0.047
<b>amiH2-PLlg 6</b>	-0.533	0.045	<b>0.691</b>	0.022
<b>amiH2-PLlg 7</b>	-10.497	1.909	<b>0</b>	0.001
<b>amiH2-PLlg 8</b>	0.407	0.016	<b>1.326</b>	0.015
<b>amiH2-PLlg 9</b>	0.517	0.054	<b>1.431</b>	0.054
<b>amiH2-PLlg 10</b>	-11.238	0.927	<b>0</b>	0

De la misma manera, los resultados de la Tabla 4 para la planta amiH2-PLlg que posee una sola inserción hemicigota se deduce que se han encontrado 4 plantas homocigotas, 4 plantas heterocigotas y 2 plantas acigotas. Por último los resultados de la Tabla 5 para la línea amiH2-PLlh nos muestran que se encontraron 2 plantas homocigotas, 6 plantas heterocigotas y 2 plantas acigotas.



**Tabla 5. Cigosidad de las plantas de la segunda generación de la planta amiH2-PLlh.** Tabla de las plantas de la T1 de la planta amiH2-PLlh en donde se analizó la cigosidad de las plantas.

amiH2-PLlh				
Plantas	$\Delta Ct$	$\sigma \Delta Ct$	# de copias	$\sigma$ # de copias
amiH2-PLlh1	-0.88	0.067	<b>0.543</b>	0.025
amiH2-PLlh2	0	0	<b>0</b>	0
amiH2-PLlh3	-0.833	0.058	<b>0.561</b>	0.022
amiH2-PLlh4	-0.773	0.108	<b>0.585</b>	0.044
amiH2-PLlh5	-10.74	0	<b>0</b>	0
amiH2-PLlh6	-0.757	0.095	<b>0.592</b>	0.039
amiH2-PLlh7	0.107	0.095	<b>1.077</b>	0.071
amiH2-PLlh8	0.3	0.116	<b>1.231</b>	0.099
amiH2-PLlh9	-0.777	0.056	<b>0.584</b>	0.023
amiH2-PLlh10	-0.84	0.065	<b>0.559</b>	0.025

Un método fácil, rápido, fiable y costo-eficiente es necesario cuando se manejan un gran volumen de plantas transgénicas y que a su vez poseen un ciclo de vida extenso, como en el caso del tomate de aproximadamente 6 meses. El uso de la herramienta Real-Time qPCR por su sensibilidad nos permitió evaluar el número de copias que fueron insertadas en el genoma de una planta transformada usando el método comparativo  $2^{-\Delta Ct}$ . Se usó el gen Lat52 como gen control, ya que este está descrito como un gen que se encuentra evaluado de manera homocigota y de una única en el genoma del tomate (Yang et al., 2005). Las plantas amiH2-PLI de tomate transgénicas en la T0 fueron evaluadas usando *primers* específicos para qPCR para determinar el número de copias del transgén transformado en el genoma del tomate. Con estos resultados presentados en la Tabla 2 se logró identificar las líneas que tenían un solo evento de transformación así como otras líneas que poseían 2 o más, o en otros casos ninguna inserción en su genoma. Las plantas que presentaron una única inserción (amiH2-PLId, amiH2-PLIg y amiH2-PLIh) fueron evaluadas en la siguiente generación (T1) para determinar la cigosidad de las mismas. La Tabla 3, Tabla 4 y Tabla

5 muestran estos resultados. Usando este método fue posible evaluar la cigosidad de las plantas en la segunda generación sin necesidad de llegar a una tercera o cuarta, permitiendo ahorrar mucho tiempo, espacio y dinero, probando así esta metodología ser una poderosa herramienta sin la necesidad de utilizar plantas controles de inserciones previamente conocidas, que permitirá el análisis de solamente las plantas que funcionalmente sean importantes para el análisis de genes transformados.

### **3.1.6. Evaluación del número de copias del transgén insertadas y la homocigosis de las líneas transgénicas mediante Real –Time qPCR.**

Por lo general el mejor material transgénico para el estudio funcional de un gen transformado es en las líneas T2 (3<sup>ra</sup> generación) homocigotas, ya que estas presentan la secuencia del transgén en ambos alelos (el tomate es una especie diploide). Las líneas T0 (1<sup>era</sup> generación), que son el material transformado, pueden presentar resultados confusos debido a la alteración por las condiciones de cultivo *in vitro*, condiciones de estrés producidas por la transformación mediante *A. tumefaciens* e incluso pueden ocurrir variaciones somaclonales que interfieran en el estudio de la función de un gen por medio de cambios fenotípicos. Usando el método antes propuesto para el análisis de copias y cigosidad de las plantas transgénicas, se evaluarán las plantas generadas en las transformaciones antes mencionadas.

La T1 (2<sup>da</sup> generación) es la progenie segregante y es donde se encuentran plantas homocigotas, hemicigotas y acigotas como se mencionó en el apartado anterior. El análisis de las líneas transgénicas generadas anteriormente se muestran en la Tabla 6, donde se observan el número de copias para las distintas líneas de las diferentes transformaciones.

**Tabla 6. Número de copias de plantas transgénicas de la primera generación (T0).** Listado del número de copias insertadas en las líneas transgénicas para las construcciones amiHMGR2-PLI, amiHMGR2-E8 y oeSD-E8.

Construcción	Línea	Número de copias
amiHMGR2-PLI	a	0.84
	b	0.37
	c	0.00
	d	0.51
	e	1.00
	f	1.11
	g	0.68
	h	0.48
amiHMGR2-E8	a	2.19
	b	0.51
	c	0.53
	d	2.21
	e	0.51
	f	0.52
	g	1.30
	h	2.05
	i	1.39
oeSD-E8	a	0.90

La construcción amiHMGR2-PLI posee las plantas amiH2-PLId, amiH2-PLIg y amiH2-PLIh (Tabla 6) que muestran un valor que ronda el 0.5, lo que nos indica que existe la mitad de copias del transgén que el gen control Lat52 en esas plantas. Como se conoce que el gen Lat52 es un gen homocigoto de copia única, el valor de 0.5 demuestra que existe una inserción del transgén y la planta es hemicigota. Los valores que sean igual o superior a 1 indican que existe más de 1 copia del transgén en el genoma.

Se sembraron las semillas recolectadas de las plantas transformadas T0 para obtener la T1 de cada construcción. Cuando las plantas T1 presentaron las primeras hojas, se tomó

una punta de la hoja de cada planta para la extracción de gDNA y realizar la Real-Time qPCR para determinar la homocigosis de las plantas. Siguiendo los pasos anteriormente descritos se obtuvieron nuevos datos mostrados en la Tabla 7 similares a los de la tabla anterior pero para las nuevas plantas T1 de cada construcción. Con los datos mostrados en la Tabla 6 y Tabla 7 es posible inferir la homocigosis de las plantas de la nueva generación. Para un mejor entendimiento de cómo se infiere la relación alélica del transgén es primordial entender que para que una planta T1 posea una sola copia homocigota del transgén es necesario que la planta parental T0 haya tenido una inserción en el genoma. En caso de que la planta parental haya tenido 2 o más inserciones, la generación T1 podrá presentar valores similares a 1, lo cual indica 2 copias del transgén o 1 copia homocigota, es por esto que es importante que la línea parental tenga una única inserción. La Tabla 7 muestra las plantas de la T1 para cada construcción que se infiere sean homocigotas, hemicigotas o acigotas.

Para la planta oeSD-E8a se calculó un valor de 0.9 para el número de copias, esto indica que existen al menos 2 inserciones en el genoma de la transgénica. Cuando se realiza el análisis de la cigosidad para la siguiente generación, se obtienen los valores que se muestran en la Tabla 8. Los valores cercanos a 0.5 indican plantas que poseen una sola copia del transgén, valores iguales o superiores 1 puede significar varias opciones como plantas que poseen 2 copias heterocigotas, una copia homocigota o más copias del transgén. Es necesario obtener la siguiente generación de segregantes de estas plantas de copia única para obtener plantas de una copia homocigotas.

**Tabla 7. Cigosidad de las plantas transgénicas de la segunda generación (T1).**

Listado del número de copias insertadas y cigosidad de las líneas transgénicas de la segunda generación para las construcciones amiHMGR2-PLI, amiHMGR2-E8.

Construcción	Línea	Planta	Número de copias	Cigosidad
amiHMGR2-PLI	d	1	-	Acigoto
		2	1.09	HOMOCIGOTO
		3	-	Acigoto
		4	0.48	Heterocigoto
	g	1	0.69	Heterocigoto
		2	0.67	Heterocigoto
		3	0.69	Heterocigoto
		4	0.69	Heterocigoto
		5	-	Acigoto
		6	1.33	HOMOCIGOTO
		7	0.54	Heterocigoto
		8	-	Acigoto
	h	1	-	Acigoto
		2	0.56	Heterocigoto
		3	0.59	Heterocigoto
		4	-	Acigoto
		5	0.59	Heterocigoto
		6	1.08	HOMOCIGOTO
		7	1.23	HOMOCIGOTO
8		0.58	Heterocigoto	
9		0.56	Heterocigoto	
amiHMGR2-E8	b	1	0.45	Heterocigoto
		2	0.96	HOMOCIGOTO
		3	-	Acigoto
		4	0.47	Heterocigoto
		5	-	Acigoto
	c	1	-	Acigoto
		2	0.48	Heterocigoto
		3	0.51	Heterocigoto
		4	0.52	Heterocigoto
	f	1	0.48	Heterocigoto
		2	0.48	Heterocigoto
		3	-	Acigoto
		4	-	Acigoto

**Tabla 8. Número de copias de plantas transgénicas de la segunda generación (T1) de la construcción oeSD-E8.** Listado del número de copias insertadas en las líneas transgénicas de la segunda generación de la construcción oeSD-E8.

Construcción	Línea	Planta	Número de copias
oeSD-E8	a	1	1.87
		2	1.93
		3	0.71
		4	1.74
		5	1.44
		6	1.71
		7	0.44
		8	0.00
		9	0.44
		10	0.22
		11	1.05
		12	0.27
		13	0.60
		14	0.25
		15	0.27
		16	1.04
		17	0.34
		18	0.98
		19	0.86
		20	0.44
		21	0.82
		22	1.59
		23	1.60
		24	1.59
		25	0.45

Para optimizar el tiempo de trabajo y reducir el espacio físico en laboratorio e invernadero se utilizó el método fácil y confiable que permitió el análisis temprano de las líneas transgénicas generadas que logró determinar el número de copias insertadas del transgén en el genoma así como la cigosidad de las mismas. Para esto se usó la herramienta biotecnológica Real-Time qPCR que permitió el examen del número de copias insertadas en la primera generación de plantas, y usando esta primera información fue posible evaluar la

progenie en la segunda generación y evaluar la cigosidad de las plantas obtenidas. Este método demostró ser más fácil y costo-efectivo que su contraparte clásica el Southern Blot, lo que da pie a un análisis anticipado de las plantas ahorrando precisamente gran cantidad de tiempo.

### **3.1.7. Análisis de plantas transgénicas con niveles de expresión silenciados de la enzima HMGR2**

El primer aspecto que se abordó fue el de determinar los niveles de expresión del gen que codifica para la isoforma HMGR2 en los frutos de las plantas transgénicas T1 homocigotas diseñadas para el silenciamiento de la expresión del gen HMG2 durante el desarrollo y maduración del fruto (plantas amiH2-PLI) o únicamente durante la maduración del fruto (plantas amiH2-E8). Para ello se procedió a la cuantificación de los niveles del transcrito HMGR2 mediante Real-Time qPCR utilizando muestras de RNA extraídas de frutos en distintos estadios de desarrollo y maduración.

#### **3.1.7.1. Análisis de las plantas amiH2-PLI**

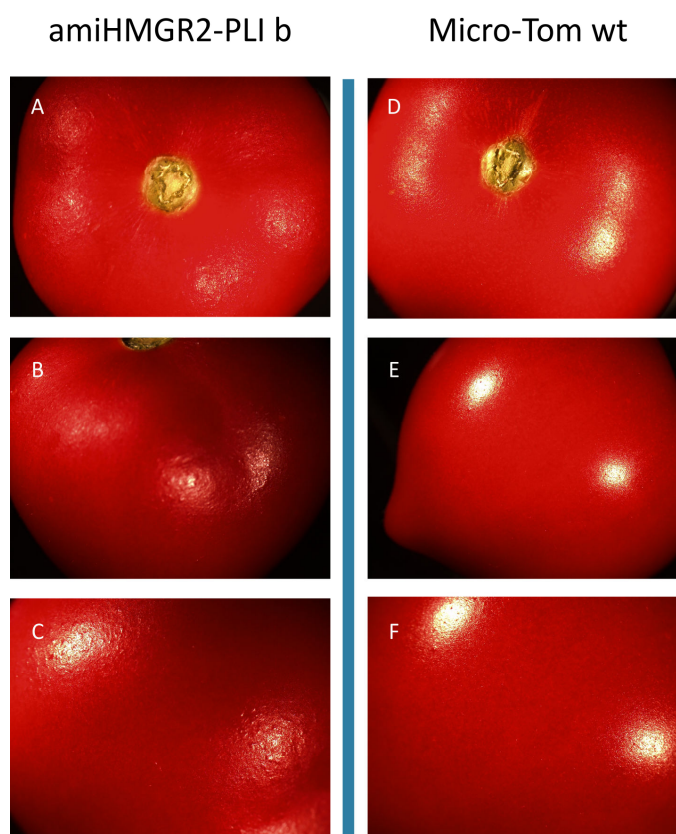
Una de las plantas transformadas con la construcción amiHMGR2-PLI presentó características a nivel de epidermis distintas a un tomate wt. La línea amiHMGR2-PLI b mostró cambios en su textura, donde la piel del tomate de la planta presentaba un aspecto rugoso y con protuberancias, así como un color opaco y una falta de brillo. Estos resultados se muestran en la Figura 17, donde se comparan las texturas de la epidermis de la línea amiHMGR2-PLI b y un tomate wt observados mediante la ayuda de un estereomicroscopio acoplado a una cámara Olympus DP71. Las imágenes A, B y C muestran la textura rugosa y falta de brillo del tomate transgénico con respecto a una textura más lisa y brillante de la de un tomate wt (D, E y F). Aunque hubo una cantidad considerable de frutos rojos muy pocos

tuvieron semillas. Las semillas que fue posible recolectar no lograron sobrevivir cuando fueron sembradas para buscar la siguiente generación, por lo que no fue posible continuar la búsqueda de este fenotipo en las plantas segregantes.

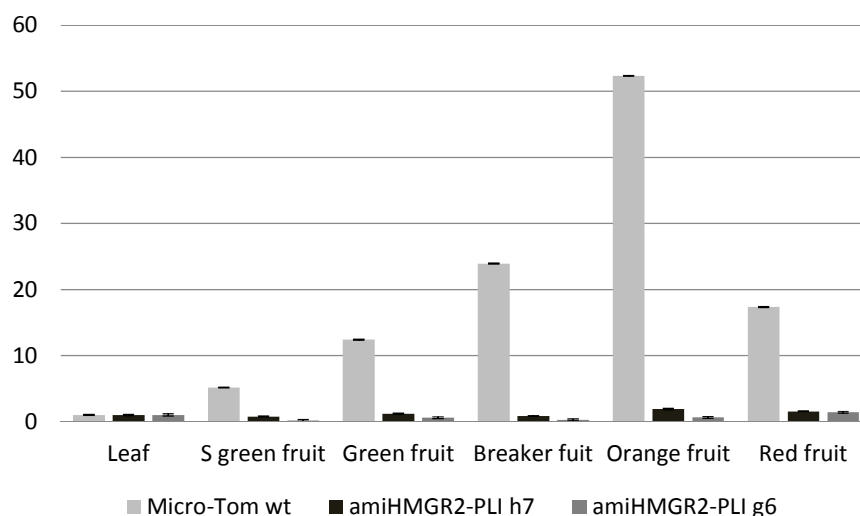
Las líneas amiH2-PLI<sub>g6</sub> y amiH2-PLI<sub>h7</sub>, ambas homocigotas según se indica en la Tabla 7, fueron analizadas mediante Real-Time qPCR para medir el nivel de expresión del gen HMGR2 en hojas y en frutos en distintos estadios de desarrollo y maduración. Los niveles de expresión se compararon con muestras equivalente aisladas de planta Micro-Tom wt crecidas en las mismas condiciones. Los resultados mostrados en la Figura 18 muestran de forma clara que la inducción de la expresión del gen que codifica para HMGR2 que se produce durante la maduración está bloqueada en los frutos de ambas líneas transgénicas.

A pesar del fuerte silenciamiento de la expresión del gen HMGR2, no se notaron cambios ni en el tiempo de maduración ni en la coloración final del fruto. Con tal de comparar los mismos estadios de desarrollo y maduración de los frutos se realizó un marcaje de las flores para registrar el número de días post-antesis (DPA) y, a partir de aquí, analizar el tiempo necesario para alcanzar los distintos estadios de maduración.





**Figura 17. Texturas de la epidermis de un fruto rojo amiHMGR2-PLI b y tomate Micro-Tom wt.** Fotografías de la comparación de la epidermis de un tomate madura de la línea transgénica amiHMGR2-PLI b (A, B y C) y un tomate maduro wt (D, E y F). Las imágenes A y D muestran un toma de la parte superior de los tomates, las imágenes B y E una toma lateral mientras que las C y F son un acercamiento del lateral de los frutos.

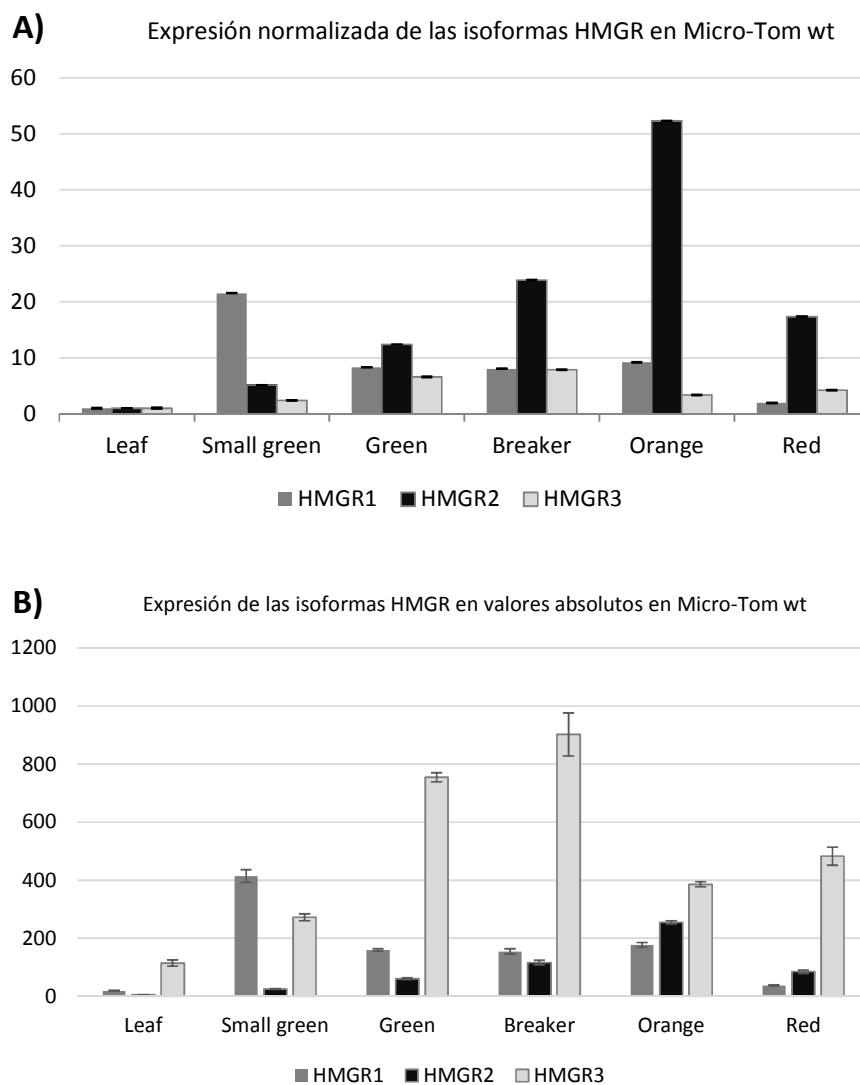


**Figura 18. Expresión del gen HMGR2 en líneas amiH2-PLI y tomate wt.** Comparación del nivel de expresión de la isoforma HMGR2 en los distintos estadios del fruto de tomate entre Micro-Tom wt y líneas transgénicas amiHMGR2-PLI g6 y amiHMGR2-PLI h7.

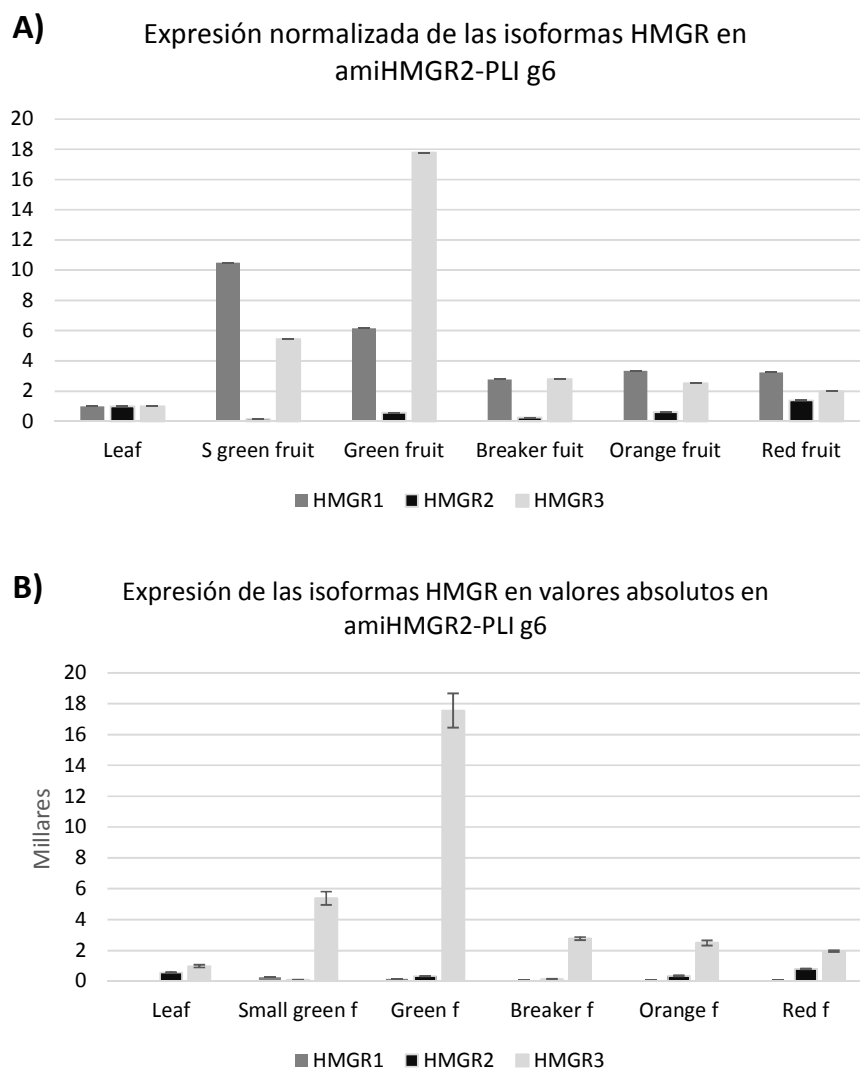
La enzima HMGR2 está directamente involucrada en la maduración del fruto de tomate, donde se conoce que su expresión aumenta y tiene una relación inversa con la expresión de la isoforma HMGR1 (Rodriguez-Concepcion and Gruissem, 1999). Al no observar ningún tipo de cambios que afectara la maduración del fruto se decidió evaluar la expresión del conjunto de genes que codifican para distintas isoformas de la HMGR en el tomate. Resultados obtenidos recientemente en el grupo habían detectado la expresión del gen que codifica para HMGR3 en el fruto pero sus niveles de expresión no habían sido cuantificados en detalle (Pateraki y Boronat, resultados no publicados). Cabe resaltar que la expresión de HMGR3 en el fruto no había sido descrita previamente en la literatura. Como se muestra en la Figura 19 A, los perfiles de expresión de los transcritos de HMGR1 y HMGR2 en el fruto de las plantas Micro-Tom wt se corresponden con los descritos previamente (Park et al., 1992; Gillaspay et al., 1993; Jenkins, 1996; Rodriguez-Concepcion and Gruissem, 1999). Así, mientras que la expresión del gen HMGR1 es relativamente activa en los frutos jóvenes (fase de división y expansión celular), esta disminuye al inicio del proceso de maduración, período en el cual

se induce fuertemente la expresión del gen HMGR2. Se observa también que la expresión del gen HMGR3 se induce claramente durante la maduración del fruto. Cabe resaltar que los valores de expresión mostrados en la Figura 19 A son relativos a sus correspondientes niveles de expresión en hoja. Sorprendentemente, cuando los niveles de expresión se expresaron en valores absolutos (número de copias del transcrito), se observó que la isoforma HMGR3 se expresa a niveles muy superiores a las demás (Figura 19 B). Los niveles del transcrito HMGR3 son relativamente bajos en hoja en relación al fruto, y dentro de los distintos estadios de maduración del fruto alcanza su mayor nivel en estadio breaker.

También es importante destacar que cuando se estudió la expresión de las isoformas HMGR1, HMGR2 y HMGR3 en las plantas transgénicas amiH2-PLI<sub>g6</sub> y amiH2-PLI<sub>h7</sub>, ambas silenciadas en la expresión del gen HMGR2, se observó un cambio muy drástico en el perfil de expresión de HMG1 y, muy en particular, de HMG3. Los resultados mostrados en las Figura 20 A y B muestran una expresión muy elevada de la isoforma HMGR3 en el fruto verde. La relación de la expresión de la isoforma HMGR3 de la línea amiH2-PLI<sub>g6</sub> entre el fruto verde y la hoja es aproximadamente el doble. Este cambio, si se consideran los valores absolutos, el incremento de relativo de la expresión del gen HMG3 es de aproximadamente 20 veces. La línea amiH2-PLI<sub>h7</sub> presenta un perfil similar al de la línea amiH2-PLI<sub>g6</sub>, aunque las variaciones son menores en la cuantificación absoluta (Figura 21).

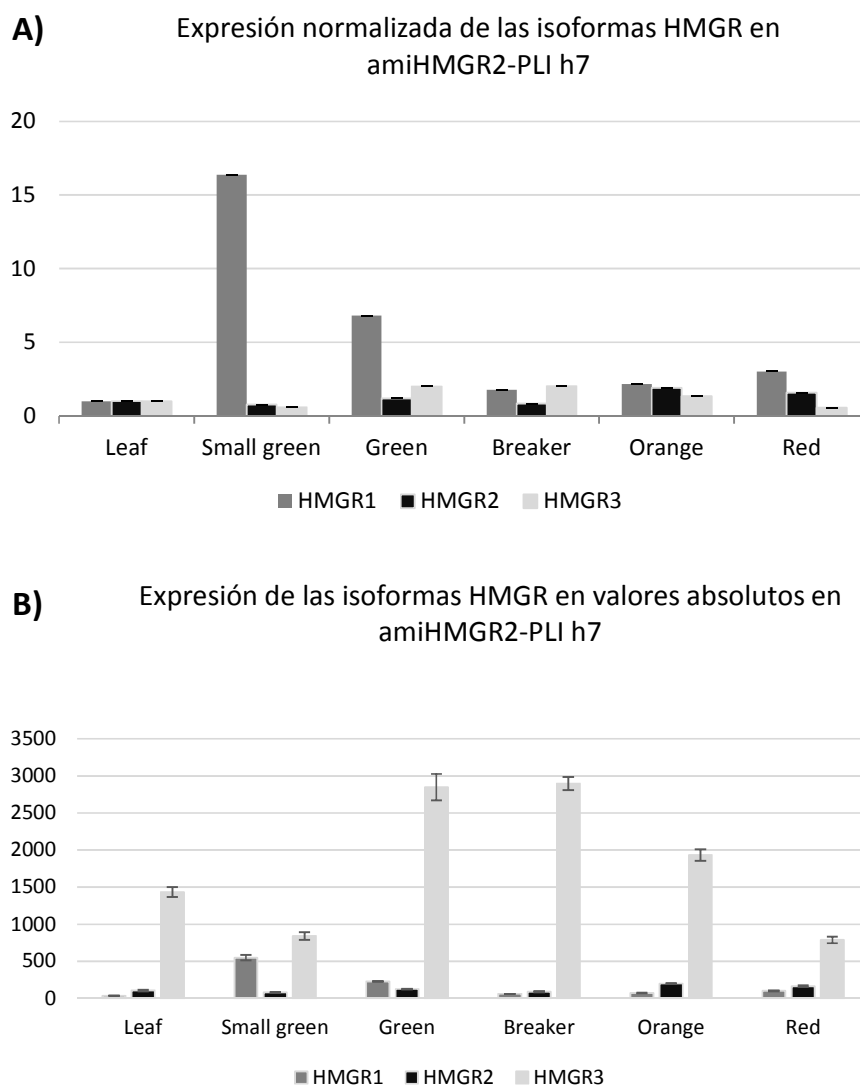


**Figura 19. Expresión de las isoformas HMGR en Micro-Tom wt.** Perfil de expresión de las isoformas de HMGR en los distintos estadios del fruto de tomate wt visualizadas cuando se relativizan al tejido de hoja (**A**) y en valores absolutos de expresión (**B**). Los valores absolutos de expresión en la figura B indican el número de copias de los transcrito evaluados.



**Figura 20. Expresión de las isoformas HMGR en la planta transgénica amiH2-PLI g6.**

Perfil de expresión de las isoformas de HMGR en los distintos estadíos del fruto de la línea amiHMGR2-PLI g6 visualizadas cuando se relativizan al tejido de hoja (A) y en valores absolutos de expresión (B). Los valores absolutos de expresión en la figura B indican el número de copias de los transcrito evaluados.



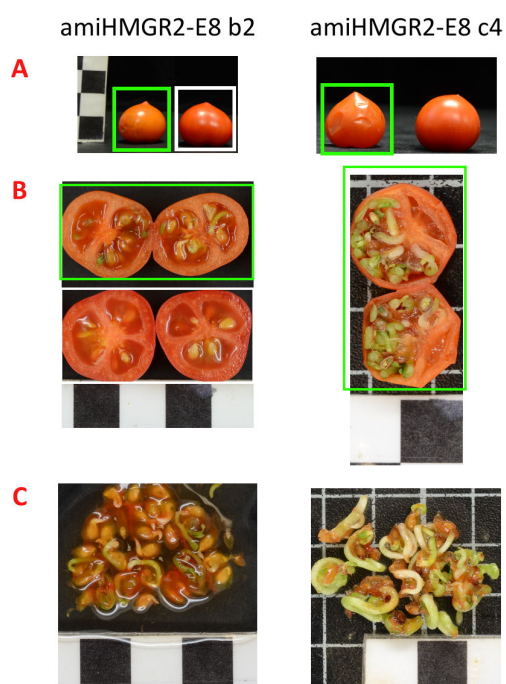
**Figura 21. Expresión de las isoformas HMGR en la planta transgénica amiH2-PLI h7.**

Perfil de expresión de las isoformas de HMGR en los distintos estadios del fruto de la línea amiHMGR2-PLI h7 visualizadas cuando se relativizan al tejido de hoja (**A**) y en valores absolutos de expresión (**B**). Los valores absolutos de expresión en la figura B indican el número de copias de los transcrito evaluados.

### 3.1.7.2. Análisis de las plantas amiH2.E8.

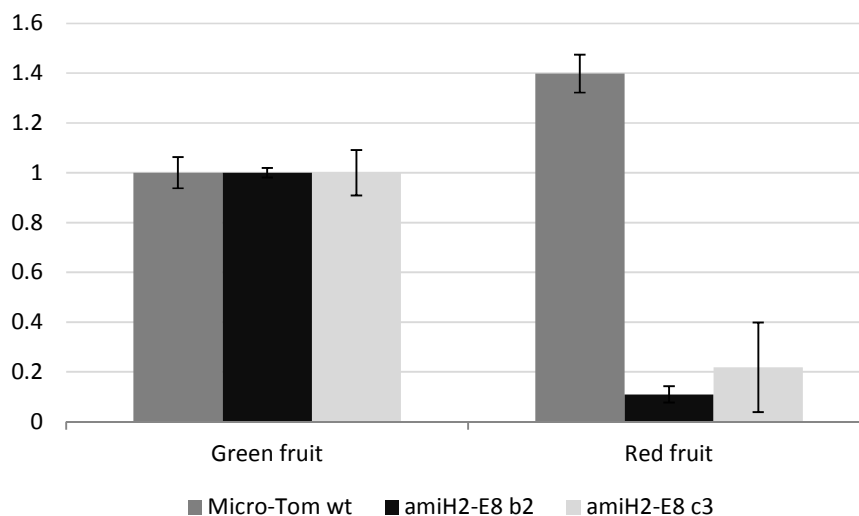
Se analizaron las plantas amiH2-E8b2 (homocigota), amiH2-E8c3 (hemicigota) y amiH2-E8c4 (hemicigota). En este caso tampoco se observaron cambios en los tiempos de desarrollo y maduración de los frutos. No obstante, los frutos de las plantas amiH2-E8b2 y amiH2-E8c4 mostraron un fenotipo particular consistente en la germinación prematura de las semillas en el interior del fruto durante la maduración. Este fenotipo era ya observable indirectamente en las fases avanzadas del proceso de maduración (a partir del estadio “orange”) ya que frutos afectados presentaban protuberancias en la parte externa. En la Figura 22 A, se puede observar la presencia de pequeñas deformaciones y cambios en la rigidez de la epidermis. Al ser cortados por la mitad se apreció la presencia de las semillas germinadas (Figura 22 B).

Las líneas amiHMGR2-E8 b2 y amiHMGR2-E8 c3 fueron analizadas mediante Real-Time qPCR para medir los niveles de expresión de la isoforma HMGR2 en frutos en estadios verde y rojo como se describió anteriormente. Los niveles de expresión fueron comparados con muestras de tomate Micro-Tom wt en los mismos estadios. Los resultados mostrados en la Figura 23 muestran el silenciamiento de la expresión de la isoforma HMGR2 en ambas plantas transgénicas analizadas.



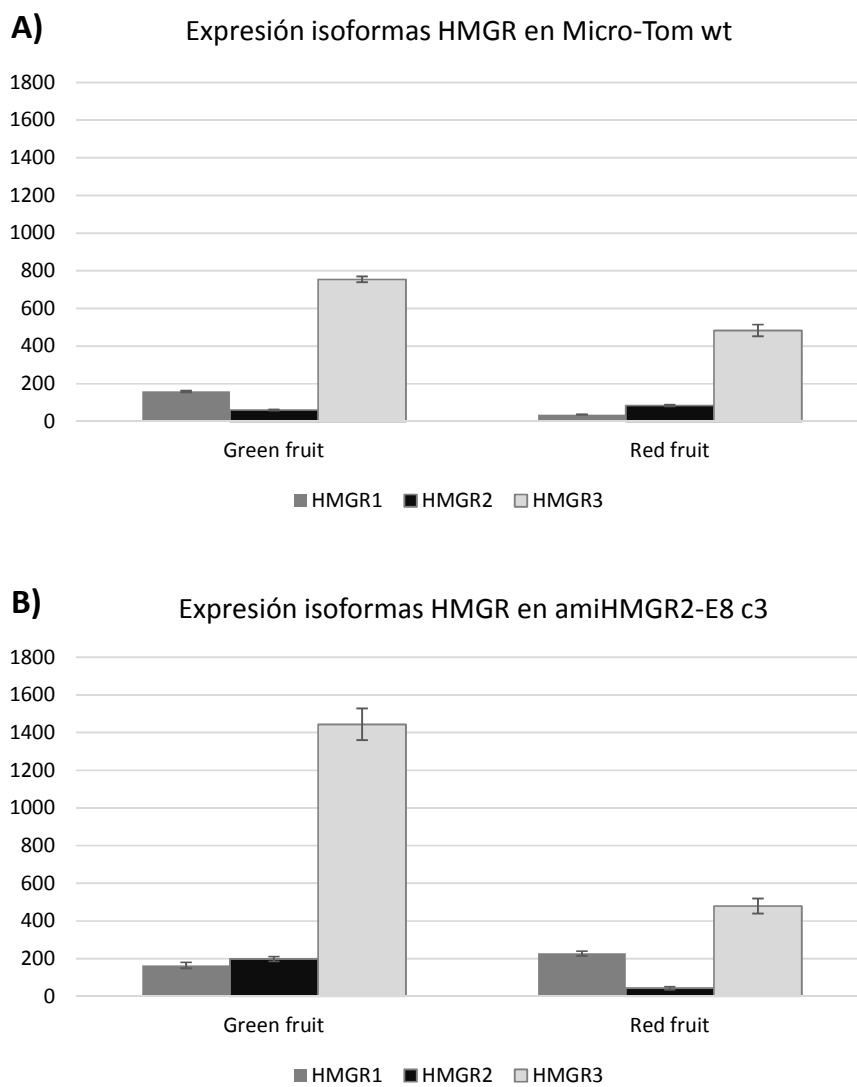
**Figura 22. Frutos de las líneas amiH2-E8b2 y amiH2-E8c4.** Imágenes de los frutos con deformaciones externas de la línea amiH2-E8b2 y amiH2-E8c4 en estadio de maduración naranja y rojo. **A)** Se muestra la comparación de los tomates con el fenotipo que afecta la epidermis del tomate. En el recuadro verde se observa las heridas de los tomates transgénicos y en el recuadro blanco se observan los tomates wt sin ninguna afectación. **B)** Corte transversal de los tomates. En el recuadro azul los tomates presentan las semillas en estado de germinación y crecimiento aún dentro del tomate. En el recuadro blanco las semillas en estado normal dentro del tomate. **C)** Imagen cercana de las semillas germinadas dentro de los frutos maduros. Los cuadros blancos y negros representan 1 cm de longitud.





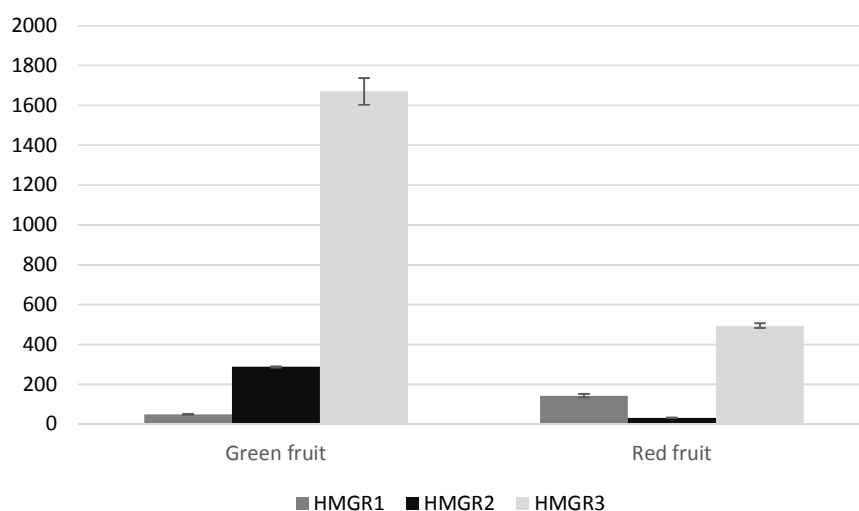
**Figura 23. Expresión del gen HMGR2 en líneas amiH2-E8 y tomate wt.** Comparación del nivel de expresión de la isoforma HMGR2 en los distintos estadios del fruto de tomate entre Micro-Tom wt y líneas transgénicas amiH2-E8 b2 y amiHMGR2-E8 c3.

Aunque el silenciamiento de la isoforma HMGR2 en las plantas amiH2-E8b2 y amiH2-E8c3 fue notable, no se observaron alteraciones en el tiempo de maduración ni en la coloración de los frutos, como sucedió con las plantas amiH2-PLI antes analizadas. Por estos motivos, se complementó el estudio con el análisis de las distintas formas del gen HMGR en los frutos verdes y rojos de las plantas transgénicas amiH2-E8b2 y amiH2-E8c3 (Figura 24).



**Figura 24. Expresión de las isoformas HMGR en la planta transgénica amiHMGR2-E8 c3 y tomate wt.** Perfil de expresión de los genes HMGR en frutos verde y rojo de la línea amiHMGR2-E8 c3 (A) y de tomate Micro-Tom wt (B) en valores absolutos.

La línea homocigota amiHMGR2-E8 b2 (Figura 25) presentó un perfil similar al de la planta c3 (Figura 24) y ambas líneas mostraron un aumento significativo de la isoforma 3 en el estadio verde del fruto y un ligero aumento de la expresión de la isoforma HMGR1 en el tejido rojo, este último dato es relevante ya que la expresión de la isoforma 1 debe disminuir durante la maduración. La expresión de la isoforma HMGR2 por otro lado parece haber disminuido pero hacen falta realizar los análisis en los diferentes tejidos para ver con más claridad el silenciamiento de esta isoforma.

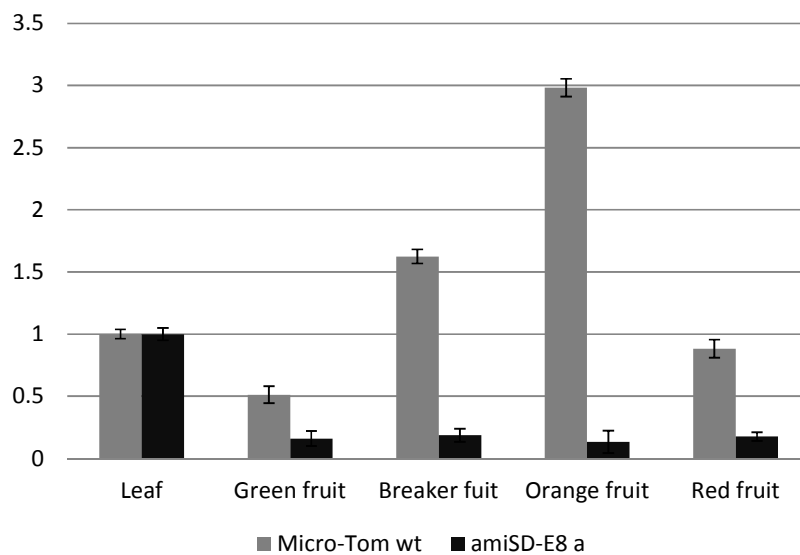


**Figura 25. Expresión de las isoformas HMGR en la planta transgénica amiHMGR2-E8 b2.** Perfil de expresión de los genes HMGR en frutos verde y rojo de la línea amiHMGR2-E8 b2 en valores absolutos.

Es importante mencionar que la expresión de la isoforma 3 en las plantas transgénicas amiHMGR2-PLI y amiHMGR2-E8 han tenido un comportamiento muy similar al aumentar drásticamente su expresión en los frutos en estadio verde. La isoforma 1 por su lado en las transgénicas amiHMGR2-PLI no pasaron por ningún cambio considerable, mientras que en las líneas amiHMGR2-E8 este gen parece aumentar su expresión en el estadio rojo del tomate, lo cual es un evento inusual que se debe analizar con más profundidad.

### 3.1.8. Análisis de plantas transgénicas con niveles de expresión silenciados de la enzima SD

La transformación de la construcción amiSD-E8 dio como resultado 10 plantas que desafortunadamente no presentaron semillas en sus frutos. A pesar de este inconveniente, se tomaron frutos en distintos estadíos para analizar los niveles de expresión del gen SD. Se tomaron los frutos en distintos estadíos de una de la línea amiSD-E8a y con *primers* específicos diseñados para qPCR se evaluó el nivel de expresión del gen SD, resultados que se muestran en la Figura 26. Este diagrama de barras nos muestra como la expresión del gen SD en la planta transgénica amiSD-E8a se ve reducida cuando es comparada a su ortólogo en una planta sin transformar *wild-type*, mostrando que el silenciamiento mediante amiRNAs es muy efectivo. El promotor E8 se expresa de manera más prominente en los estadíos de verde maduro hasta llegar a su punto de mayor expresión en los primeros estadíos rojos de maduración. Se observa en la Figura 26 una reducción de la expresión del gen SD en los estadíos breaker, naranja y rojo. Todos los cálculos estuvieron hechos con 3 réplicas técnicas y con material genético de al menos 3 frutos en cada estadío. Estudios fenotípicos o funcionales del silenciamiento de la enzima SD mediado por el promotor E8 no pudieron ser profundizados debido a la falta de semillas en los frutos.



**Figura 26. Expresión del gen SD en la planta amiSD-E8a y Micro-Tom wt.**

Diagrama de barras con la comparación de la expresión del gen SD relativizada al tejido de hoja en una planta transgénica amiSD-E8 versus una planta sin transformar Micro-Tom wt.

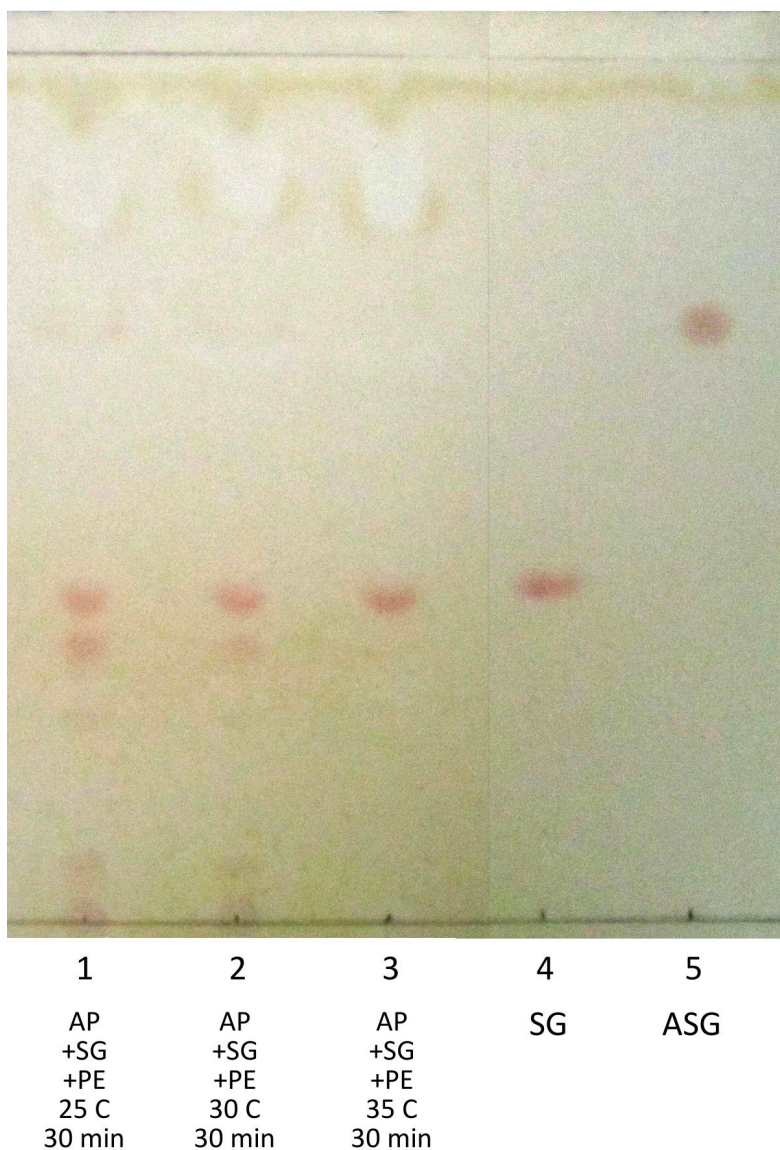
### **3.2. IDENTIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE GENES CANDIDATOS DE LA ENZIMA ESTERILGLUCÓSIDO ACILTRANSFERASA (SGAT) EN *SOLANUM LYCOPERSICUM* VAR MICRO-TOM.**

Al inicio del presente trabajo no había sido identificado ni clonado ningún gen que codifique para la enzima SGAT en ningún organismo. No obstante sí que existían estudios relacionados con la síntesis de acil-esterilglucósidos (ASG) en plantas (Lepage, 1964; Ongun and Mudd, 1970; Forsee et al., 1974; Eichenberger and Siegrist, 1975; Zdzislaw et al., 1975; Frasch and Grunwald, 1976; Baisted, 1978; Zimowski and Wojciechowski, 1983; Duperon et al., 1984; Potocka and Zimowski, 2008). En algunos de estos estudios se habían descrito y caracterizado enzimas implicadas en la síntesis de ASG utilizando esterilglucósidos como substrato y fosfolípidos, tales como la fosfatidiletanolamina (PE) o el fosfatidilglicerol (PG), como donadores de acilos (Eichenberger and Siegrist, 1975; Heinz et al., 1975; Wojciechowski and Zimowski, 1975; Forsee et al., 1976; Potocka and Zimowski, 2008). Los resultados obtenidos en dichos estudios proporcionaron información tanto sobre existencia de dicha actividad enzimática en las plantas como acerca de ciertas características de dicha enzima derivadas de su purificación parcial. En base a dicha información se decidió abordar una estrategia para identificar genes correspondientes a SGAT en tomate utilizando una combinación de aproximaciones bioquímicas, proteómicas y genómicas.

#### **3.2.1. Puesta a punto de un método no radiactivo para determinar la actividad de la enzima esterilglucósido aciltransferasa en muestras de fruto de tomate.**

Ninguno de los estudios previos relacionados con la caracterización de la enzima SGAT en plantas se había realizado en el tomate. Es por ello que fue necesario poner a punto inicialmente un protocolo que permitiera detectar la actividad SGAT en muestras de tomate como etapa previa al abordaje de su purificación mediante técnicas cromatográficas. El

protocolo utilizado para la identificación de la actividad SGAT en el tomate se basó en el descrito por Potocka and Zimowski (2008) en berenjena, el cual fue modificado y adaptado a muestras de fruto. Para ello se utilizaron muestras de pericarpo que fueron homogenizadas y procesadas tal como se describe en el apartado 6.4.1 de Materiales y Métodos. El polvo acetónico obtenido representó una fracción parcialmente enriquecida que se utilizó para la puesta a punto del ensayo enzimático. Para ello se adaptó el método descrito por (Potocka and Zimowski, 2008) pero utilizando un método no radioactivo basado en la identificación del producto de reacción mediante tinción colorimétrica tras su separación cromatográfica en placas de TLC. Los substratos utilizados fueron  $\beta$ -sitosterol  $\beta$ -D-glucósido (SG) y fosfatidiletanolamina (PE). Esta última fue utilizada como donadora de acilos en la reacción por ser el fosfolípido de origen vegetal (*Glycine max*) que mostró una mayor actividad relativa (75%) en los ensayos enzimáticos de SGAT descritos por (Potocka and Zimowski, 2008). En los experimentos de puesta a punto se utilizaron distintas concentraciones de polvo acetónico e incubaciones a distintos tiempos. Además, en algunos ensayos se omitió SG o PE. Una vez terminada la reacción enzimática, se procedió a la extracción de los sustratos y los productos de reacción utilizando n-butanol. Tras secar las muestras y disolverlas en  $\text{CHCl}_3$  estas se analizaron mediante TLC. La separación de los distintos esteroides y lípidos presentes en la mezcla de reacción, se realizó utilizando  $\text{CHCl}_3$ /MetOH/Amoníaco 25% (40:10:2) (v/v/v) como eluyente. Para el revelado, la placa de TLC se esprayó de manera uniforme con el reactivo de Molisch (tinción de azúcares) (ver el apartado 6.3.1.1 de Materiales y Métodos) o con una solución de primulina (tinción de lípidos) (ver el apartado 6.3.1.2 de Materiales y Métodos). En la Figura 27 se muestran los resultados obtenidos en el estudio del efecto de la temperatura en una reacción estándar durante 30 min.

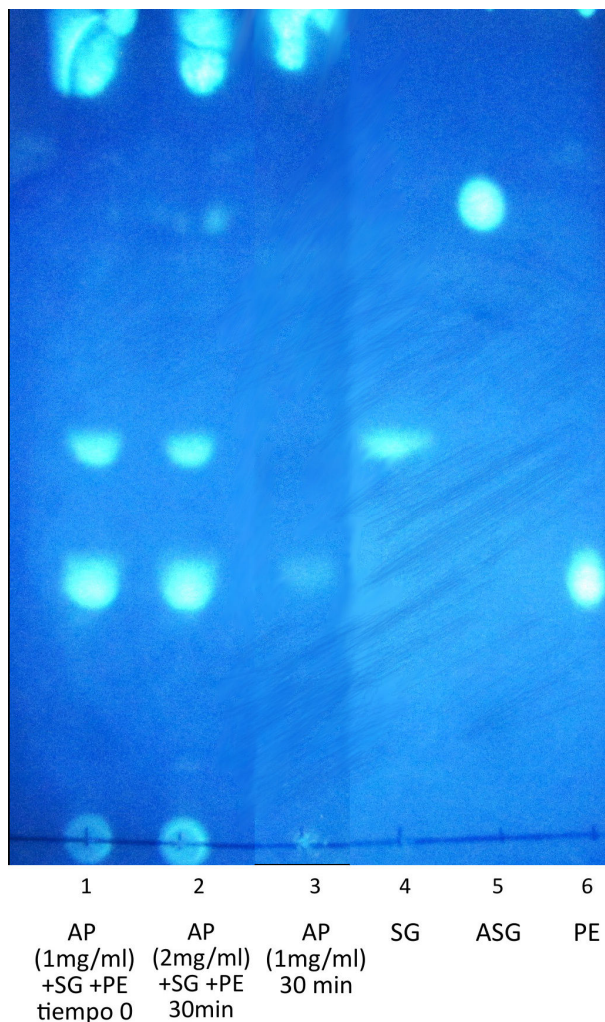


**Figura 27. Ensayo enzimática para determinar la temperatura óptima de reacción.** La mezcla de reacción contenía polvo acetónico (AP, 1 mg/mL), SG (10 nmoles) y PE (10 nmoles) en un volumen final de 500  $\mu$ L de tampón B. La placa de TLC fue revelada con reactivo de Molisch (ver apartado 6.3.1.1 Materiales y Métodos).

Se puede observar que tanto a 25  $^{\circ}$ C como a 30  $^{\circ}$ C se detecta la formación de un producto con la movilidad y tinción esperada para ASG. Es de destacar la formación de algunos productos con un Rf menor que SG de naturaleza desconocida. Ensayos posteriores



realizados a 30 °C y tinción con primulina confirmaron la formación de un producto con movilidad equivalente al ASG estándar (Figura 28).



**Figura 28. Ensayo enzimático para determinar la formación de ASG a partir de SG y PE.** TLC del ensayo enzimático con polvo acetónico (AP, 1 mg/mL) con los sustratos SG y PE. La placa de TLC fue revelada con primulina (ver apartado 6.3.1.2 de Materiales y Métodos).

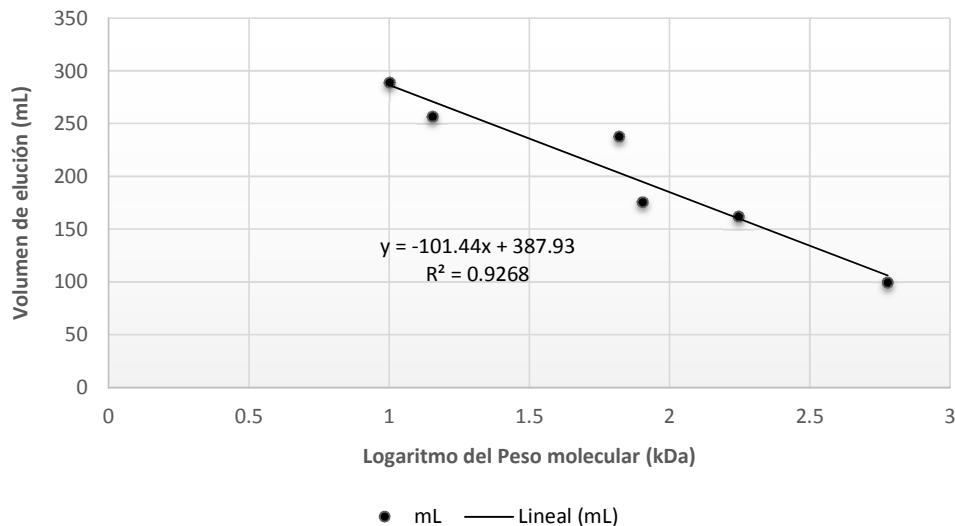
### **3.2.2. Purificación parcial de la esterilglucósido aciltransferasa de fruto de tomate.**

Tras haber demostrado la actividad de la enzima ASG en la fracción proteica extraída de de fruto de tomate, se abordó la purificar de la proteína SGAT utilizando cromatografía de gel filtración a partir de la fracción de polvo acetónico descrita en el apartado anterior. La columna utilizada fue la HiLoad 26/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare Life Sciences). La matriz empleada (Superdex 200 prep grade) tiene un rango de fraccionamiento muy amplio que abarca entre 10 y 600 kDa. Para la carga de la muestra, el bombeo y manejo del flujo a través de la columna y la recolección de las distintas fracciones se usó el equipo ÄKTA FPLC (GE Healthcare Life Sciences). La columna se equilibró utilizando un volumen tampón fosfato 0.1 M pH 6.5 y 0.05% Triton X-100 (v/v) equivalente a 3 veces el volumen de la misma. A continuación se procedió a calibrar la columna utilizando un mezcla de compuestos y proteínas marcadoras con pesos moleculares conocidos. Las proteínas y compuestos usados para calibrar de la columna fueron las siguientes: azul de dextrano (con un peso molecular 2000 kDa),  $\beta$ -Amilasa de cebada (176 kDa, Sigma-Aldrich Ref. A7130), alcohol deshidrogenasa (ADH) de hígado equino (80 kDa, Sigma-Aldrich Ref. 55689), albúmina de suero bovino (BSA) (66,4 kDa, Sigma-Aldrich Ref. 05470), lisozima de clara de huevo (14,3 kDa, Sigma-Aldrich Ref. L6876) y dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ , con un peso molecular de 0,3 kDa). El compuesto azul dextrano, por ser el de mayor tamaño, fue quien marcó el frente de la columna y determinó el volumen en vacío de la misma, que fue de 99,68 mL. Las proteínas usadas para la calibración de la columna eluyeron a distintos volúmenes como se describe en la Tabla 9.

**Tabla 9. Compuestos y proteínas usadas para la calibración de la columna de exclusión.** Tabla con la lista de proteínas y diversos compuestos necesarios para la calibración de los pesos moleculares de la columna de exclusión HiLoad 26/600 Superdex 200 pg.

<b>Proteína/Compuesto</b>	<b>Peso molecular (kDa)</b>	<b>Volumen de retención (mL)</b>
<i>Azul dextrano</i>	2000	99,68
<i>β-amilasa</i>	176	162,00
<i>ADH</i>	80	176,00
<i>BSA</i>	66	238,00
<i>Lisozima</i>	14,3	256,78
<i>K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub></i>	0,3	289,30

El compuesto más pequeño fue el  $K_2Cr_2O_7$ , quien eluyó de la columna al final de haber pasado todos los demás compuestos de la mezcla con un volumen de elución de 289,30 mL. Los valores obtenidos son las medias de 3 repeticiones en la misma columna bajo las mismas condiciones. Existe una relación logarítmica inversa entre el tamaño de las moléculas y el volumen en el cual estas eluyen. Con estos datos obtenidos se dibujó un gráfico de puntos de dispersión para encontrar la correlación entre el volumen de retención y el tamaño de las moléculas eluidas a través de la columna (Figura 29).

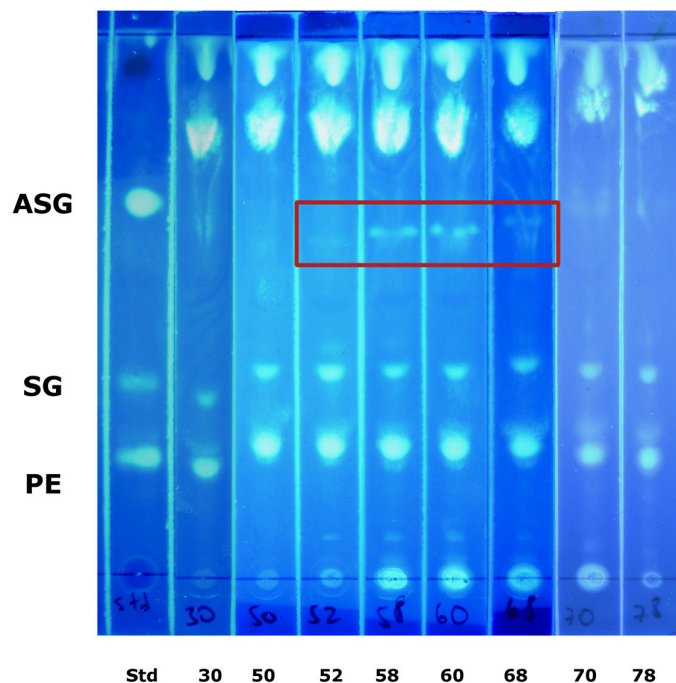


**Figura 29. Curva de calibración de la columna de exclusión HiLoad 26/600 Superdex 200 pg.** Gráfico del volumen de elución de los compuestos/proteínas vs el logaritmo del peso molecular de los mismos. El límite de exclusión de la columna es de 600 kDa y el de permeabilidad es 10 kDa.

Con la columna de exclusión calibrada, se dejaron eluir 3 volúmenes de buffer fosfato 0.1 M pH 6.5 y 0.05% Triton X-100 (v/v) para equilibrar la columna antes de proceder a la separación de las proteínas presentes en el polvo acetónico. De forma previa a la carga a la columna, el polvo acetónico fué diluido en 5 mL de buffer C (apartado 6.4.1 de Materiales y Métodos) y filtrado a través de una columna de Sephadex G-25 para su desalado (Columna PD-10, equilibrada con buffer C). Una vez recogido la muestra eluida de la columna PD-10 (aproximadamente 2,5 mL), ésta se concentró utilizando un filtro de centrifuga Amicon Ultra-0,5 con membrana Ultracel-10 (Merck Millipore, Ref. UFC501024) hasta un volumen de aproximadamente 600  $\mu$ L. La muestra se inyectó a la columna usando el “loop” de 500  $\mu$ L del equipo ÄKTAFPLC. El sistema se programó para operar a una velocidad de flujo constante de 28 cm/h. Tras la elución del volumen en vacío de la columna (aprox. 100 mL) se recogieron fracciones de 1 mL en tubos eppendorf de 1,5 mL, hasta alcanzar los 250 mL totales eluidos a través de la columna. Cada una de las fracciones recolectadas fue mantenida en hielo para preservar la actividad enzimática.

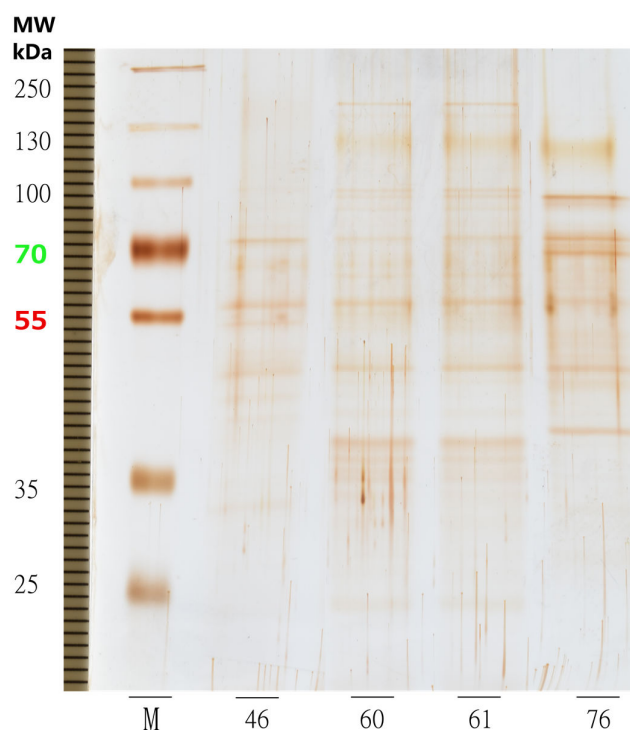
De acuerdo con el tamaño previsto para la SGAT en base a la información disponible en la literatura se seleccionaron las fracciones pares comprendidas entre 20 a 88 para realizar ensayos de actividad enzimática SGAT. Se tomaron 500  $\mu$ L de cada fracción y se pasaron a un nuevo tubo eppendorf que previamente contenía 10 nmoles de SG, 10 nmoles de PE y el volumen necesario de 2-mercaptoetanol para alcanzar una concentración final de 10 mM. Tras incubar a 30 °C durante 30 min se procedió a la extracción de los substratos y productos de la reacción con n-butanol y a su análisis mediante TLC tal como se ha descrito en el apartado anterior. En la Figura 30 se muestra el ensayo de actividad correspondiente a las fracciones 30 – 78. Se puede observar claramente la presencia de ASG en la mezcla de reacción de las fracciones 58-60.

De acuerdo con el gráfico mostrado en la Figura 29 se estimó que las fracciones 58-60 deberían tener un tamaño molecular de aproximadamente 140 kDa. De acuerdo con los resultados obtenidos por (Eichenberger and Siegrist (1975); Zimowski and Wojciechowski (1983); Potocka and Zimowski (2008)) se estimó que el monómero de la enzima SGAT de plantas debería tener un tamaño molecular en el rango comprendido entre 60 y 90 kDa. Tomando estos datos como referencia se procedió a analizar las muestras comprendidas entre las fracciones 46 y 76 mediante SDS-PAGE (Figura 30). Estas muestras contenían fracciones con actividad SGAT y otras sin actividad.



**Figura 30. TLC del ensayo enzimático de cada fracción obtenida de la columna de exclusión.** Separación cromatográfica por TLC de las reacciones enzimáticas ensayadas en las fracciones obtenidas de la columna de exclusión. ASG: acil esterilglucósido; SG: esterol glucósido; PE: fosfatidiletanolamina; Std: mezcla de patrones para identificar los productos resueltos en la TLC.

En particular se analizaron las fracciones 46, 50, 51, 60, 61, 70, 71 y 76. Para ello se tomaron alícuotas 20  $\mu$ L de cada una de las fracciones y se analizaron mediante SDS-PAGE tal como se describe en los apartados 6.4.4, 6.4.5 y 6.4.6 de Materiales y Métodos, utilizando geles de poliacrilamida al 10% y 1,5 mm de grosor. Una vez finalizada la electroforesis se procedió a la tinción de los geles con plata (apartado 6.4.7.2 de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se muestran en la (Figura 31). Si bien no fue posible observar un enriquecimiento particular en ninguna banda mayoritaria en el rango comprendido entre 60 - 90 kDa, si que existían diversas bandas minoritarias en este rango de tamaño que estaban presentes en las fracciones que mostraron actividad SGAT.



**Figura 31. Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones que mostraron actividad SGAT.** Se analizaron las fracciones 60 y 61, que mostraron actividad SGAT, junto con las fracciones 46 y 76 que no mostraron dicha actividad enzimática. Gel de poliacrilamida 10% (1,5 mm) teñido con plata.

### 3.2.3. Análisis proteómico de las fracciones enriquecidas en la actividad esterilglucósido aciltransferasa

El conocimiento de la secuencia del genoma del tomate desde el año 2012 (Tomato Genome, 2012) y la correspondiente anotación de los genes ha sido una importante herramienta a la hora de analizar la función de nuevas proteínas. Así, utilizando la lista de proteínas anotadas generada por el International Tomato Annotation Group (ITAG), y disponible en la base de datos de UNIPROT, debería ser posible identificar secuencias

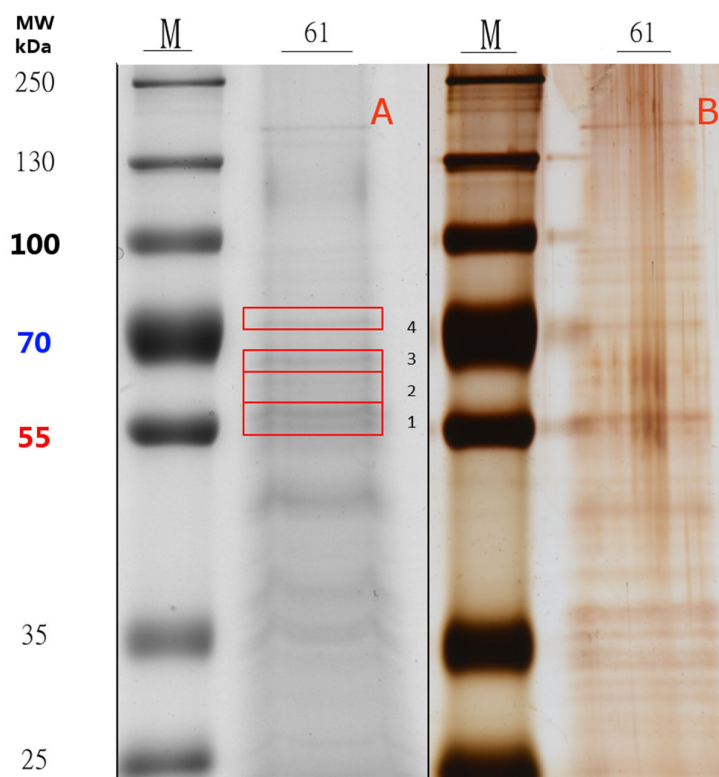
correspondientes a proteínas que no hayan sido previamente descritas y cuya función sea por lo tanto desconocida. Dentro de estas proteínas se encontraría la SGAT.

Con el propósito de identificar la(s) proteína(s) potencialmente correspondiente a SGAT en la fracciones que mostraron mayor actividad enzimática se abordó el análisis proteómico de las proteínas comprendidas en el rango de tamaño entre 60 y 90 kDa. Para ello, las proteínas presentes en la fracción 61 se separaron mediante SDS-PAGE y las regiones del gel que contenían bandas visibles en el rango de 60-90 kDa se escindieron del gel (Figura 32) y sometieron a análisis mediante la aproximación de "Shotgun Proteomics". Esta técnica permite la identificación de proteínas en mezclas complejas utilizando una combinación de cromatografía líquida y espectrometría de masas.

Las proteínas presentes en los cuatro fragmentos escindidos del gel teñido con azul de Comassie (Figura 32) fueron sometidas a digestión "in-gel" con tripsina en el sistema de digestión automática Investigator ProGest (Genomic Solution). Para ello, las bandas del gel fueron lavadas con bicarbonato de amonio (25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) y acetonitrilo (ACN). Inmediatamente, las muestras fueron sometidas a un proceso de reducción (DTT 10 mM; 30 min, 56 °C) y alquilación (iodoacetamida 55 mM; 30 min, 21 °C, en oscuridad). Luego las muestras fueron digeridas con tripsina porcina (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega Ref. V5111; 80 ng tripsina/muestra; 37 °C durante 16 horas). A continuación la mezcla de péptidos resultante fue extraída del gel con ácido fórmico al 10% y ACN, y finalmente a un proceso de secado completo. Las muestras así obtenidas fueron analizadas en el cromatógrafo líquido nanoAcquity Ultraperformance (Waters) el cual se encuentra acoplado al equipo LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific), quien combina el analizador de masas Orbitrap con el espectrómetro de masas LTQ Velos (trampa iónica). Los péptidos digeridos con tripsina fueron resuspendidos en ácido fórmico al 1% y una alícuota fue inyectada para la separación cromatográfica. Los péptidos fueron capturados en una columna de trampa Symmetry C18 (5  $\mu\text{m}$  dp, 180  $\mu\text{m}$  x 20 mm; Waters) y separados usando una columna capilar de fase reversa C18 (75  $\mu\text{m}$  id, 25 cm, nanoAcquity, 1.7  $\mu\text{m}$  dp BEH column; Waters). Para la elución de los péptidos se usó un gradiente de 0 A 40% B en 25 minuto, seguido de un



gradiente de 40 % a 60 % en 5 minutos (A: 0.1% ácido fórmico; B: 100% ACN, 0.1% ácido fórmico) con un flujo de 250 nL/min. Los péptidos eluidos fueron sometidos a ionización por electrospray en una aguja de emisión (PicoTip, New Objective) con un voltaje aplicado de 2000 V. Las masas de los péptidos ( $m/z$  350 – 1700) se analizaron mediante un escaneo total del rango de las masas (Full Scan MS) y analizadas en modo de adquisición independiente (DIA). El Orbitrap posee una resolución de 60000 FWHM a 400  $m/z$ . Los 10 péptidos más abundantes de cada Scan MS fueron seleccionados y luego fragmentados usando CID (disociación inducida por colisión) en una trampa iónica linear (LTO) usando helio como gas de colisión, con 38% de energía de colisión normalizada. Los datos “crudos” generados fueron recuperados con el software Xcalibur v2.2 (Thermo Scientific).



**Figura 32. Separación mediante SDS-PAGE de las proteínas presentes en la fracción 61. A)** SDS-PAGE de la fracción 61 de la columna de exclusión teñido durante 24 horas con azul de Coomassie. **B)** SDS-PAGE de la fracción 61 de la columna de exclusión teñido con nitrato de plata. Las regiones escindidas del gel (1, 2 3 y 4) se indican con rectángulos rojos.

Una base de datos fue consolidada combinando las entradas para *Solanum lycopersicum* de Uniprot-SwissProt y Uniprot-TrEMBL, base de datos derivada del genoma para el cultivar Heinz 1706 que fue secuenciado por el Tomato Genome Consortium, con la de contaminantes comunes del laboratorio usada en el servicio de proteómica del Parc Científic de Barcelona. La búsqueda fue ejecutada por el motor de búsqueda de Sequest usando el Thermo Proteome Discover v.1.3.0.339 (Thermo Scientific) contra la base de datos antes mencionada. Los datos crudos obtenidos para los 4 fragmentos escindidos del gel fueron combinados en un solo fichero antes de la búsqueda. Tanto la base de datos usada como una de señuelo fueron analizadas para obtener una tasa de descubrimiento falsa (FDR), y así poder estimar el número incorrecto de espectros de péptidos encontrados que excedieron el umbral establecido. Para mejorar la sensibilidad de la búsqueda en la base de datos, se utilizó el programa Percolator (Máquina de aprendizaje semi dirigida) (Kall et al., 2007) para discriminar los espectros de péptidos encontrados correctos de los incorrectos. Percolator asigna un valor  $q$  a cada espectro, el cual es definido como la mínima FDR a la que la identificación es considerada correcta. Estos valores  $q$  son estimados usando la distribución de los puntajes de la búsqueda en la base de datos señuelo. Los parámetros usados durante la búsqueda se describen con más detalles en la Tabla 10. Los resultados finales fueron filtrados de manera que únicamente las proteínas identificadas con al menos 2 péptidos de alta confianza ( $FDR \leq 0.01$ ) fueron incluidas en la lista.

**Tabla 10. Parámetros para identificar péptidos en la secuenciación de proteínas.**

Parámetros aplicados durante la búsqueda de péptidos para la identificación de proteínas en el motor de búsqueda de Sequest usando el Thermo Proteome Discover v.1.3.0.339 (Thermo Scientific).

<b>Base de datos/Taxonomía:</b>	<i>Uniprot/SolanumLycopersicum</i> <i>26/5/14</i>
<b>Enzima:</b>	<i>tripsina</i>
<b>Escisiones falladas:</b>	<i>2</i>
<b>Modificaciones fijas:</b>	<i>carbamidometil de cisteína</i>
<b>Modificaciones variables:</b>	<i>oxidación de metionina</i>
<b>Tolerancia de péptidos:</b>	<i>10 ppm y 0.6 Da (respectivamente para espectro de MS y MMS/MS)</i>
<b>Percolator:</b>	<i>FDR objetivo (Estricta): 0.01;</i> <i>Validación basada en: valores q</i>

Los resultados de la búsqueda e identificación de péptidos y sus correspondientes proteínas se encuentran en el Anexo IV. De la búsqueda realizada se obtuvieron aproximadamente 107 proteínas identificadas entre las 4 bandas analizadas, de las cuales 63 proteínas aparecieron como no caracterizadas en las base de datos de proteínas de tomate. Para todas las proteínas encontradas como no caracterizadas, se realizó una búsqueda más amplia en otros organismos en la base de datos del NCBI, utilizando la herramienta bioinformática BLAST. Durante la búsqueda bien se encontraron funciones descritas para dichas proteínas o funciones semejantes en otros organismos. Entre estas proteínas no caracterizadas se encontró la secuencia de una proteína descrita como K4D5B5 en la base de datos del UNIPROT, la cual predijo una función similar a la actividad fosfolipasa A1 LCAT (lechitin-cholesterol acyltransferase). Esta proteína tiene un peso molecular de 50.5 kDa. El resultado del análisis de masas describió a esta proteína con una cobertura de 26.67, del cual fueron encontrados 11 péptidos únicos para esta proteína con un alto nivel de confianza.

Con la secuencia de la proteína K4D5B5 de tomate se realizó una búsqueda utilizando la herramienta BLAST en la base de datos de Sol Genomics Network para comparar la secuencia de aminoácidos encontrada con las de la última versión 2.4 del ITAG (2014-02-23). El alineamiento encontró 2 secuencias que produjeron alineamientos significativos. La primera secuencia identificada fue la codificada por Solyc11g008550.1.1 - Lecithin cholesterol acyltransferase family protein que correspondiente a K4D5B5. La otra proteína corresponde a la codificada por Solyc02g068920.2.1 - Lecithin cholesterol acyltransferase. El gen Solyc02g068920.2 codifica para la proteína Q71LX7 en la base de datos de UNIPROT (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q71LX7>). Dicha proteína contiene 535 aminoácidos y presenta un peso molecular de 60.4 kDa. Para ambas proteínas se describe que pertenecen a la misma familia funcional. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de K4D5B5 y Q71LX7 (Figura 33) muestra que ambas proteínas comparten un 40,5 % de identidad y un 54.8 % de similitud (Tabla 11).

```

SGAT1 1  -----MISEYFSCILPGRRSDSGNDVVDARNPVLVLSGLAGSILHSKSKKFGSFETRVVVRILAEHEFKKKLWSIYN
SGAT2 1  MAMLIIEELIKSIEMWELKLIKPKQYEYIDPTLD--PVLLVPGVAGSILNAVDKKTGRTE--RVVVRILGADHEFCDKLWCRD

SGAT1 74  PKFGYTEALDDSTEIVVPODDYGLYAIIDLDPSELMVKCVHITGVYHEHDMIDMLVKCYKKGTTLFGFGYDFRQSNRIDK
SGAT2 78  PSTGKITNLDPDTSIEVPEIDRYGLYAIIDLDPMIIGS-DC--VYVYHDMITVEMLSWGYQEGKTLFGFGYDFRQSNRLQE

SGAT1 154  AMNDLKPKLAIAYKASGGKVDIISHSMGGLLKCFISLYSDVFSKYVNRWITVATPFQGAPCITHDSSLITGVQFVDGTE
SGAT2 155  TMECFACKLESIHNTASGGKINIISHSMGGLLVKCFMALHSDIFBKVKNWIALAAPPQGAPCYITSSLLNGTSTFVHGWE

SGAT1 234  SNFFVSRWTVHOLLIECPSIYEMIPNPDFKWEKQPEILVWRKKS-KDCNIVVKLERYDASTSVILFEEALKNEINLNGK
SGAT2 235  ERFFISKWSMHOLLIECPSIYELMGCPDFHWEAFVLELWKEKSNNGCESVVLLESYSPLEAVSVYELALANNKVTYNGE

SGAT1 313  TVEFLPFNLSIILDWAASRKLINDAQLPKGIPLYNIYGTSPDTPLDVSYGSEASPIEDITNVCHTMPHSYSVDGDGTVPAE
SGAT2 315  KISLFPNLELLKWKANKTRELCHAKVFDKVKFYNIYGTNYETPHSVCYGSQNAPISDLQQLPFVQSNYISVDGDGTVPTE

SGAT1 393  SAMADNCEAVERVGVQAGHRGLLRDEKVEELIKKWLGVSDKPKVHSTTSRVMDLYAQO-----
SGAT2 395  SARADGLKAEARVGVPGDHRGIVCDRHVVRVIRHWLR-ADDPYYPNPINDYVILPTSEFDIERHHEKGLDVTSLREWEIV

SGAT1 -----
SGAT2 474  SESQDGKENADSGKTKVGSISVSHVGDNDNTWEEAHATLIVHPKSEGKQHVELNAMSVSARA

```

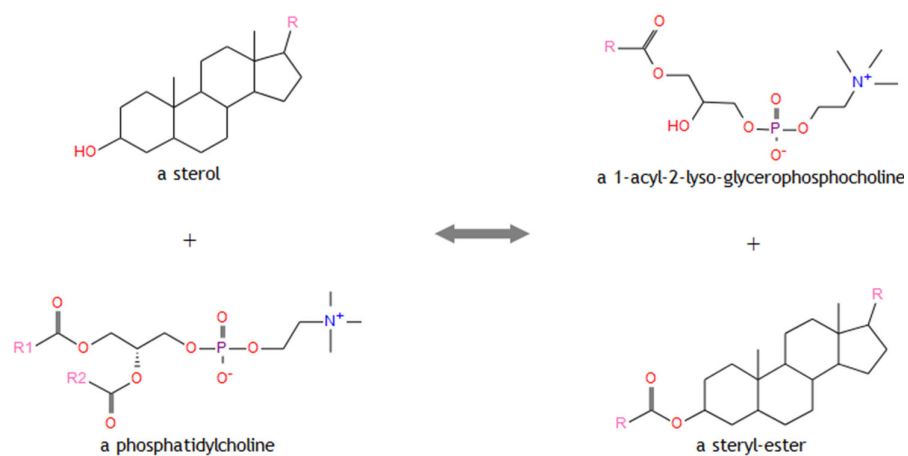
**Figura 33. Alineamiento de las proteínas candidatas SGAT de *S. lycopersicum*.** Alineamiento por emparejamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas SLSGAT1 y SIGAT2.

**Tabla 11. Proteínas candidatas SGAT de *S. lycopersicum*.** Identidad y similitud de las secuencias de las proteínas encontradas en la base de datos del SGN para las proteínas candidatas SGAT.

Organismo	Secuencia ID SGN	Proteína (Uniprot)	Número de aminoácidos	Peso molecular (kDa)	Identidad	Similitud
<i>S. lycopersicum</i>	Solyc11g008550.1.1	K4D5B5	450	50,5	40.5%	54.8%
<i>S. lycopersicum</i>	Solyc02g068920.2.1	Q71LX7	535	60,4		

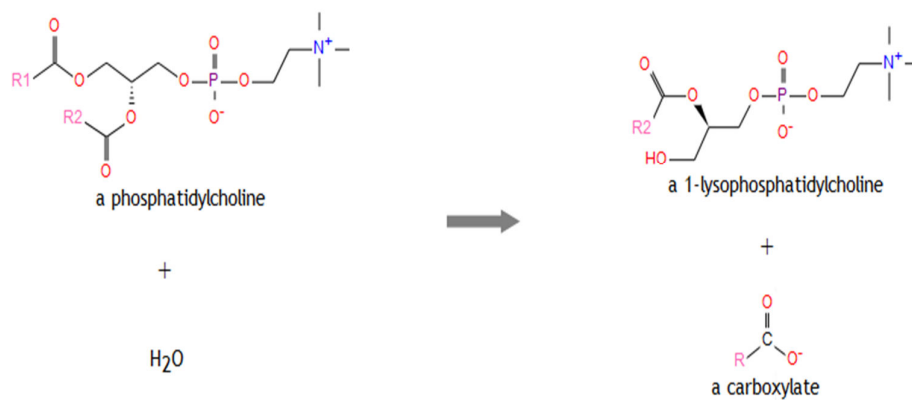
Para profundizar en la posible función SGAT de las proteínas K4D5B5 y Q71LX7, se empleó la herramienta SolCyc Biochemical Pathways en la base de datos LycoCyc (tomate) (<http://solcyc.solgenomics.net/>). Se encontró que la proteína K4D5B5 se encuentra relacionada con la función enzimática fosfolípido-esterol O-aciltransferasa mencionada para la familia de proteínas Lecitina:colesterol aciltransferasa, donde comparte dos reacciones enzimáticas con la proteína Q71LX7. Las reacciones enzimáticas que estas proteínas comparten son las reacciones definidas como EC 2.3.1.43 y EC 3.1.1.32, las cuales llevan como nombres genéricos fosfatidilcolina-esterol O-aciltransferasa y fosfolipasa A<sub>1</sub>, respectivamente y que se muestran en las Figura 34 y Figura 35.

### EC 2.3.1.43



**Figura 34. Reacción EC 2.3.1.43.** Esquema de la reacción enzimática llevada a cabo por el conjunto de enzimas dentro del grupo descrito como EC 2.3.1.43.

### EC 3.1.1.32



**Figura 35. Reacción EC 3.1.1.32.** Esquema de la reacción enzimática llevada a cabo por el conjunto de enzimas dentro del grupo descrito como EC 3.1.1.32.

Con el fin de simplificar la denominación de las proteínas candidatas encontradas, las proteínas K4D5B5 y Q71LX7 se renombraron con las siglas SISGAT1 y SISGAT2 respectivamente.

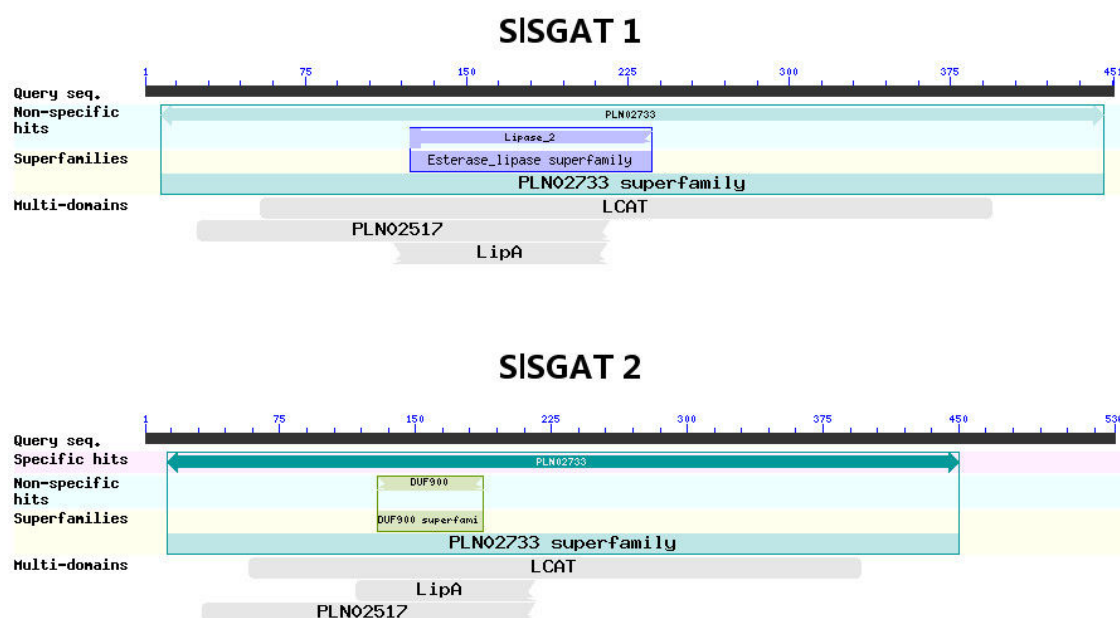
La búsqueda mediante la herramienta tblastn en la base de datos de Sol Genomics Network permitió identificar también las secuencias génicas correspondientes a las proteínas SISGAT1 y SISGAT2. Los genes que codifican para las proteínas SISGAT1 y SISGAT2 se encuentran localizados en los cromosomas 11 y 2 respectivamente.

### **3.2.4. Análisis bioinformático de los genes y proteínas candidatas SISGAT1 y SISGAT2**

Una vez identificadas las proteínas candidatas SISGAT1 y SISGAT2 se realizó una búsqueda usando distintas herramientas bioinformáticas para identificar posible dominios funcionales entre ellas y también con proteínas con funciones relacionadas.

Para ello se realizó inicialmente una búsqueda de dominios conservados en las secuencias de las proteínas SI.SGAT1 y SI.SGAT2 utilizando la herramienta de búsqueda de dominios conservados de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). En la Figura 36 se muestra que las proteínas SISGAT1 y SISGAT2 se enmarcan dentro de la superfamilia descrita como PLN02733 (phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase) y que poseen en común los multidominios LCAT, LipA y PLN02517. La presencia de estos dominios predice para SISGAT1 y SISGAT2 la función de transferir grupos acilos a un esteroles (actividad esteroles O-aciltransferasa) y de hidrolizar el enlace éster de fosfolípidos (actividad fosfolipasa A<sub>1</sub>). Ambas características estarían implícitas en la actividad SGAT de plantas de acuerdo con los datos bioquímicos publicados previamente en la literatura (Eichenberger and Siegrist, 1975; Heinz et al., 1975;

Zdzislaw et al., 1975; Forsee et al., 1976; Frasch and Grunwald, 1976; Zimowski and Wojciechowski, 1983; Potocka and Zimowski, 2008).



**Figura 36. Dominios conservados de las proteínas candidatas SISGAT1 y SISGAT2.** Esquema gráfico de los dominios y sitios conservados de las proteínas SISGAT1 y SISGAT2 mediante el software de búsqueda de dominios conservados (NCBI) en la base de datos CDD v3.13.

Las búsquedas utilizando el programa BLAST (NCBI) tomando como referencia la base de datos de *Arabidopsis thaliana* indicó la existencia de dos proteínas con elevada similitud con SISGAT1 y SISGAT2: 1) Proteína anotada como fosfolipasa A(1) LCAT3 (At3g03310.1) y 2) Proteína anotada como fosfolipasa A independiente de calcio (At4g19860.1). Un estudio detallado de las similitudes confirmó que las proteínas codificadas por los locus At3g03310.1 y At4g19860.1 son los ortólogos de SISGAT1 y SISGAT2 respectivamente (ver Tabla 12 y Tabla 13)



Tabla 12. Alineamiento de la proteína SISGAT1 con secuencias similares en *A. thaliana*.

Descripción	<u>Puntaje máximo</u>	<u>Puntaje total</u>	<u>Cobertura de la búsqueda</u>	<u>Valor E</u>	<u>Identidad</u>	<u>Código de acceso (TAIR)</u>
phospholipase A(1) LCAT3 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	596	596	97%	0.0	67%	AT3G03310.1
calcium-independent phospholipase A [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	457	457	94%	6,00E-156	52%	AT4G19860.1

Tabla 13. Alineamiento de la proteína SISGAT2 con secuencias similares en *A. thaliana*.

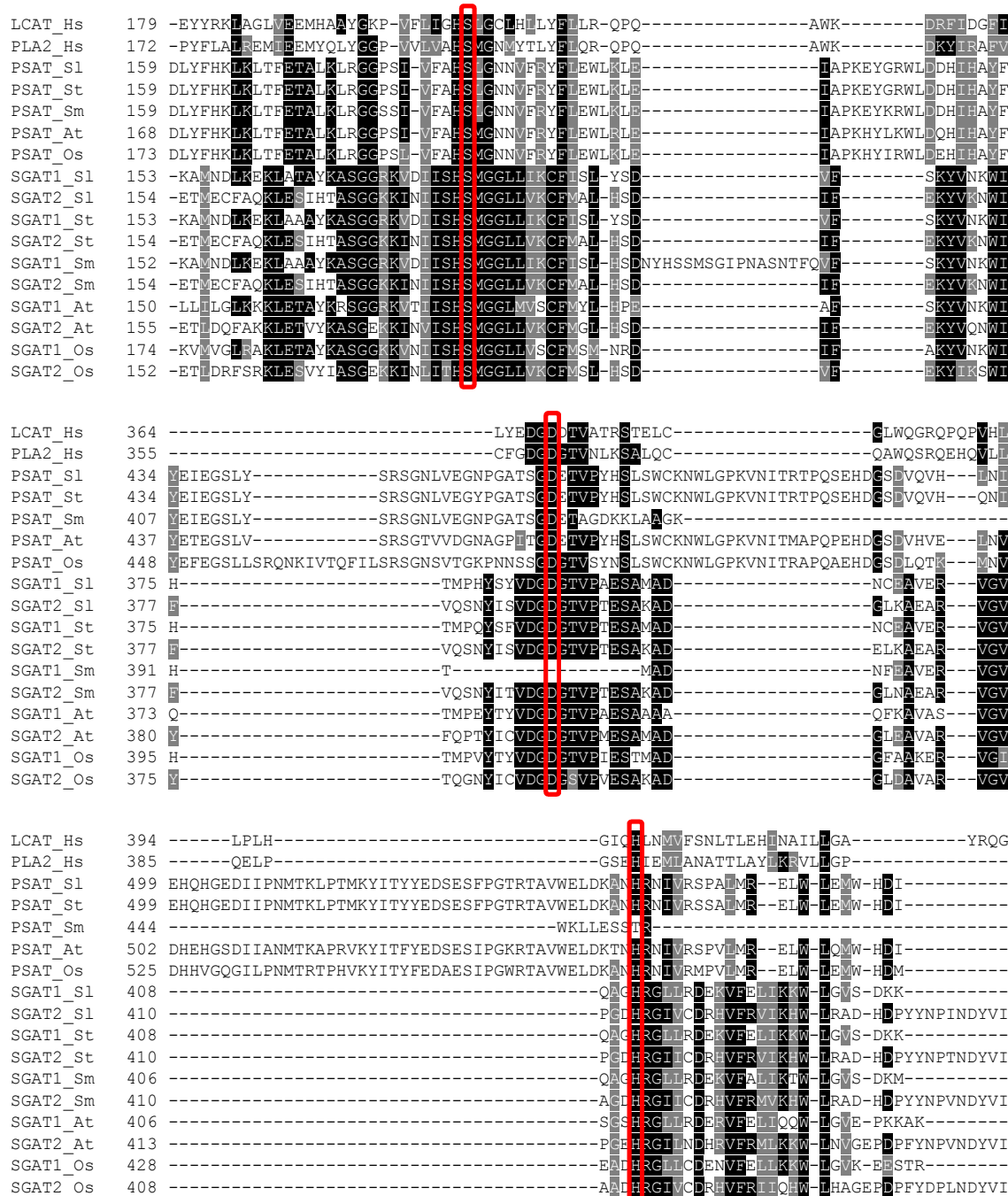
Descripción	<u>Puntaje máximo</u>	<u>Puntaje total</u>	<u>Cobertura de la búsqueda</u>	<u>Valor E</u>	<u>Identidad</u>	<u>Código de acceso (TAIR)</u>
calcium-independent phospholipase A [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	742	742	99%	0.0	65%	AT4G19860.1
phospholipase A(1) LCAT3 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	422	422	74%	4,00E-142	52%	AT3G03310.1

### 3.2.5. Análisis filogenético de las proteínas candidatas SISGAT1 y SISGAT2

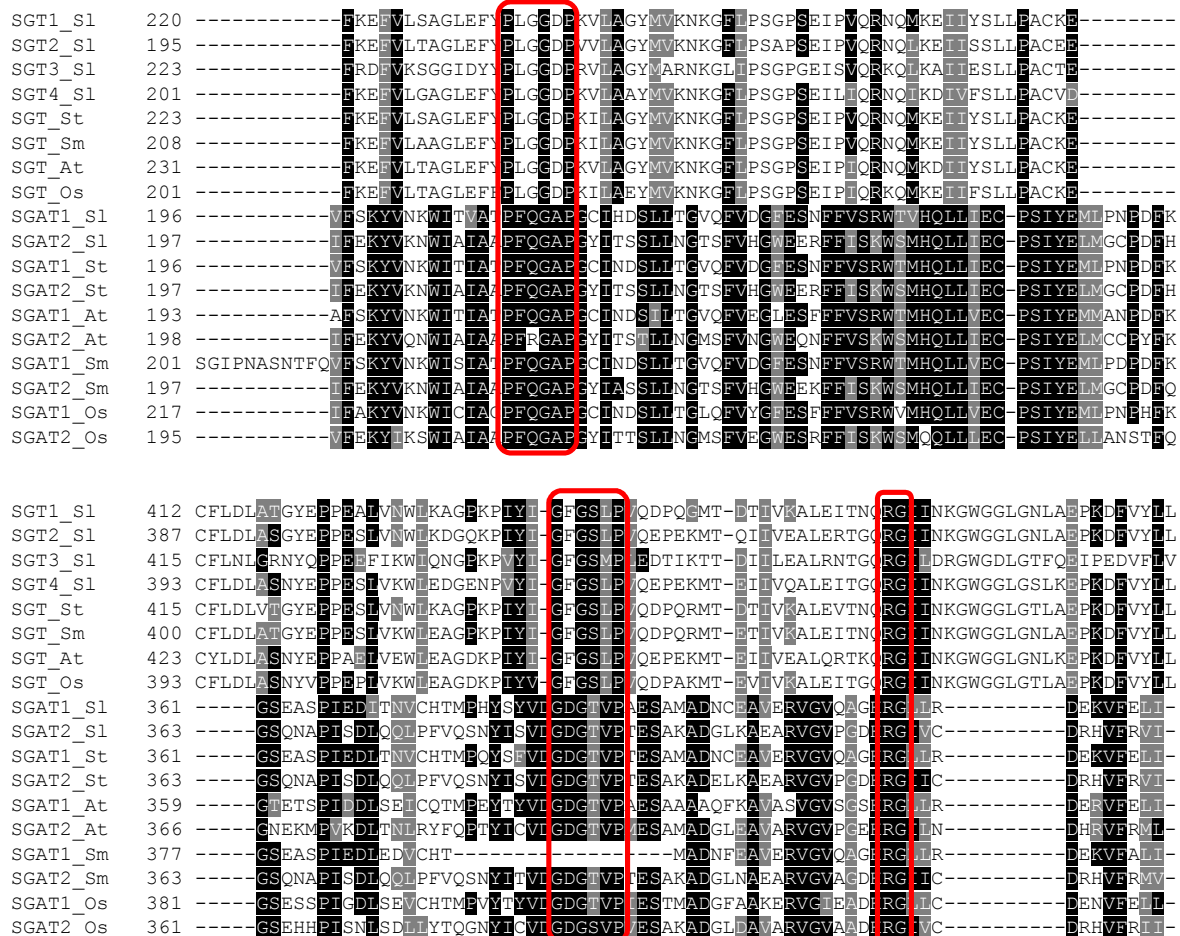
Los resultados anteriores sugirieron la existencia de proteínas ortólogas a SISGAT1 y SISGAT2 en otras plantas. Esto estaría de acuerdo con el hecho de que, en mayor o menor proporción, los ASG son compuestos que se encuentran presentes en todas las plantas vasculares (Grille et al., 2010). Es por ello que se realizó un análisis filogenético de las proteínas con similitud a SISGAT1 y SISGAT2 presentes en otros organismos de los cuales se conoce la secuencia de su genoma tales como *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum*, *S. melongena*, *S. lycopersicum* y *Oriza sativa*.

Al realizar una búsqueda con el programa BLAST de secuencias de aminoácidos que presentaran similitud con las proteínas SISGAT1 y SISGAT2 en las especies antes mencionadas se hallaron las proteínas PSAT (Phospholipid sterol O-acyltransferase), ASAT (acyl-CoA:sterol acyltransferase) y SGT (Sterol glycoside transferase) en los organismos antes nombrados. Es importante mencionar que las proteínas de *S. melongena* fueron obtenidas de la base de datos SolGenomics Network pero estas no han sido curadas todavía, por lo que se pueden encontrar errores en las secuencias presentadas en este trabajo. Debido a que la información que se tiene acerca de las proteínas SGATs es aún muy limitada, se tomaron en cuenta también otras proteínas de organismos más lejanos que han sido bien estudiados, como es el caso de las proteínas Lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) y lysosomal phospholipase A<sub>2</sub> (PLA2) de humanos (*Homo sapiens*). Todas las secuencias de aminoácidos halladas y utilizadas durante el análisis filogenético molecular se encuentran descritas en el Anexo V.

Previo al análisis filogenético, se realizaron alineamientos múltiples para comparar las secuencias de SGATs y SGTs de varios organismos así como de SGATs y PSATs con el objetivo de revelar motivos conservados que dieran indicios acerca de los sitios catalíticos de las proteínas. Para dichos alineamientos se utilizó el programa Expresso T-Coffee (Notredame et al., 2000; Armougom et al., 2006; Di Tommaso et al., 2011). Este programa realiza alineamientos de secuencia múltiples utilizando información estructural de las proteínas. El alineamiento de SGAT y PSAT así como de LCAT y PLA2 de *H. sapiens* mostró la conservación total de la llamada triada catalítica de la actividad fosfolipasa compuesta por los residuos S<sub>205</sub>, D<sub>369</sub> y H<sub>401</sub> en la proteína LCAT humana (Jonas, 2000) (Figura 37). El alineamiento de este grupo de proteínas presente una alta similitud en la zona intermedia de las proteínas, siendo pobre en los extremos N y C-terminales. Cuando las secuencias SGATs y SGTs fueron alineadas entre ellas se pudieron reconocer varios sitios altamente conservados en la región central de las secuencias, que difieren ampliamente de las regiones que se encontraron conservadas en el alineamiento entre las SGATs y PSATs (**Figura 38**).



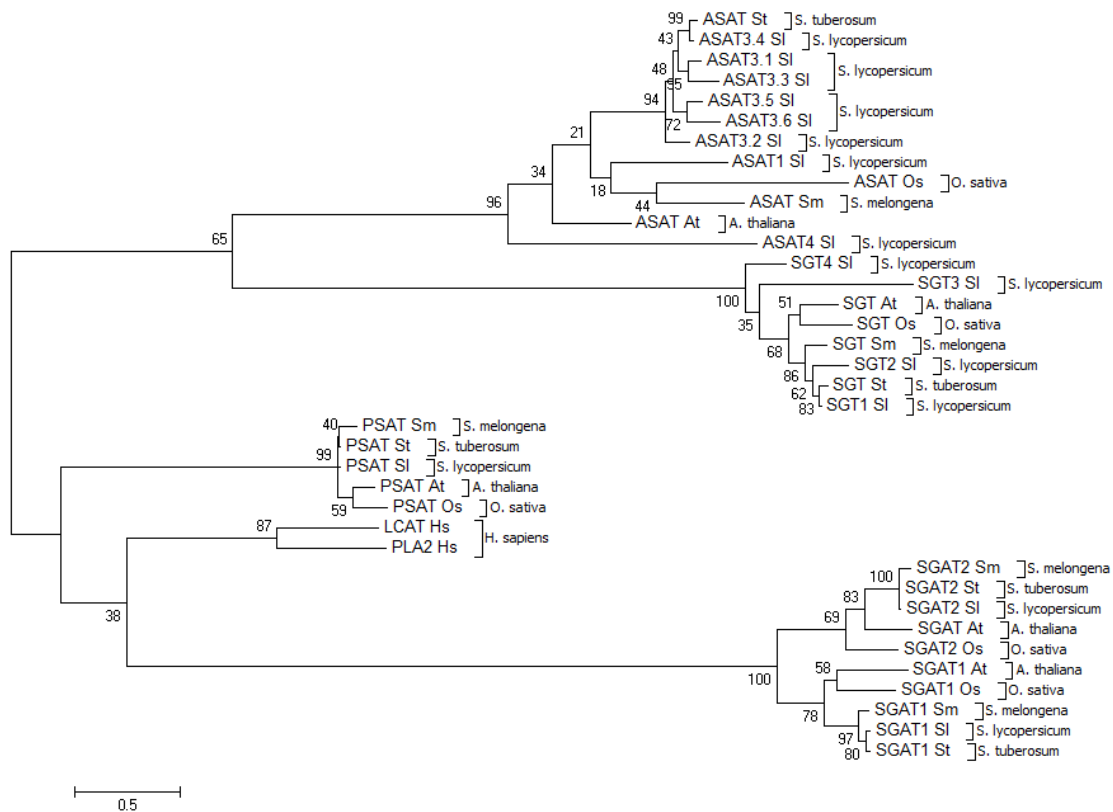
**Figura 37. Alineamiento de las proteínas SGAT y PSAT de diversas especies.** Alineamiento múltiple de las enzimas SGAT y PSAT de los organismos *S. lycopersicum* (Sl), *S. tuberosum* (St), *S. melongena* (Sm), *A. thaliana* (At) y *O. sativa* (Os) además de las proteínas LCAT y PLA2 de *H. sapiens* (Hs). Los cuadros en rojo muestran la triada catalítica característica de las enzimas con la función fosfolipasa, que se encuentra presente en la mayoría de las proteínas analizadas.



**Figura 38. Alineamiento de las proteínas SGT y SGAT de diversas especies vegetales.** Alineamiento múltiple de las enzimas SGAT y SGT de los organismos *S. lycopersicum* (Sl), *S. tuberosum* (St), *S. melongena* (Sm), *A. thaliana* (At), *O. sativa* (Os) y *H. sapiens* (Hs). Los cuadros en rojo representan las zonas conservadas de mayor relevancia entre las secuencias.

Para realizar el análisis filogenético de todas las secuencias estudiadas se usó el software MEGA versión 6.0 (Tamura et al., 2013). El árbol filogenético obtenido se muestra en la Figura 39. La historia evolutiva fue inferida usando el método de “Maximum likelihood” basado en el modelo de Whelan y Goldman (Whelan and Goldman, 2001). El árbol que se muestra es el que presenta el logaritmo de verosimilitud más alto. El árbol inicial para la búsqueda heurística fue obtenido aplicando el método de “Neighbor-joining” a una matriz de estimación de distancias por parejas usando un modelo JTT. Se utilizó una distribución gamma discreta para modelar las diferencias de la tasa de evolución entre sitios. El árbol está dibujado

a escala, siendo la medida de cada rama proporcional al valor del número de sustituciones por sitio. El análisis estuvo compuesto por 37 secuencias de aminoácidos. El árbol indica claramente existencia de dos grandes ramas evolutivas, la que dio lugar a los clados ASAT y SGT por una parte, y a PSAT y las candidatas SGAT por otra. Es interesante resaltar también que las proteínas SGATs muestran una mayor proximidad evolutiva con las LCAT y PLA2 humanas que con las PSAT



**Figura 39. Análisis filogenético molecular de las proteínas SGAT y otras relacionadas de *S. lycopersicum* junto a sus ortólogos en distintas especies.** Árbol filogenético de las proteínas candidatas SGAT y otras proteínas involucradas en la síntesis de productos semejantes como esterilglucosidos y esteril ésteres de *S. lycopersicum* (SI), *S. tuberosum* (St), *S. melongena* (Sm), *A. thaliana* (At), *O. sativa* (Os) y *H. sapiens* (Hs). En los nodos se indica la probabilidad de ocurrencia del nodo con un bootstrapping de 100 veces.

### 3.2.6. Clonación y validación de los cDNAs que codifican para las enzimas candidatas SISGAT1 y SISGAT2.

La secuencia de aminoácidos de las proteínas SISGAT1 y SISGAT2 que fueron utilizadas en los estudios indicados anteriormente fueron las descritas en las base de datos de Sol Genomics deducidas de la secuenciación de la variedad Heinz. Con el conocimiento previo de dichas secuencias se procedió a clonar los cDNAs correspondientes en la variedad MicroTom utilizando muestras de fruto de tomate en maduración. La elección del fruto como material de partida para la extracción del RNA utilizado en la síntesis de cDNA se fundamentó en los patrones de expresión de los genes que codifican para SISGAT1 y SISGAT2 descritos en la base de datos Bar-Toronto ([http://bar.utoronto.ca/efp\\_tomato/cgi-bin/efpWeb.cgi](http://bar.utoronto.ca/efp_tomato/cgi-bin/efpWeb.cgi)). Para el aislamiento del cDNA de SISGAT1 se utilizaron frutos rojos y para el cDNA SISGAT2 de frutos en estadio breaker. Con el RNA extraído se procedió a la síntesis de cDNA mediante transcripción reversa utilizando el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

Utilizando los cDNAs de primera cadena sintetizados se realizó la amplificación de la región codificante de SISGAT1 utilizando los primers K4D5B5.fw y K4D5B5.rev o K4D5B5.NoStop.rev y de SISGAT2 utilizando los primers Q71LX7.fw y Q71LX7.rev o Q71LX7.NoStop.rev (ver Anexo I). Los *primers* “fw” poseen en el extremo 5’ la secuencia Gateway attB1 mientras que los *primers* “rev” poseen en el extremo 5’ la secuencia Gateway attB2, para la recombinación BP con el vector pDONR 207. Los *primers* “NoStop.rev” se distinguen por tener ausente en sus secuencias al codón de stop de cada uno de los correspondientes cDNAs. Para la reacción de amplificación mediante PCR se utilizó la enzima Pfx50™ DNA Polymerase (Invitrogen).

Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa. Los DNAs de interés fueron posteriormente purificados a partir del gel de agarosa usando el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Los DNAs obtenidos fueron

analizados en el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific). Posteriormente se procedió a su secuenciación y clonación en el vector pDONR 207 para generar los vectores pENTRY correspondientes. Cabe indicar que las secuencias de nucleótidos de los cDNAs SISGAT1 y SISGAT2 obtenidos a partir de la variedad MicroTom fueron idénticas a las descritas para la variedad Heinz. Cada reacción de recombinación fue utilizada para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  y la posterior selección de las colonias transformantes en placas de LB + Gentamicina. Las colonias obtenidas fueron cultivadas en medio líquido LB + Gentamicina para proceder a la posterior purificación de los plásmidos correspondientes. Los nuevos vectores generados (Tabla 14) fueron digeridos con las enzimas EcoRV y XbaI (Promega) a 37 °C durante 1 hora para comprobar que el plásmido generado era correcto en un principio. Consecutivamente se procedió a su secuenciación para confirmar que no existía ningún error en la secuencia clonada.

**Tabla 14. Lista de vectores pENTRYs generados por recombinación BP.** Secuencias de PCR que fueron recombinadas con el vector pDONR 207 usando la enzima BP clonase (Life Technologies).

Secuencias de PCR	Vector recombinante	Vector resultante
attB1-SI.SGAT1-attB2	+ pDONR 207	pENTRY 207:SISGAT1
attB1-SI.SGAT1.NoStop-attB2		pENTRY 207:SISGAT1.NoStop
attB1-SI.SGAT2-attB2		pENTRY 207:SISGAT2
attB1-SI.SGAT2.NoStop-attB2		pENTRY 207:SISGAT2.NoStop

Los vectores pENTRY generados en esta parte del trabajo representan un material de gran interés ya que pueden ser recombinados con numerosos vectores de destino con los que abordar diversos estudios relacionados con las proteínas SISGAT1 y SISGAT2.

### 3.2.7. Estudio de localización subcelular de las proteínas candidatas

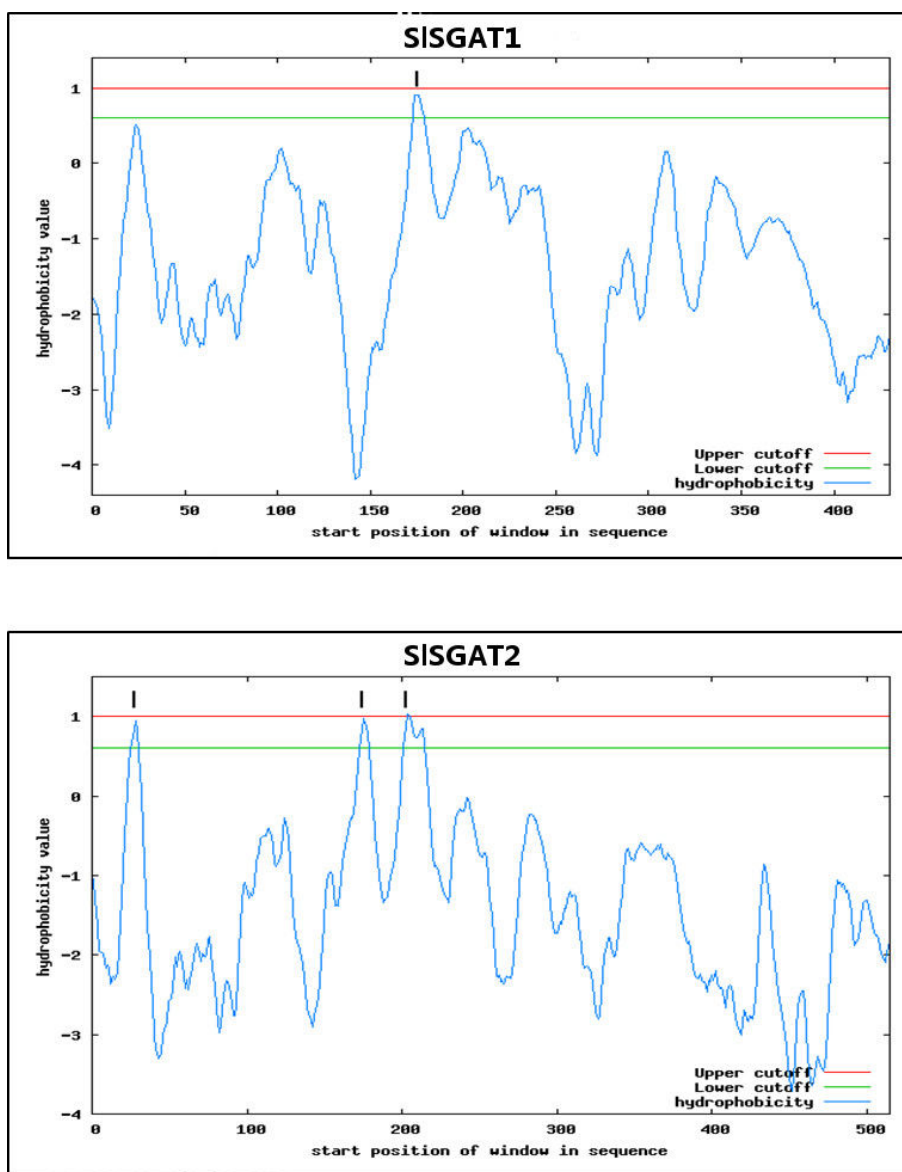
De acuerdo con el mecanismo de acción previsto para la enzima SGAT esta debería tener un dominio de reconocimiento de SG así como otros con actividad fosfolipasa y aciltransferasa. Dado que tanto los sustratos como el producto(s) de reacción tienen un elevado componente hidrofóbico, es muy posible que la proteína SGAT esté asociada a membranas celulares, ya sea como componente integral de las mismas o como proteína asociada. El caso de ser proteínas integrales de membranas, las proteínas SGAT deberían tener uno o más regiones hidrofóbicas que pueden actuar como secuencias de anclaje a las membranas. Es por ello que las proteínas SISGAT1 y SISGAT2 se analizaron con el software bioinformático TopPred 1.10 (“Topology prediction of membrane proteins”) utilizando los parámetros por defecto. En la Figura 40 se muestran los perfiles hidropáticos de SISGAT1 y SI.SGAT2. Las dos proteínas muestran un marcado carácter hidrofílico y en ningún caso se observa ninguna región lo suficientemente hidrofóbica que pueda representar un dominio transmembrana.

Con el fin de estudiar la localización subcelular de las proteínas SISGAT1 y SISGAT2 se decidió expresar variantes de dichas proteínas fusionadas con la proteína fluorescente amarilla (enhanced Yellow Fluorescent Protein, eYFP) de forma transitoria en las hojas de *Nicotiana benthamiana* y estudiar su distribución intracelular de la fluorescencia mediante microscopía láser confocal.

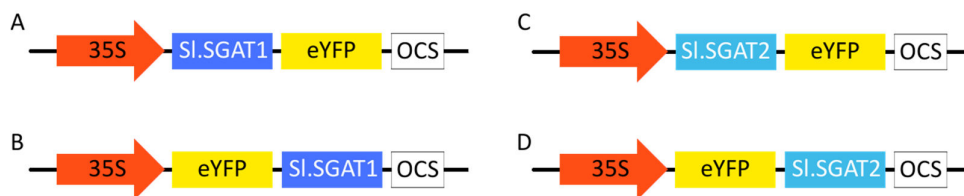
Para la preparación de los vectores de expresión se procedió a la recombinación de los 4 vectores pENTRY mostrados en la (Tabla 14) con los vectores de destino pEarleyGate 101 (CD3-683) y pEarleyGate 104 (CD3-686) (Earley et al., 2006) mediante una recombinación usando la enzima LR Clonase II Plus (Life Technologies). El vector pEarleyGate 101 (CD3-683) permitió la fusión del transgén correspondiente con la proteína eYFP en posición C-terminal, mientras que en el vector pEarleyGate 104 (CD3-686) se fusionó con eYFP en la posición N-terminal (Earley et al., 2006). Los plásmidos recombinantes obtenidos (pSISGAT1:eYFP,



peYFP:SIGAT1, pSIGAT2:eYFP y peYFP:SIGAT2) fueron confirmados mediante secuenciación. En la Figura 41 se muestran de forma esquemática la estructura de los vectores de expresión generados.



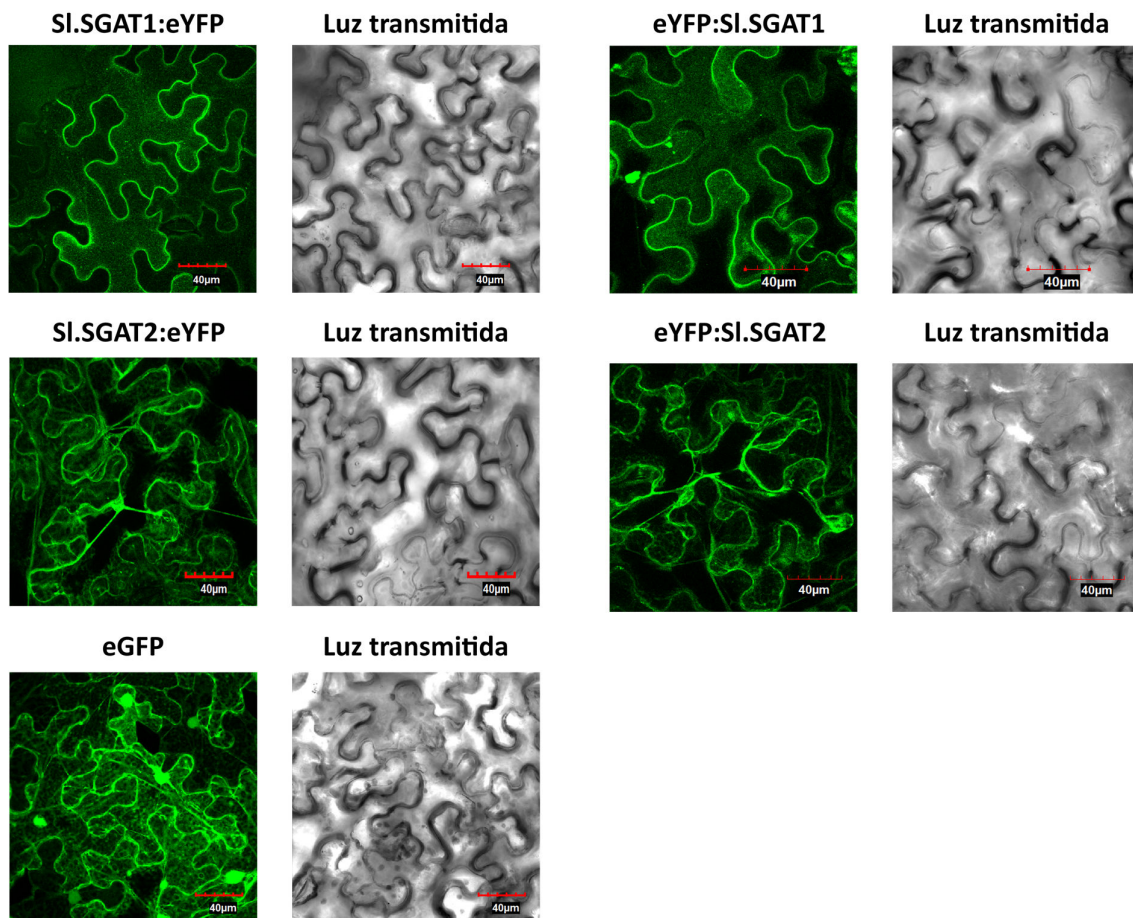
**Figura 40. Perfil de hidrofobicidad de las enzimas SIGAT1 y SIGAT2.** Predicción de localización subcelular de las enzimas SIGAT1 y SIGAT2 mediante el perfil de hidrofobicidad con el software de predicción TopPred 1.10.



**Figura 41. Esquema de los vectores de expresión para la localización subcelular de SISGAT1 y SISGAT2.** Representación esquemática (no dibujada a escala) de las construcciones utilizadas para los estudios de localización subcelular de las proteínas SISGAT1 y SISGAT2 en hojas de *N. benthamiana*. **A)** pSISGAT1:YFP; **B)** pYFP:SI.SGAT1; **C)** pSISGAT2:eYFP y **D)** pYFP:SISGAT2. 35S, promotor CaMV 35S; OCS, secuencia terminadora del gen de la octopina sintasa.

Lo plásmidos pSISGAT1:eYFP, pYFP:SI.SGAT1, pSISGAT2:eYFP y pYFP:SISGAT2 fueron posteriormente introducidos en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58 GV2260 y, tras verificar que las bacterias transformadas contenían el plásmido correcto, éstas se utilizaron para agroinfiltrar hojas de *N. benthamiana* (sección 6.1.12, de Materiales y Métodos). Para aumentar la eficiencia de la expresión del transgén, las hojas fueron coinfectadas con una cepa de *A. tumefaciens* “helper” que expresa una proteína de potivirus denominada Helper Component-Proteinase (HC-PRO, EC 3.4.22.45) (Llave et al., 2000), la cual interfiere con el silenciamiento post-transcripcional de genes (“posttranscriptional gene silencing” o PTGS) de *N. benthamiana*. Las plantas infiltradas se mantuvieron 3 días en un régimen de 16 h de luz y 8 h de oscuridad en una cámara de invernadero con alta humedad hasta el momento de la observación utilizando un microscopio confocal.

En la Figura 42 se muestran los resultados obtenidos en los estudios preliminares de localización subcelular. Se puede observar que la proteína SISGAT1 fusionada con eYFP tanto en el extremo N- como en el -C terminal mostraba una posible localización en la membrana plasmática. Las construcciones equivalentes de la proteína SISGAT2 mostraron una localización citosólica-nuclear similar a la de la proteína fluorescente verde eGFP, utilizada como control.

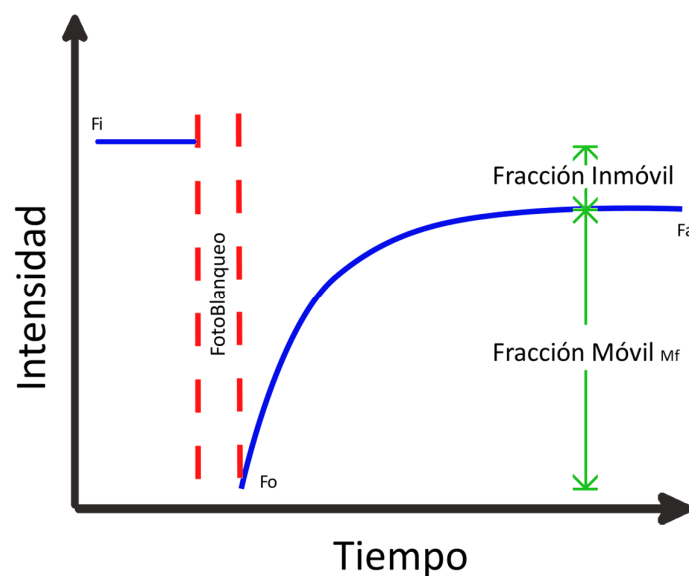


**Figura 42. Localización subcelular de las proteínas candidatas SIGAT1 y SIGAT2 en hojas de *N. benthamiana*.** Imágenes apiladas de diferentes planos de células epiteliales de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones pSIGAT1:eYFP, peYFP:SI.SGAT1, pSIGAT2:eYFP y peYFP:SIGAT2. eGFP corresponde a la expresión de la proteína fluorescente verde.

Para confirmar los resultados obtenidos se empleó la técnica de FRAP (“Fluorescence Recovery After Photobleaching”), la cual permite estimar la movilidad de las proteínas fluorescentes en células intactas. Así, la exposición de una proteína marcada con fluorescencia a una radiación láser de alta intensidad durante un determinado período de tiempo causa la extinción irreversible del fluoróforo (fotoblanqueo o “photobleaching”) en el área afectada. Posteriormente las proteínas fluorescentes no afectadas pueden migrar hacia la región tratada, hecho que se puede visualizar como una recuperación de la fluorescencia en dicha zona. La tasa de recuperación de la fluorescencia a lo largo del tiempo permite estimar la movilidad de la proteína en el entorno subcelular en el que se encuentra. La tasa

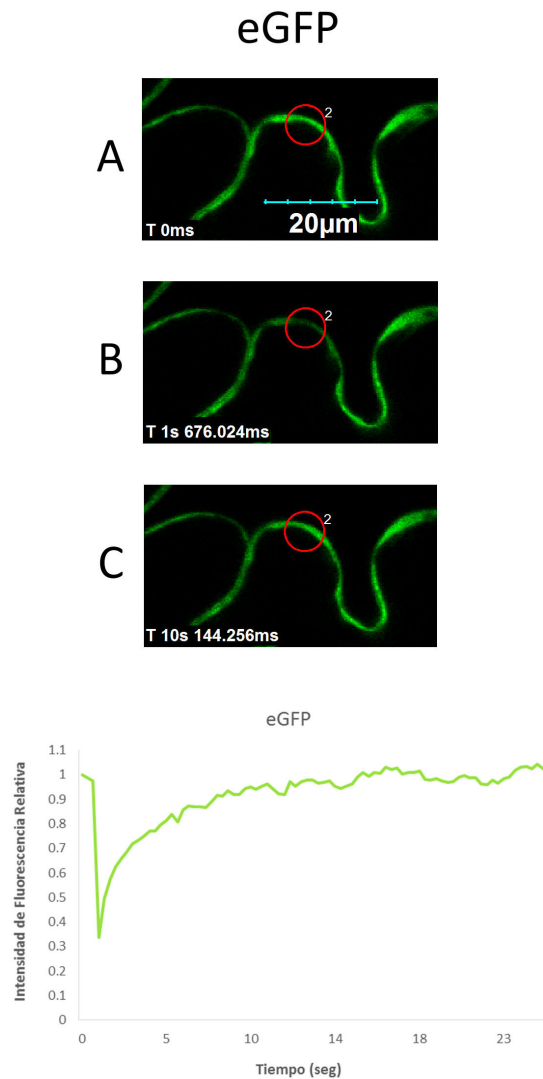
de recuperación en los experimentos de FRAP está influenciada por la temperatura, la viscosidad del medio y el diámetro de las proteínas (Lippincott-Schwartz et al., 2003). En el caso de las proteínas de membrana está descrito que tienen una tasa de difusión menor, y por ende una tasa de recuperación más baja, que las localizadas en el citosol debido a que se encuentran en un medio relativamente más viscoso (White and Stelzer, 1999; Held et al., 2008; Luu et al., 2012). En una típica curva de FRAP (Figura 43) la fracción móvil proporciona información sobre la movilidad de una proteína fluorescente dentro de la célula. Esto se determina calculando el ratio de la intensidad de la fluorescencia inicial y la final en la región afectada, corrigiendo la cantidad de fluorescencia eliminada durante el tratamiento de acuerdo con la ecuación descrita por (White and Stelzer, 1999; Lippincott-Schwartz et al., 2003):

$$Mf = \frac{Fa - Fo}{Fi - Fo}$$



**Figura 43. Gráfico ideal de un experimento FRAP.** Gráfico que dibuja la intensidad de la fluorescencia como una función del tiempo que muestra los parámetros de fracción móvil e inmóvil. La fracción móvil es la proporción de la fluorescencia recuperada, indicada por la diferencia entre la fase inicial y final de la fluorescencia.  $F_i$ , fluorescencia inicial;  $F_o$ , fluorescencia después del fotoblanqueo;  $F_a$ , fluorescencia final;  $M_f$ , fracción móvil.

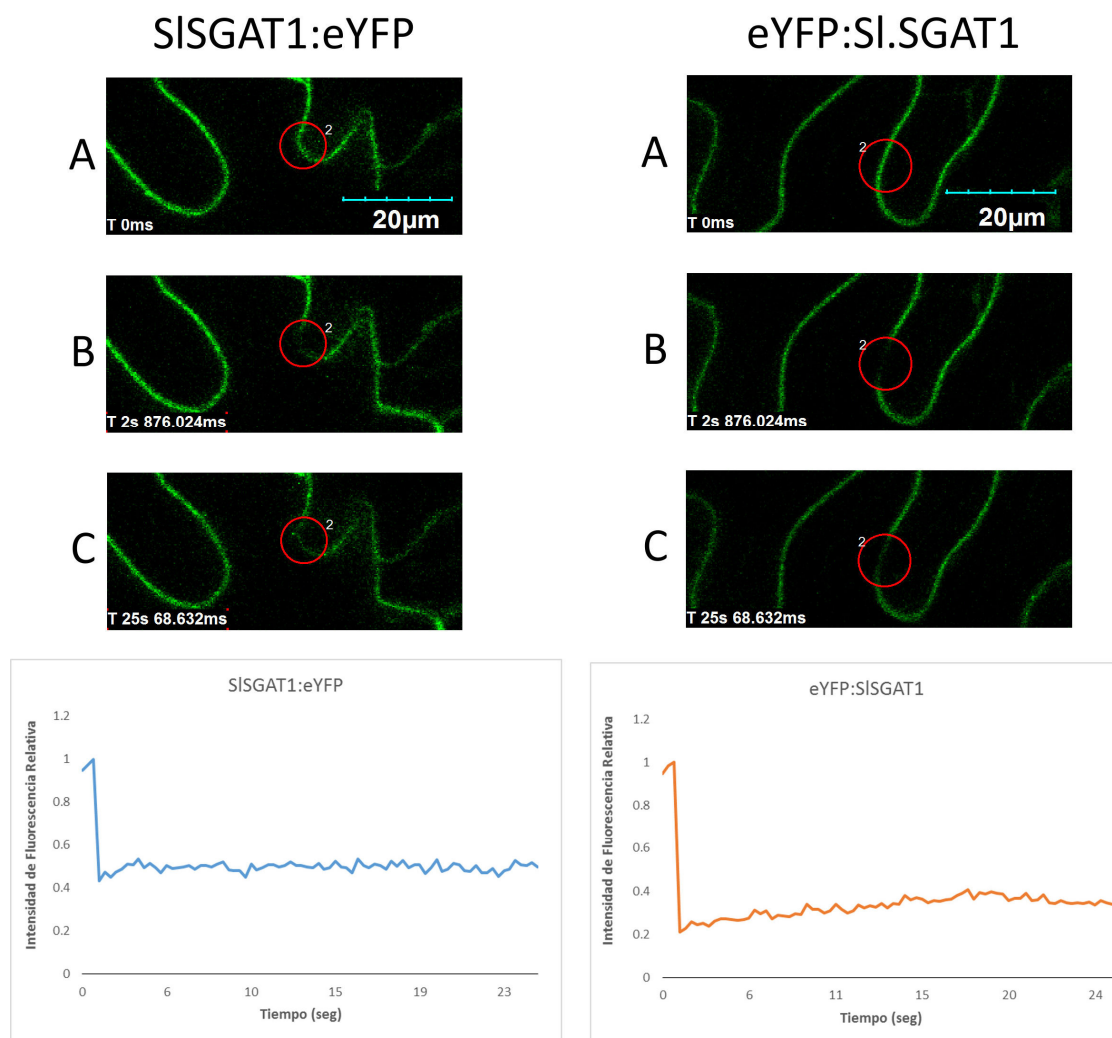
En la Figura 44 se muestra un experimento de FRAP realizado en células que expresan la proteína eGFP. Se puede observar como la recuperación de la fluorescencia en la zona afectada es muy rápida, llegando a ser casi total en menos de 10 segundos. Empleando la ecuación descrita más arriba se obtiene un valor de  $Mf = 1.1$ , el cual indica que dicha proteína muestra una movilidad muy elevada, lo cual es de esperar para una proteína que se localiza en el citosol.



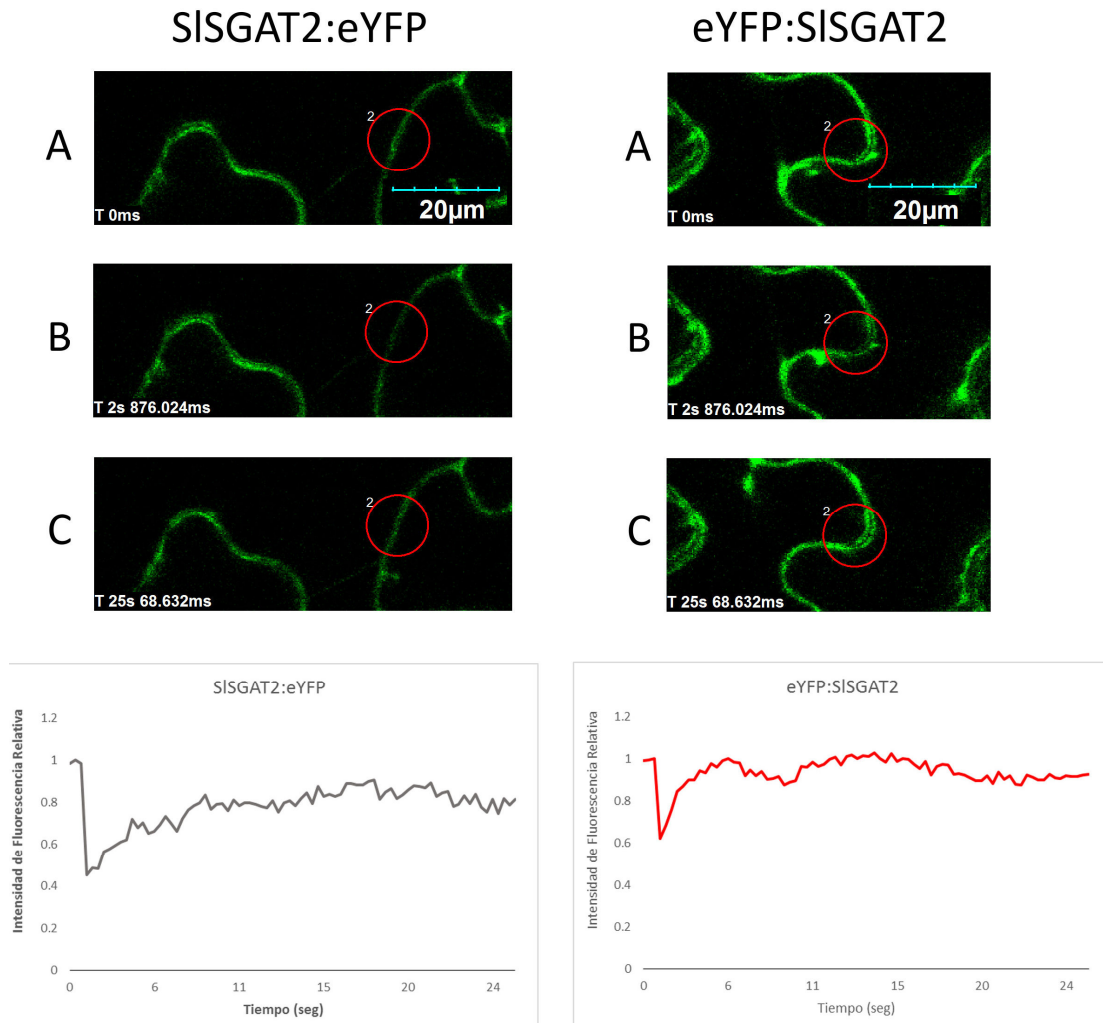
**Figura 44. Experimento de FRAP en células que expresan la eGFP.** Secuencia de imágenes (A y B) correspondientes a una zona fotoblanqueada (círculo rojo) en una célula epitelial de *N. benthamiana* que expresa eGFP y la consiguiente recuperación de la fluorescencia en la zona afectada (C). En la parte inferior se muestra el gráfico de la fluorescencia de la zona afectada a lo largo del proceso.

La proteína SISGAT1 fusionada a la proteína eYFP en los extremos N- y -C terminal fue evaluada de la misma manera que la eGFP y se obtuvieron los resultados que se muestran en las Figura 45. En ambos casos se observó que la recuperación de la fluorescencia en la zona afectada no fue completa a los 25 segundos después del fotoblanqueo. Estos resultados fueron validados cuantitativamente de acuerdo con los gráficos mostrados en la parte inferior de la Figura 45. El valor de la fase móvil ( $M_f$ ) para la construcción SISGAT1:eYFP fue de 0.18 mientras que para eYFP:SISGAT1 fue de 0.26. Estos valores están de acuerdo con los resultados mostrados anteriormente que indicarían la localización de la proteína SISGAT1 en la membrana plasmática.

Un experimento equivalente fue realizado con la proteína SISGAT2 fusionada a la proteína eYFP en los extremos N- y C- terminal. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 46. Se puede observar que en ambos caso se obtiene una rápida recuperación de la fluorescencia, que es prácticamente completa en ambas imágenes a los 30 segundos posteriores al tratamiento. Los valores de la fase móvil ( $M_f$ ) para las construcciones SI.SGAT2:eYFP y eYFP:SI.SGAT2 fueron de 0.83 y 1.07, respectivamente. Estos valores cuando son comparados son similares a los obtenidos de la construcción eGFP, lo que indica que ambas construcciones tienen una localización citosólica.



**Figura 45. Experimento de FRAP en células que expresan la proteína SISGAT1 fusionada a eYFP.** Secuencia de imágenes (A y B) correspondientes a una zona fotoblanqueada (círculo rojo) en una célula epitelial de *N. benthamiana* que expresa SISGAT1:eYFP (izquierda) y eYFP:SISGAT1 (derecha) y la consiguiente recuperación de la fluorescencia en la zona afectada (C). En la parte inferior se muestra el gráfico de la fluorescencia de la zona afectada a lo largo del proceso.



**Figura 46. Experimento de FRAP en células que expresan la proteína SISGAT2 fusionada a eYFP.** Secuencia de imágenes (A y B) correspondientes a una zona fotoblanqueada (círculo rojo) en una célula epitelial de *N. benthamiana* que expresa SISGAT2:eYFP (izquierda) y eYFP:SISGAT2 (derecha) y la consiguiente recuperación de la fluorescencia en la zona afectada (C). En la parte inferior se muestra el gráfico de la fluorescencia de la zona afectada a lo largo del proceso.



# DISCUSIÓN



## 4. Discusión

A diferencia del resto de especies vegetales, el tomate (*Solanum lycopersicum*) y otras especies del género *Solanum* presentan niveles particularmente elevados de esteroides conjugados glucosilados tanto en la planta como en el fruto. La significación biológica y evolutiva de esta composición atípica de esteroides es totalmente desconocida (Duperon et al., 1984; Moreau et al., 2002; Nyström et al., 2012). Además, durante la maduración del fruto se producen cambios drásticos en los niveles totales y las proporciones relativas de los esteroides libres y conjugados, lo que sugiere que ambos hechos están relacionados entre sí. Por otra parte, estudios recientes indican que los esteroides juegan un papel muy relevante y en algunos casos esencial, no solo en la regulación del desarrollo de las plantas sino también en la respuesta a diferentes tipos de estrés (Griebel and Zeier, 2010; Nyström et al., 2012; Wang et al., 2012; Wang et al., 2012; Kopischke et al., 2013; Mishra et al., 2013)). A partir de estas observaciones, se ha planteado la hipótesis de que el metabolismo y la composición de esteroides tan característica del tomate pueden ser particularmente importantes para el crecimiento y desarrollo de la planta, la maduración del fruto y la respuesta a condiciones de estrés, por lo que es razonable pensar que a través de la manipulación racional de dicho metabolismo se pueden obtener plantas con características agronómicas mejoradas en términos de calidad de fruto y tolerancia a estrés biótico y abiótico.

A pesar de su ubicuidad e importancia biológica, las enzimas del metabolismo de los esteroides conjugados están aún poco estudiadas. Los únicos genes de plantas implicados en la síntesis de SE que se han caracterizado son los que codifican una acil-CoA:esterol aciltransferasa (ASAT1) y una fosfolípido:esterol aciltransferasa (PSAT1) en *Arabidopsis* (Banas et al., 2005; Chen et al., 2007; Bouvier-Nave et al., 2010). En cuanto a la síntesis de SG, está catalizada por la UDP-glucosa:esterol glucosiltransferasa (SGT). Esta actividad enzimática ocupa una posición clave en el metabolismo de los esteroides porque conecta el metabolismo de las formas no glucosiladas (FS y SE) con el de las glucosiladas (SG y ASG) (Figura 9). De forma similar a las esteroides aciltransferasas, los estudios a nivel molecular sobre las SGT son también escasos. Hasta la fecha, solamente se han clonado y caracterizado SGTs en un

número reducido de plantas (Warnecke et al., 1997; Sharma et al., 2007; DeBolt et al., 2009; Chaturvedi et al., 2012). En cuanto a la síntesis de ASGs, todavía no se ha descrito ningún gen de ningún organismo que codifique para una esterilglucósido aciltransferasa (SGAT).

En el contexto del presente trabajo es importante destacar también la reconocida relevancia de la enzima HMG-CoA reductasa (HMGR) en la regulación del flujo de precursores metabólicos hacia la síntesis de esteroides (Hemmerlin et al., 2012; Hemmerlin, 2013; Rodríguez-Concepción and Boronat, 2015). En el tomate existen 4 genes que codifican para HMGR, pero su papel en regulación de la síntesis de esteroides durante la maduración del fruto no ha sido aún descrito en la literatura. Otra enzima que podría tener un relevancia especial en el metabolismo de esteroides en el fruto de tomate es la C22 esteroide desaturasa (SD), enzima que cataliza la conversión del  $\beta$ -sitosterol en estigmasterol. Durante la maduración del fruto se produce un marcado incremento de la relación estigmasterol: $\beta$ -sitosterol (Whitaker and Gapper, 2008). La inducción de SD no se produce en los frutos de los mutantes *nor* y *rin*, lo que concuerda con la observación de que la relación estigmasterol: $\beta$ -sitosterol tampoco se modifica en el fruto en estos mutantes (Whitaker et al, 2008). Es interesante resaltar que en las etapas finales del proceso de maduración del fruto se producen una serie de cambios que se ha propuesto que propician el deterioro del fruto para favorecer la dispersión de las semillas (Prusky, 1996), entre ellos un incremento de la sensibilidad a patógenos oportunistas como *Botrytis cinerea* (Cantu et al., 2009). En este contexto, es razonable hipotetizar que el cambio en la relación estigmasterol: $\beta$ -sitosterol podría jugar un papel importante en el programa de maduración del fruto del tomate, dada su capacidad para influir en la respuesta de las plantas frente a la infección por patógenos.

En base a estos antecedentes, en este proyecto de tesis se han abordado aproximaciones genéticas basadas en la generación de plantas transgénicas que permitan disponer de variedades de tomate con contenidos y perfiles de esteroides modificados. La disponibilidad de estas plantas permitirá evaluar el papel de esteroides específicos en procesos relacionados tanto con en el crecimiento y desarrollo de la planta y su respuesta a estrés como con la maduración del fruto o su susceptibilidad al ataque por patógenos. Ello debería

contribuir no solo a una mejor comprensión de la función biológica de los esteroides en el tomate sino también al desarrollo de nuevas estrategias orientadas a la mejora de la calidad del fruto y de la tolerancia a distintos tipos de estrés. También se han utilizados aproximaciones bioquímicas, proteómicas y genómicas para identificar nuevos genes potencialmente implicados en el metabolismo de los esteroides conjugados en tomate.

#### **4.1. Obtención y caracterización de líneas transgénicas de tomate (*S. lycopersicum* var. Micro-Tom) afectadas en la expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis y el metabolismo de esteroides.**

Uno de los objetivos del presente trabajo ha sido la generación de líneas transgénicas de tomate (var. Micro-Tom) capaces de silenciar o sobreexpresar genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis y el metabolismo de los esteroides en el tomate con el fin de evaluar los fenotipos morfológicos y bioquímicos asociados a dichas manipulaciones genéticas.

Como se describe en apartado 3.1 de Resultados, se utilizaron dos genes involucrados en la biosíntesis de esteroides: el gen que codifica para SD y el que codifica para la isoforma HMGR2. Está descrito en la literatura que el gen que codifica para HMGR2 se activa al principio del proceso de maduración del fruto, llegando a su máxima expresión cuando el fruto alcanza los estadios naranja y rojo. La expresión de HMGR2 tiene una relación inversa con la expresión de la isoforma HMGR1 en este tejido (Rodríguez-Concepcion and Gruijssem, 1999). Como se ha indicado anteriormente, la HMGR está considerada como la enzima reguladora más importante en la biosíntesis de isoprenoides en las plantas. Es por ello que se consideró que tanto el silenciamiento como la sobreexpresión de HMGR2 deberían tener un efecto importante en el contenido total de esteroides en el fruto. Teniendo en cuenta también que la enzima SD es la encargada de regular la relación  $\beta$ -sitosterol:estigmasterol, la generación de líneas transgénicas en donde se encuentre alterada la expresión del gen SD en

el fruto deberían ser de gran interés para entender la posible función señalizadora de dichos esteroides en el proceso de maduración del fruto o su respuesta a estrés.

La regulación de la expresión de los genes SD y HMGR2 específicamente en el fruto fue llevada a cabo con el uso de los promotores E8 y PLI, los cuales se expresan de forma específica en este órgano. El promotor E8 se induce desde las etapas tardías del desarrollo de tomate (estado verde maduro) y su expresión aumenta de forma progresiva hasta los estados naranja y rojo (Deikman et al., 1992). Por su lado el promotor PLI inicia su expresión de forma muy gradual desde las primeras etapas de desarrollo del fruto e incrementa de forma progresiva durante todo el proceso de desarrollo y maduración (Estornell et al., 2009). Con estos promotores se generaron los vectores de expresión de las construcciones de interés utilizando el sistema de recombinación Gateway, el cual ha mostrado ser una herramienta muy versátil para abordar este tipo de estudios.

Previo a la caracterización de las líneas transgénicas generadas, se realizó un estudio de la cigosis de los transgenes en las plantas de la generación T1 con el fin de seleccionar aquellas plantas homocigotas para el transgén de interés. Dado que la transformación de material genético vegetal se ha vuelto un procedimiento habitual para el estudio funcional de los genes y también por su interés biotecnológico, ha habido un interés en el desarrollo de técnicas que permitan determinar el número de copias de los transgenes utilizando un método fácil, rápido, fiable y de bajo coste. Cuando la transformación se realiza en plantas con un ciclo biológico rápido y que producen grandes cantidades de semillas, como es el caso de *Arabidopsis thaliana*, la discriminación de las plantas homocigotas mediante segregación del gen de selección es el método más utilizado. Desafortunadamente, este método no es el más adecuado para el tomate. Además, las plantas que poseen 1 o 2 eventos de integración presentan normalmente niveles más altos de expresión que las que contienen múltiples copias del transgén y que, por otra parte son más inestables. Todo ello, sumado a la tendencia a buscar plantas homocigotas para los distintos eventos de transformación, hace que el análisis del número de copias en la primera generación de plantas transgénicas (T0) sea un aspecto especialmente importante. La técnica de Southern Blot es el método clásico para la

estimación del número de copias de un determinado transgén en el genoma. No obstante, este método tiene altos requerimientos de tiempo y material. Es por ello que en los últimos años se han desarrollado métodos alternativos basados en el uso de qPCR para identificar el número de copias de los transgenes de manera más rápida y simple. No obstante, todos los métodos descritos en la literatura requieren de algún paso agregado o bien disponer de algún gen de referencia o material vegetal adicional (Weng et al., 2004; Shepherd et al., 2009). En el presente trabajo se ha puesto a punto una nueva técnica basada en el método comparativo  $2^{-\Delta Ct}$  utilizando el gen Lat52, de copia única en el tomate, como control interno. Este método ha sido utilizado con éxito para la cuantificación rápida y fiable del número de copias de los transgenes de interés en el genoma de las plantas transgénicas T0 generadas en este trabajo. Ello permitió realizar un segundo análisis dirigido de las plantas T1 que permitió identificar las plantas transgénicas homocigotas para el transgén de interés durante su crecimiento. El método puesto a punto demostró ser fácil de aplicar, reproducible y fiable.

Las primera líneas transgénicas generadas en el presente trabajo fueron las correspondientes a la construcción amiSD-E8 y diseñadas para el silenciamiento del gen SD durante la maduración del fruto. A nivel fenotípico no se observó ningún cambio durante la maduración del fruto. Desafortunadamente, en el momento de la recolección de los frutos para sus análisis se observó la ausencia de semillas, siendo pues estas líneas estériles y, por lo tanto, sin posibilidad de pasar a la siguiente generación. Este resultado inesperado de esterilidad en todas las líneas con esta construcción que se lograron generar, hizo que estas líneas se perdieran. Aunque las causas de la esterilidad no se conocen, se sugiere que estas líneas estuvieran bajo cierto tipo de estrés durante el proceso de regeneración. Es por ello que fue necesario repetir la transformación. Las nuevas plantas transgénicas obtenidas no han podido ser incluidas en la presente memoria. No obstante, con las muestras de fruto que se recolectaron en la primera tanda de transformación se pudo analizar el perfil de expresión del gen SD en diferentes estadios de desarrollo del fruto, mostrándose un silenciamiento eficiente del gen diana en todos los casos.

El proceso de generación de plantas transgénicas continuó con la generación de plantas diseñadas para el silenciamiento de la HMGR2 bajo el control de los promotores PLI y E8. Una observación interesante fue la afectación de la textura de la epidermis de los frutos producidos por la línea amiH2-PLIb. La piel de estos frutos tenía una textura rugosa al tacto, a manera de pequeñas protuberancias, y un tono de color muy opaco en comparación con los frutos wt. Es este sentido es interesante indicar que el promotor PLI descrito por Estornell et al. (2009) tiene una expresión inicial muy intensa en la epidermis durante los primeros estadios de crecimiento del fruto que luego se extiende al resto de tejidos del fruto. Este hecho podría estar relacionado con el cambio fenotípico observado ya que la vía del MVA podría estar implicada directamente en la síntesis de precursores isoprenoides utilizados en la síntesis de componentes de la epidermis del fruto. A pesar de esta correlación, estos resultados deben ser tomados con cautela y es necesario comprobar este fenotipo en las plantas de la siguiente generación.

La técnica qPCR  $2^{-\Delta Ct}$  puesta a punto en este trabajo se utilizó también para determinar el número de inserciones del transgén en el genoma de las diversas líneas transgénicas generadas. Los resultados con esta técnica indicaron que para la construcción amiH2-PLI existían 3 líneas T0 que contenían una única inserción del transgén en el genoma, para la construcción amiH2-E8 se detectaron 4 líneas T0 con las mismas características y, por último, para la construcción oeSD-E8 se obtuvo una única planta T0 que poseía 2 inserciones. Con el número de inserciones conocido fue posible analizar la progenie de estas plantas para determinar la homocigosis en la generación siguiente T1.

Cuando se obtiene una línea que posee una sola inserción del transgén en el genoma, la probabilidad de obtener una planta homocigota en la siguiente generación es del 25%. Los resultados mostrados en la Tabla 7 muestran que para cada línea hemocigota de la construcción amiH2-PLI se obtuvo al menos una planta homocigota. En el caso de la construcción ami2-E8 únicamente se identificó una planta homocigota. Para la única línea oeSD-E8 generada se analizaron las plantas de la siguiente generación, donde se pudo determinar aquellas plantas que poseían una sola inserción del transgén. Ello permitirá



obtener las plantas homocigotas para una sola inserción en la generación T2. En su conjunto, los resultados obtenidos han validado que la técnica qPCR  $2^{-\Delta Ct}$  puesta a punto en este trabajo resulta una herramienta muy útil y fácil de implementar que permite identificar de forma rápida y fiable la cigosidad de una determinada planta ya durante el proceso de desarrollo de las plantas transgénicas T1.

En las plantas homocigotas de las construcciones amiH2-PLI y amiH2-E8 se analizaron los niveles de expresión del gen HMGR2. Los resultados mostrados en la Figura 18 y Figura 23 evidencian el silenciamiento casi total de la expresión de la isoforma HMGR2 en las líneas transgénicas, indicando de esta manera que el silenciamiento mediante amiRNAs, utilizando los promotores PLI y E8, es muy efectivo. Contrariamente a lo esperado del hecho de haber silenciado casi por completo el gen HMGR2 en los frutos, no se observó ningún cambio en el tiempo de maduración y ni en la coloración de los frutos. La enzima HMGR2 está directamente involucrada en la maduración del fruto de tomate, donde se conoce que la expresión del gen aumenta y tiene una relación inversa con la expresión de la isoforma HMGR1 (Rodríguez-Concepcion and Gruijssem, 1999). Por lo tanto, la isoforma HMGR2 reemplaza a la isoforma HMGR1 durante las etapas de maduración del fruto. Es por ello que se intentó buscar una respuesta en la expresión de otras isoformas de la HMGR de tomate cuya expresión en el fruto no había sido descrita previamente. En la Figura 19 se muestran la expresión de los genes que codifican las isoformas HMGR1, HMGR2 y HMGR3 en los estadios de desarrollo y maduración del fruto. Al comparar los resultados de los perfiles de expresión de dichos genes en términos de valores absolutos se observó un aumento muy significativo de la expresión de la isoforma HMGR3, especialmente en el estadio verde maduro. Este hecho no había sido descrito previamente en la literatura. Es posible por lo tanto que la isoforma HMGR3 reemplace la función de la isoforma HMGR2 en los frutos silenciados siendo ésta la causa por la cual no se han observado cambios fenotípicos en los frutos transgénicos. A estos detalles es importante resaltar que la variedad Micro-Tom en la que se han realizado tiene modificaciones genéticas y que pueden resultar en comportamiento distinto al de otras variedades más estudiadas como MoneyMaker o Ailsa Craig.

En dos líneas amiH2-E8 se observaron semillas germinadas y plántulas en crecimiento (Figura 22). La causa de este fenómeno no es clara pero sugiere que la isoforma HMGR2 podría estar involucrada en la producción de algún compuesto implicado en la señalización de la dormancia de las semillas durante la maduración del fruto. Es posible también que pueda tener que ver con la expresión de los genes que codifican las distintas isoformas del gen HMGR. En este sentido es importante indicar que los resultados obtenidos del análisis del perfil de expresión de los genes HMGR1, HMGR2 y HMGR3 en la plantas transgénicas amiH2-E8 c3 y amiHMGR2-E8 b2 (Figura 24 y Figura 25) muestran un aumento notable de la expresión del gen de la isoforma HMGR3 en el estadio verde, como ya se había observado en las líneas de silenciamiento de HMGR2 mediado por el promotor PLI. A este cambio en la expresión de la HMGR3, se suma el cambio inesperado de la expresión del gen que codifica para la isoforma HMGR1, que muestra niveles de transcritos elevados en fruto rojo, cuando está descrito que esta isoforma disminuye su expresión a medida que avanza el proceso de maduración.

Estos cambios en la expresión de los genes que codifican las distintas isoformas del gen HMGR en los frutos transgénicos sugieren que la regulación de la síntesis de isoprenoides en el fruto está regulada a través de distintos puntos de control y que el silenciamiento de la isoforma HMGR2 no fue suficiente para alterar el tiempo o ciclo de maduración de los frutos. No obstante, hacen falta estudios adicionales sobre este tema para lograr una mejor comprensión del papel de la isoforma HMGR2 en la maduración del fruto.

#### **4.2. Identificación y clonación de genes candidatos de la enzima esterilglucósido aciltransferasa (SGAT) en *Solanum lycopersicum* var Micro-Tom.**

Tal como se ha indicado anteriormente, todavía no se ha descrito ningún gen de ningún organismo que codifique para una esterilglucósido aciltransferasa (SGAT). En el caso del tomate y otras especies del género *Solanum*, esta enzima es especialmente relevante ya

que los acilesterilglucósidos (ASG) son los esteroides conjugados más abundantes (Whitaker, 1988).

Estudios anteriores habían descrito la función de enzimas capaces de transferir una molécula de ácido graso al grupo hidroxilo de la molécula de azúcar de un esteril-glucósido y así crear el compuesto ASG en diversas plantas (Lepage, 1964; Ongun and Mudd, 1970; Elbein et al., 1975; Zdzislaw et al., 1975; Potocka and Zimowski, 2008), pero hasta el momento no se ha descrito la secuencia de la proteína encargada de realizar esta función ni mucho menos la del gen correspondiente. En el tomate, los ASGs representan el 56% de los esteroides totales (Duperon et al., 1984) y es por ello que se lo consideró un buen modelo para caracterizar proteínas con actividad SGAT. Este trabajo comenzó con el objetivo final de identificar un gen (o genes) candidatos en tomate asociados a dicha función enzimática. Para ello se procedió inicialmente a la purificación de un extracto enzimático a partir de frutos del estadio breaker siguiendo el procedimiento que describieron Potocka and Zimowski (2008). Los resultados de estos experimentos permitieron preparar un extracto enzimático no deslipidizado completamente en el cual se pudo detectar la actividad enzimática de la proteína SGAT (Figura 28). Mediante cromatografía de exclusión molecular fue posible aislar posteriormente fracciones en el rango de tamaño de los 140 kDa enriquecidas en actividad SGAT. Este resultado era consistente con los de otros estudios (Eichenberger and Siegrist, 1975; Zimowski and Wojciechowski, 1983; Potocka and Zimowski, 2008) donde habían identificado que el monómero de la enzima SGAT tendría un tamaño de entre 60 - 90 kDa y la proteína tendría una composición dimérica. Las proteínas presentes en estas fracciones fueron separadas mediante SDS-PAGE y las proteínas contenidas en el rango de tamaño antes mencionado fueron escindidas del gel y analizadas mediante espectrometría de masas. Entre las proteínas identificadas, se encontró una proteína de 50.5 kDa con código UNIPROT K4D5B5, que presentaba características especialmente interesantes y que la hacían una buena candidata a tener actividad SGAT.

Realizando una búsqueda *in silico*, se halló que la proteína K4D5B5 (a la que se denominó SISGAT1) tiene una secuencia que SolCyc describe como muy cercana en cuanto a

su posible función y que corresponde con la de la proteína Q71LX7 (denominada SISGAT2) con un tamaño de 60.4 kDa. Estas proteínas poseen un 55% de similitud entre ellas y ninguna de las dos había sido caracterizada hasta aquel momento. Ambas proteínas candidatas, SISGAT1 y SISGAT2, poseen dominios conservados relacionados a las funciones LCAT y LipA y se encuentran dentro de la superfamilia descrita como PLN02733 y que tiene una función fosfatidilcolina-esterol O-aciltransferasa. Los resultados del análisis de funciones y sitios conservados para ambas proteínas indicaron que estas proteínas podrían estar involucradas con funciones de liberación de ácidos grasos y de aciltransferencia a esteroides, lo cual sería compatible con la función propuesta para la enzima SGAT, en la que debe ocurrir la liberación de un ácido graso a partir de un fosfolípido para ser posteriormente transferido a un esterilglucósido.

A su vez, una búsqueda de proteínas ortólogas en *A. thaliana* mostraron dos proteínas equivalentes a SISGAT 1 y SLSGAT2 y anotadas con funciones LCAT y fosfolipasa (Tabla 12 y Tabla 13). Esta observación resultó interesante porque que estas proteínas de *A. thaliana* habían sido caracterizadas en estudios previos pero no se las había asociado con la función SGAT (Noiriel et al., 2004; Stahl et al., 2004).

Con la premisa que las proteínas candidatas identificadas podían estar relacionadas con la función SGAT, se consideró oportuno tener una primera estimación de su perfil de expresión en los distintos tejidos y estadios de desarrollo de la planta de tomate. Estos análisis se realizaron en la base de datos Tomato eFP Browser. Los genes que codifican para SISGAT1 y SISGAT2 muestran una expresión ubicua en toda la planta, pero especialmente intensa en el fruto. El perfil de expresión de los dos genes mostró un aumento a medida que avanza la maduración del fruto. Estudios anteriores realizados por Whitaker (1988) mostraron una ligera disminución gradual de los niveles de ASG en el fruto a lo largo del proceso de maduración. Estos datos de expresión no concordarían con los resultados encontrados por Whitaker (1988) ya que por lo general se asocia una mayor acumulación de transcrito con una mayor cantidad de enzima y, por lo tanto, con unos mayores niveles del metabolito correspondiente. Es posible que esta discrepancia puede ser debida a la variedad de tomate

que se utilizó en cada caso, ya que, como se ha indicado antes, ésta puede tener una influencia importante en los niveles de expresión de determinados genes.

Otro aspecto que se abordó en el presente trabajo ha sido el estudio de la localización subcelular de las proteínas SISGAT1 y SISGAT2. Ello se consideró importante ya que la ubicación subcelular de estas proteínas podría dar alguna indicación sobre el tipo de sustratos que utiliza. Los dos sustratos de la enzima SGAT son un fosfolípido y un esteroil glucosilado, lo cual hace pensar que la proteína debería estar en la membrana, o bien asociada a la misma, para un mejor acceso a dicho sustratos. El software TopPred predijo que las proteínas SISGAT1 y SISGAT2 (Figura 40) serían citosólicas. Esto no sería a priori ningún inconveniente ya que existe evidencia de que la necesidad de sustratos hidrofóbicos no hace necesario que la proteína esté alojada en la membrana. Este sería el caso de la enzima LCAT de *H. sapiens* que se ha caracterizado como una proteína soluble en agua que se adhiere de forma reversible a superficies lipídicas y utiliza sustratos lipídicos durante el proceso de catálisis (Jonas, 2000). Con este conocimiento previo, una proteína que interacciona con lípidos no debe ser necesariamente hidrofóbica y alojarse en las membranas.

Los primeros resultados obtenidos en los estudios de localización subcelular de SISGAT1 y SISGAT2 en hojas de *N. benthamiana*, indicaron que la proteína SISGAT1 se encontraba asociada a la membrana plasmática y SISGAT2 al citosol (Figura 42). Para comprobar estos resultados se realizaron análisis de FRAP. Los resultados confirmaron dichas localizaciones, que para el caso SISGAT1 se corresponden con las predicciones del programa TopPred. Estos resultados son interesantes pero a la vez difíciles de explicar ya que ambas proteínas fueron descritas con las mismas funciones enzimáticas y con una elevada similitud en su secuencia de aminoácidos. Está claro que la proteína SISGAT1 está asociada a la membrana plasmática aunque su secuencia no lo indique, de tal manera se puede asumir que es en su estructura terciaria o cuaternaria donde se conforma la señal de localización a la membrana. También es posible que la localización en la membrana plasmática se deba a la asociación con otras proteínas. La diferente localización subcelular de estas proteínas también nos indica que las reacciones relacionadas a la esterificación o al rompimiento

catalítico de un fosfolípido de las dos enzimas identificadas, podrían tener lugar tanto en entornos hidrofóbicos como hidrofílicos, siendo posible esto gracias a estructuras tipo “tapas” encontradas en lipasas (Jonas, 2000).

Un resultado interesante se encontró tras realizar la búsqueda de proteínas ortólogas a SISGAT y SISGAT 2 en otros organismos. Esta búsqueda reveló la presencia de ortólogos de las proteínas candidatas en varias especies vegetales como fue el caso de *A. thaliana*, *O. sativa*, *S. melongena* y *S. tuberosum*. En ninguna de estas especies, a excepción de *A. thaliana*, se han caracterizado estas proteínas. Aunque las enzimas ortólogas de *A. thaliana* han sido caracterizadas, es importante mencionar que en ningún otro caso se ha asociado a estas proteínas la actividad SGAT propuesta en el presente trabajo. Los alineamientos de SISGAT1 y SISGAT2 con las proteínas PSAT de estos organismos y la LCAT y PLA2 humanas revelaron la presencia de la denominada triada catalítica en las proteínas candidatas SGAT. La triada catalítica está compuesta por los aminoácidos S<sub>180</sub>, D<sub>386</sub> y H<sub>411</sub> en la proteína SISGAT1 y S<sub>181</sub>, D<sub>388</sub> y H<sub>413</sub> en la proteína SISGAT2. Dichos residuos participan en la reacción de hidrólisis de los fosfolípidos (Jonas, 2000). La presencia de esta triada catalítica fortalece la presunción de que SISGAT1 y SISGAT2 podrían tener actividad SGAT en tomate. El alineamiento de las proteínas reveló a su vez la existencia de otras secuencias muy conservadas entre PSAT y las putativas SGAT que permitió obtener información sobre la actividad fosfolipasa. Hasta el momento no se han descrito con detalle los dominios de las proteínas PSATs involucradas en el reconocimiento de fosfolípidos o esteroides, por lo que es plausible sugerir que las zonas conservadas identificadas en el alineamiento de estas proteínas puedan corresponder a regiones involucradas en dicho proceso.

La proteína SGAT debe catalizar la reacción de esterificación entre un ácido graso con un grupo hidroxilo libre de una molécula de azúcar presente en los SGs. Es por esto que tiene un interés especial el alineamiento múltiple de las proteínas SGATs con las proteínas SGTs. Este alineamiento reveló varias zonas con un alto grado de similitud, aunque existieron menos regiones conservadas entre las SGTs y las SGATs que entre las PSATs y las SGATs. Esto nos indica una clara diferenciación entre las funciones que las SGATs pueden compartir con las

PSATs y SGTs. Actualmente se tiene muy poca información de las proteínas SGTs en la naturaleza, habiendo sido caracterizadas solo en *A. thaliana* y *Avena sativa* (Warnecke et al., 1997). Por tal motivo es difícil inferir alguna posible función de las regiones conservadas encontradas en los alineamientos tales como sitios de reconocimiento del residuo glucídico de los SGs. Es por esto que hace falta realizar más estudios sobre este tema antes de comprender con mayor claridad la relación funcional existente entre las proteínas SGT y las SGATs putativas identificadas en el presente trabajo.

Para obtener una mejor visión de la evolución de candidatas SGAT, se realizó un alineamiento total de las proteínas SGTs, PSATs, PLA2, LCAT y SGATs putativas usadas anteriormente, pero incluyendo también las proteínas ASATs de los mismos organismos para construir un árbol filogenético. La Figura 39 mostró a las proteínas SGATs en el mismo clado que las PSATs, LCAT y PLA2, lo cual sugiere una relación más cercana en la función fosfolipasa que estas proteínas comparten. Este resultado también implica una diferenciación bien marcada a nivel evolutivo de la función de la hidrólisis de un lípido y su esterificación, ya sea un esteroles o un glucósido en relación a la transferencia de un azúcar a un esteroles. De los resultados del análisis filogenético también se desprende una fuerte asociación entre las proteínas ASATs y SGTs, aunque estas poseen funciones y sustratos muy distintos. Por un lado las proteínas ASATs esterifican un esteroles usando como sustrato el ácido graso de una molécula de acil-coA, mientras las SGTs glucosilan un esteroles.

Con más detalle, el árbol filogenético generado muestra una separación clara de las SGAT1 y SGAT2 candidatas presentes en los diferentes organismos. Además, como era de esperar, las proteínas del género *Solanum* fueron agrupadas de manera más próxima en relación al resto de proteínas presentes en los distintos clados. Esta información resulta relevante para el entendimiento y futura ayuda en la búsqueda de una función más detallada y clara de las proteínas SGAT, ya que muestran una mayor relación con las proteínas PSAT que con otras proteínas relacionadas con el metabolismo de los esteroides.

A pesar de los resultados obtenidos y de toda la información aportada más arriba, no ha sido posible determinar si las proteínas SISGAT1 y SISGAT2 identificadas en este trabajo tienen realmente actividad esterilglucósido aciltransferasa. En cualquier caso, estas proteínas deben corresponder a un tipo de enzimas que desempeñan una función metabólica común a todas las plantas y que aún es desconocida. Es necesario por lo tanto realizar estudios adicionales que permitan profundizar en los aspectos indicados anteriormente.



# **CONCLUSIONES**



## 5. Conclusiones

- I. Se ha puesto a punto un nuevo método de qPCR para cuantificar el número de copias de un transgén de forma rápida, simple y fiable. Este método se ha utilizado para analizar el número de eventos de transformación en las plantas transgénicas T0 generadas en el presente trabajo. Ello ha permitido determinar de forma muy dirigida las plantas segregantes de la generación T1 homocigotas para los transgenes de interés.
- II. Las líneas transgénicas de tomate amiH2-PLI silenciadas en la expresión del gen que codifica para la isoforma HMGR2 específicamente durante el desarrollo y maduración del fruto indicaron que la expresión de dicha isoforma no es necesaria para el normal desarrollo y pigmentación del fruto.
- III. Plantas amiH2-E8, silenciadas en la expresión del gen que codifica para la isoforma HMGR2 específicamente durante maduración del fruto mostraron una germinación prematura de las semillas en el interior del fruto en etapas intermedias del proceso de maduración. Ello sugiere que la isoforma HMGR2 podría estar involucrada en la producción de algún compuesto implicado en la señalización de la dormancia de las semillas durante la maduración del fruto.
- IV. El análisis de la expresión de los genes que codifican para las distintas isoformas de la HMGR en tomate en los frutos de las plantas amiH2-PLI y amiH2-E8, silenciadas en la expresión HMGR2, pusieron de manifiesto una inducción muy fuerte del gen que codifica para la isoforma HMGR3 durante la maduración del fruto. Esta activación de la expresión de HMGR3 sugiere que esta isoforma reemplazaría la deficiencia de HMGR2 en las plantas transgénicas.
- V. Las alteraciones en los niveles de expresión de los genes que codifican para la distintas isoformas de la HMGR en las plantas transgénicas de tomate silenciadas en la

expresión de HMGR2 en el fruto sugieren que la síntesis de isoprenoides a través de la vía del MVA en el fruto se encuentra regulada mediante mecanismos que actúan a nivel transcripcional.

- VI. Se ha obtenido una fracción proteica enriquecida en actividad SGAT a partir de muestras de fruto de tomate. Mediante una etapa final de cromatografía de exclusión molecular se han obtenido fracciones que podían contener una forma dimérica de la enzima SGAT.
- VII. El análisis proteómico de las fracciones enriquecidas en actividad SGAT ha permitido identificar dos proteínas candidatas SGAT en tomate denominadas SISGAT1 y SISGAT2. SISGAT1 tiene un peso molecular de 50.5 kDa y esta anotada en la base de datos UNIPROT con el código K4D5B5. SISGAT2 tiene un peso molecular de 60.4 kDa y está anotada en la base de UNIPROT con el código Q71LX7.
- VIII. Análisis bioinformáticos de las proteínas SISGAT1 y SISGAT2 indican que ambas poseen motivos funcionales potencialmente involucrados en la hidrólisis de ácidos grasos (actividad fosfolipasa) y de transferencia de grupos acilos a esteroides (actividad esterol-aciltransferasa), lo que es compatible con que estas enzimas puedan estar implicadas en la síntesis de ASGs.
- IX. Las proteínas SISGAT1 y SISGAT2 están altamente conservadas en todas las plantas con genomas secuenciados, lo que sugiere que participan en un proceso metabólico común a todas las plantas. El análisis filogenético de las proteínas SGAT, PSAT, SGT y ASAT en distintas especies vegetales ha puesto de manifiesto una relación evolutiva cercana entre las SGAT y las PSAT. Esto sugiere que estos dos tipos de proteína han evolucionado a partir de un ancestro en común cercano.
- X. El estudio de la localización subcelular de las proteínas SISGATs fusionadas a la proteína fluorescente eYFP y expresada de forma transitoria en hojas de *N. benthamiana* demostró que la SISGAT1 se encuentra asociada a la membrana

plasmática, mientras que SISGAT2 se localiza en el citosol. Estos resultados sugieren la posibilidad de dos proteínas con una función similar capaces de actuar en entornos celulares distintos.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**





## **6. Materiales y Métodos**

### **6.1. Material biológico utilizado en este trabajo**

#### **6.1.1. Recolección de semillas de tomate**

Método:

1. Recolectar los frutos maduros de tomate.
2. Realizar un corte transversal al fruto de tomate y extraer las semillas localizadas en los lóculos.
3. Extender las semillas sobre papel filtro.
4. Secar las semillas a temperatura ambiente durante 24 - 48 horas.
5. Recoger las semillas en un tubo de tamaño apropiado o en una bolsa de papel.
6. Almacenar las semillas a temperatura ambiente.

#### **6.1.2. Recolección y liofilización de material vegetal de tomate**

Método:

1. Recoger el material vegetal que se desea liofilizar. En caso de trabajar con frutos es importante remover las semillas y las zonas gelatinosas del interior.
2. Congelar en N<sub>2</sub> líquido el material vegetal y tritularlo con la ayuda de un mortero hasta obtener un polvo muy fino. Pesar el material vegetal.

3. Sin dejar que el material se descongele (en N<sub>2</sub>), liofilizar el material a -50 °C a una presión inferior a 0.001 atm durante 24 horas hasta observar que el material está totalmente seco.
4. Volver a pesar el material vegetal liofilizado y calcular el porcentaje de pérdida de agua en el material liofilizado.

$$\% \text{ de pérdida de Agua} = 100 - \frac{P_i \times 100}{P_f}$$

### 6.1.3. Esterilización de semillas de tomate

Materiales:

- Tween 20
- Placas de Petri

Soluciones:

- Hipoclorito de sodio al 40%
- Agua destilada estéril

Método:

1. Colocar las semillas en una placa de Petri y añadir agua hasta cubrirlas completamente, dejar reposar 30 min. bajo campana.
2. Eliminar el agua y añadir la solución de esterilización (hipoclorito de sodio al 40%) y unas 2-4 gotas de Tween 20, durante 30 min.

3. Remover la solución y realizar 3 lavados sucesivos con agua destilada estéril durante 5, 10 y 15 min. respectivamente.
4. Remover el agua y sembrar las semillas.

#### **6.1.4. Protocolo para la transformación de *Solanum lycopersicum* var. Micro-Tom**

Materiales:

- Pinzas estériles
- Placas de Petri de 9 cm de diámetro.
- Jarras estériles de vidrio de 0.5L (Le Practique)(Para enraizamiento de explantes)
- Jarras estériles de vidrio de 0.75L (Le Practique)(Para germinación de semillas)
- Papel de filtro estéril
- Filtros de 0.2  $\mu\text{m}$

Medios y soluciones (ver recetas para el detalle de cada preparación):

- Medio MS0 0.5x
- Medio KCMS líquido
- Medio KCMS sólido
- Medio 2Z I
- Medio 2Z II
- Medio de enraizamiento
- Suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* para transformar:

- La cepa de *Agrobacterium* que se utiliza es EHA105 (ver Materiales y Métodos).
- Seleccionar una colonia de la transformación previamente hecha e inocular en 2.5 mL de medio YEB + Rifampicina [100 µg/mL] (Rif) + Espectinomicina [100 µg/mL] (Spct) (apartado 7 de Materiales y Métodos), e incubar a 28 °C durante 48 horas.
- Transferir 1 mL del cultivo anterior a 50 mL de medio YEB + Rif + Spct e incubar a 28 °C durante 12-18 horas, hasta alcanzar una  $OD_{600} = 0.2$ .
- Transferir 5 ml del cultivo anterior a 50 mL de medio YEB + Rif + Spct e incubar a 28 °C durante 3 - 4 horas hasta alcanzar una  $OD_{600} = 0.5$ .
- Centrifugar el cultivo a 6000 x g durante 10 min y resuspender el pellet en 50 mL de medio KCMS líquido.

Método:

1. Esterilizar las semillas de tomate y colocar en las jarras conteniendo medio MS 0.5x a 25 °C en oscuridad durante 2 días y 8 días más en cámaras con un fotoperiodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad (LD).
2. Cortar los cotiledones de manera transversal, eliminar los bordes y/o puntas y colocarlos en medio KCMS sólido (40 mitades por placa), con el envés en contacto con el medio, a 25 °C en oscuridad durante 24 horas.
3. Colocar los cotiledones (120 mitades) sobre una placa de Petri (9 cm. de diámetro) vacía y añadir la suspensión de *Agrobacterium* (50 mL). Incubar a temperatura ambiente en agitación suave (50-75 rpm) durante 30 min.
4. Eliminar la suspensión de *Agrobacterium* y secar los cotiledones con papel filtro estéril y colocarlos en una nueva placa de Petri conteniendo medio KCMS sólido (40 mitades por placa), con el envés en contacto con el medio. Mantener a 25 °C en oscuridad durante 48 horas.
5. Transferir los cotiledones transformados a placas conteniendo medio 2Z I (40 mitades

por placa) e incubar a 25 °C en LD durante 15 días.

6. Transferir los cotiledones a medio 2Z II (colocar entre 18-25 mitades por placa) e incubar a 25 °C en LD durante 15 días.\*
7. Transferir los cotiledones a medio 2Z II e incubar a 25 °C en LD durante 15 días. Ajustar el número de mitades por placa, colocando entre 8 - 12 en cada una.\*
8. Traspasar los brotes regenerados a medio de enraizamiento hasta que se desarrollen raíces (25 °C en LD). Colocar entre 5 - 6 brotes en cada jarra. La aparición de raíces tarda entre 1 - 4 semanas.
9. Una vez que los brotes hayan regenerado raíces traspasarlos a aclimatación en el invernadero.

\* Nota: Si las placas aparecen contaminadas con *Agrobacterium* en el paso 6 ó 7, colocar los cotiledones en medio 2Z I nuevamente y repetir los pasos.

#### Recetas:

- Medio MS0 al 50%:
  - Sales MS 2.15 g/L
  - Sacarosa 30 g/L
  - Vitaminas B5 de Gamborg
    - Inositol 100 mg/L
    - Acido nicotínico 1 mg/L
    - Piridoxina 1 mg/L
    - Tiamina 10 mg/L
  - Agar Difco 8 g/L
- Medio KCMS líquido:

- Sales y vitaminas MS 4.3 g/L
- Sacarosa 20 g/L
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mg/L
- Tiamina 0.9 mg/L
- 2,4 D 2 mg/L
- Kinetina 1 mg/L
- Acetosiringona 200 μM
- Medio KCMS sólido:
  - Sales y vitaminas MS 4.3 g/L
  - Sacarosa 20 g/L
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mg/L
  - Tiamina 0.9 mg/L
  - 2,4 D 2 mg/L
  - Kinetina 1 mg/L
  - Acetosiringona 200 μM
  - Agar Difco 8 g/L
- Medio ZZ I:
  - Sales y vitaminas MS 4.3 g/L
  - Sacarosa 30 g/L
  - Vitaminas Nitsch
    - Biotina 0.05 mg/L
    - Ácido fólico 0.5 mg/L
    - Glicina 2 mg/L
    - Inositol 100 mg/L
    - Piridoxina 0.5 mg/L

- Tiamina 0.5 mg/L
- Zeatina 2 mg/L
- Timentina 250 mg/L
- Kanamicina 100 mg/L
- Agar Difco 8 g/L
- Medio 2Z II:
  - Sales y vitaminas MS 4.3 g/L
  - Sacarosa 30 g/L
  - Vitaminas Nitsch
  - Zeatina 2 mg/L
  - Timentina 150 mg/L
  - Kanamicina 100 mg/L
  - Agar Difco 8 g/L
- Medio de enraizamiento:
  - Sales MS al 50%
  - Sacarosa 10 g/L
  - Vitaminas Nitsch
  - Timentina 75 mg/L
  - Kanamicina 100 mg/L
  - Acido 1-Naftalenacético (NAA) 0.1 mg/L
  - Agar Difco 8 g/L

Notas:

- Todos los medios se ajustan a pH 5.8 con KOH.
- Para la preparación del medio KCMS, 2Z I y 2Z II mezclar todos los componentes (excepto

el agar Difco) en 500 mL de agua MQ y filtrar (0.22  $\mu\text{m}$ ) para esterilizar, después agregar los 500 mL restantes de agua con agar Difco 16 g/0.5L previamente esterilizados en un autoclave, bajo campana y manteniendo la solución de agua con agar Difco a 40 – 50 °C.

- Cada una de las vitaminas se preparan en stocks separados (ver final) y se esterilizan por filtración con jeringa filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  y se guardan a 4 °C.
- Los stocks, las vitaminas y los antibióticos no se deben esterilizar en autoclave.
- Preparar el stock de biotina disolviendo en agua un poco caliente (40 °C) a una concentración de 0.22 mg/mL.
- Preparar el stock de ácido fólico añadiendo primero un poco de NaOH 0.1 M y completar con agua hasta alcanzar una concentración de 1 mg/mL.
- Preparar el stock de timentina disolviendo en agua a una concentración de 100 mg/mL.
- Preparar el stock de kanamicina disolviendo en agua a una concentración de 50 mg/mL.
- Preparar el stock de zeatina disolviendo en agua a una concentración de 1 mg/mL.
- Preparar el stock de acetosiringona una concentración de 20 mg/mL (100  $\mu\text{M}$  = 19.62 mg/mL); disolver primero en un poco de etanol y luego completar con agua, es necesario aplicar calor colocando la preparación en una estufa a 50 - 60 °C unos minutos.
- La sacarosa, sales MS, vitaminas MS,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , tiamina, 2,4 D, kinetina, inositol, ácido nicotínico, glicina, inositol, piridoxina y NAA se pesan y agregan al momento de la preparación y filtración de los correspondientes medios.

#### 6.1.5. Cepas de bacterias utilizadas en este trabajo

Durante este trabajo se usaron las siguientes cepas bacterianas:

*Escherichia coli*:

- *Escherichia coli* **DH5 $\alpha$**  (F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG



$\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rKmK+),  $\lambda$ -).

- *Escherichia coli* **TOP10** (F-  $\phi$ 80(lacZ) $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 hsdR(rK-mK+)  $\Delta$ recA1398 endA1 tonA)(LifeTechnologies).
- *Escherichia coli* **DB3.1** (F- gyrA462 endA1 glnV44  $\Delta$ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 $\Delta$ leu mtl1)

*Agrobacterium tumefaciens*:

Cepa de <i>Agrobacterium</i>	Fondo genético	Gen de resistencia (cromosoma)	Plásmido Ti	Gen de resistencia (plásmido)	Opina
GV3101::pMP90RK	C58	Rifampicina	pMP90RK (pTiC58 $\Delta$ T-DNA)	Gentamicina y Kanamicina	Nopalina
EHA105	C58	Rifampicina	pEHA105 (pTiBo542 $\Delta$ T-DNA)	-	Succinamopina
GV2260	C58	Rifampicina	pGV2260 (pTiB6S3CT-DNA)	Carbenicilina	Octopina

#### 6.1.6. Medios de cultivo para *E. coli*

Materiales:

- Matraz de Erlenmeyer 2 Lt.

Reactivos:

- NaCl 5 gr/L
- Extracto de levadura 5 gr/L
- Bacto-Triptona 10 gr/L
- Agar-agar 15 gr/L
- Agua MQ

Método:

- Medio líquido LB:
  - Mezclar NaCl 5 gr/L, extracto de levadura 5 gr/L y Bacto-Triptona 10 gr/L en agua destilada hasta 1 Litro.
  - Autoclavar a 121 °C durante 20 min.
- Medio sólido LB:
  - Mezclar NaCl 5 gr/L, extracto de levadura 5 gr/L, Bacto-Triptona 10 gr/L y agar-agar 15 gr/L en agua destilada hasta 1 Litro.
  - Autoclavar a 121 °C durante 20 min.

Antibióticos (añadir a temperatura ambiente en medios líquidos y a 50 °C en medios sólidos):

- Los antibióticos a usar dependen de la cepa bacteriana (*E. coli*) que se utilice.
  - Ampicilina (Na<sup>+</sup>) [Amp]: Concentración final de 100 µg/mL a partir del stock a 100 mg/mL.
  - Kanamicina [Kan]: Concentración final de 50 µg/mL a partir del stock a 50

mg/mL.

- Espectinomcina [Spect]: Concentración final de 200 µg/mL a partir del stock a 100 mg/ml.
- Cloramfenicol [Cm]: Concentración final de 17 µg/mL a partir del stock a 34 mg/ml.

#### 6.1.7. Medios de cultivo para *A. tumefaciens*

Materiales:

- Matraz de Erlenmeyer 2 Lt.

Reactivos:

- Extracte de bovino 5 gr/L
- Extracto de levadura 1 gr/L
- Bacto-Peptona 5 gr/L
- Sacarosa 5 gr/L
- Agar-agar 15 gr/L
- Agua MQ

Método:

- Medio líquido YEB:
  - Mezclar extracto de bovino 5 gr/L, extracto de levadura 1 gr/L, Bacto-Peptona 5

gr/L y sacarosa 5 gr/L en agua destilada hasta 1 Litro.

- Autoclavar a 121 °C durante 20 min.
  
- Medio sólido YEB:
  - Mezclar extracto de bovino 5 gr/L, extracto de levadura 1 gr/L, Bacto-Peptona 5 gr/L, sacarosa 5 gr/L y agar-agar 15 gr/L en agua destilada hasta 1 Litro.
  - Autoclavar a 121 °C durante 20 min.

Antibióticos (añadir a temperatura ambiente en medios líquidos y a 50 °C en medios sólidos):

- Los antibióticos a usar dependen de la cepa bacteriana (*A. tumefaciens*) que se utilice.
  - Cloramfenicol [Cm]: Concentración final de 17 µg/mL a partir del stock a 34 mg/ml.
  - Rifampicina [Rif]: Concentración final de 200 µg/mL a partir del stock a 100 mg/ml.
  - Gentamicina [Gent]: Concentración final de 100 µg/mL a partir del stock a 100 mg/ml.

#### **6.1.8. Preparación de células competentes de *E.coli* por choque térmico**

Soluciones:

- Medio LB
- TFB I
  - Acetato de potasio 30 mM
  - MnCl<sub>2</sub> 50 mM

- RbCl 100 mM
- CaCl<sub>2</sub> 10mM
- 15% Glicerol pH 5.8 (ajustar con ácido acético 2N)
- Esterilizar a 121 °C durant 20 min.
- Tfb II
  - MOPS 10 mM
  - CaCl<sub>2</sub> 75 mM
  - RbCl 10 mM
  - 15% Glicerol pH 5.8 (ajustar con ácido acético 2N)
  - Esterilizar a 121 °C durant 20 min.

Método:

1. Incubar un precultivo de *E. coli* en medio LB a 37 °C durante toda la noche.
2. Inocular 1 mL del cultivo anterior en 100 mL de medio LB.
3. Incubar a 37 °C durante 2-4 horas hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> = 0.4-0.5
4. Incubar 5 min en hielo.
5. Repartir el cultivo en tubos de 30 mL y centrifugar °C a 3400 x g (rotor JA-14) (Thermo-Scientific) durante 15 min.
6. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet con 20 mL de Tfb I.
7. Incubar 10 min en hielo.
8. Centrifugar °C a 3400 x g (rotor JA-14) (Thermo-Scientific) durante 15 min.
9. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet con 1 mL de Tfb II.
10. Separar 100 µL de las células competentes en tubos eppendorf de 1.5 mL y congelar

rápidamente en N<sub>2</sub> líquido.

11. Mantener las células a -80 °C hasta el momento de su uso.

#### **6.1.9. Transformación de células competentes de *E.coli* por choque térmico**

Método:

1. Introducir 5 µL de la mezcla de ligación/recombinación del plásmido recombinante (50 ng de DNA) en 100 µL de células competentes de *E. coli* y mantener en hielo durante 30 min.
2. Realizar el choque térmico de las células competentes llevándolas a 42 °C durante 1.5 min.
3. Transferir las células transformadas a hielo durante 2 min.
4. Añadir 1 mL de medio líquido LB e incubar a 37 °C con agitación durante 1 hora.
5. Sembrar las células competentes en una placa conteniendo medio LB sólido complementado con el/los antibióticos de selección correspondientes al vector insertado en *E. coli*.
6. Incubar a 37 °C durante 16 - 24 horas.
7. Seleccionar las colonias obtenidas mediante PCR con *primers* específicos del vector que se haya utilizado.

### 6.1.10. Preparación de células electrocompetentes de *A.tumefaciens*

Soluciones:

- Medio YEB
- Agua Milli-Q estéril
- 10% Glicerol (v/v)

Método:

1. Incubar un precultivo de *A. tumefaciens* (cepa EHA105 o GV3101), en 5 mL de medio YEB complementado con los antibióticos adecuados para cada cepa, a 28 °C durante 48 horas.
2. Inocular 1 mL del precultivo anterior en 100 mL de medio YEB + antibióticos e incubar a 28 °C durante 9 - 12 horas hasta alcanzar una OD600 = 0.4-0.5
3. Incubar en hielo durante 15 – 30 minutos y centrifugar a 4 °C a 2500 x g (rotor JA-14) (Thermo-Scientific) durante 15 min.
4. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet con 10 mL de agua MQ estéril.
5. Centrifugar a 4 °C a 2500 x g durante 15 min.
6. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet con 1 mL de 10% glicerol.
7. Separar 40 µL de las células competentes en tubos eppendorf de 1.5 mL y congelar rápidamente en N2 líquido.
8. Mantener las células a -80 OC hasta el momento de su uso.

### 6.1.11. Transformación de células competentes de *A. tumefaciens* por electroporación

Método:

1. Introducir 50 ng de la mezcla de ligación/recombinación del plásmido recombinante (50 ng de DNA) en 40  $\mu$ L de células competentes *A. tumefaciens* (por problemas con la salinidad no añadir más de 1  $\mu$ L de la mezcla)
2. Incubar las cubetas para electroporación en hielo durante 5 min e introducir las células competentes en la cubeta para electroporación.
3. Realizar la electroporación a 2 KV y 25  $\mu$ F de capacitancia.
4. Realizar la transformación de las bacterias y comprobar que el tiempo de electroporación sea entre 4 - 5 ms.
5. Resuspender inmediatamente con 1 mL de medio YEB líquido y transferir las células competentes a un tubo de 1.5 mL.
6. Incubar en hielo durante 2 min.
7. Incubar las células transformadas a 28 °C durante 2-4 horas.
8. Sembrar las células en una placa conteniendo medio YEB sólido complementado con los antibióticos de selección correspondientes.
9. Incubar las placas a 28 °C durante 40 horas
10. Seleccionar los clones obtenidos mediante PCR con *primers* específicos del vector que se haya utilizado.



### 6.1.12. Protocolo de agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana*

Soluciones:

- Solución de infiltración:
  - 10 mM MES
  - 10 mM MgCl<sub>2</sub> pH 5,7
  
- Solución de Acetosiringona (preparada al instante de uso):
  - 1 mM Acetosiringona disuelto en etanol al 70%.

Método:

1. Crecer un precultivo de la cepa de *A. tumefaciens* que se desea utilizar durante 32 - 48h a 28 °C.
2. Realizar un segundo cultivo (5 mL) a partir del inóculo anterior y crecer 16 - 20h a 28 °C.
3. Centrifugar 15 min a 5000 x g.
4. Complementar la solución de infiltración añadiendo acetosiringona a una concentración final de 200 µM.
5. Resuspender el *Agrobacterium* a una densidad óptica (D.O.) de 0.2.
6. Incubar a temperatura ambiente sin agitación durante 3 - 5h.
7. Mezclar con la cepa de *Agrobacterium* que contiene el plásmido HcPro preparada a la mismo D.O. en una proporción 1:1
8. Con la ayuda de una jeringa de 1 mL sin aguja, infiltrar la mezcla de *Agrobacterium* presionando suavemente sobre el lado reverso de la hoja.

9. Enseguida marcar con un rotulador permanente el área infiltrada.

## 6.2. Técnicas moleculares para análisis de DNA y RNA

### 6.2.1. Extracción de DNA genómico

Soluciones:

- Tampón de extracción de DNA:
    - Tris HCl 50 mM
    - EDTA 20 mM pH 8.0
  - 10% SDS
  - Acetato sódico 3 M pH 5.2
  - Solución de CTAB:
    - 2% Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)
    - Cloruro sódico 2 M
    - Tris-HCl 0.2 M pH 8.0
    - EDTA 0.05 M pH 8.0
  - Tris-HCl 10 mM pH 8.0
  - Tampón EB:
    - Tris-HCl 10 mM
    - EDTA 0.05 M pH 8.0
- ✓ La solución de SDS se esteriliza por un filtro de 0.22 µm.

- ✓ Se prepara un stock de CTAB al 10% (esterilizado por filtros de 0.2  $\mu\text{m}$ ) para preparar la solución de CTAB.
- ✓ Las demás soluciones se preparan y se esterilizan en un autoclave.

Método:

1. Congelar el tejido de tomate en N<sub>2</sub> líquido y triturar en un mortero
2. Recoger 1 gr de tejido en un tubo de centrifuga de 30 mL
3. Añadir 15 mL de Tampón de extracción de DNA y agitar vigorosamente durante 2 min
4. Añadir 2 mL de 10% SDS y agitar
5. Añadir 1 mg de polivinil polipirrolidona (PVPP) y agitar vigorosamente e incubar a temperatura ambiente durante 15 min.
6. Añadir 4.5 mL de acetato de sodio 3 M y agitar durante 2 min
7. Centrifugar a 4 °C a 10000 x g durante 15 min.
8. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo
9. Añadir un volumen igual de isopropanol e incubar 30 min en hielo
10. Centrifugar a 4 °C a 10000 x g durante 10 min
11. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 500  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y transferir a un nuevo tubo de 2 mL
12. Añadir 500  $\mu\text{L}$  de solución de CTAB e incubar a 65 °C durante 15 min
13. Añadir 1 mL de cloroformo y agitar el tubo invirtiéndolo varias veces
14. Centrifugar a 13000 x g durante 5 min
15. Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo
16. Añadir un volumen igual de isopropanol a 4 °C y centrifugar a 4 °C a 10000 x g durante 10 min

17. Descartar el sobrenadante y dejar secar el sedimento con un flujo de gas N<sub>2</sub> o a temperatura ambiente
18. Resuspender el DNA en 100 µL de tampón EB o agua.
19. Cuantificar en un NanoDrop y confirmar la pureza en un gel de agarosa para DNA.

### 6.2.2. Extracción de RNA de tomate

Adaptado de Burgos y colaboradores (Burgos et al., 1995) por Esther Mayda y Miguel Pérez Amador (*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Valencia*).

Soluciones:

- Solución de extracción:
  - Tris-HCl pH 9.0 100 mM
  - NaCl 200 mM
  - EDTA 15 mM
  - 0.5% sarkosyl en agua DEPC
- Fenol (pre-saturado en Tris-HCl pH 7.9)
- Fenol:cloroformo:isoamil alcohol (25:24:1)
- Acetato de sodio 3 M pH 5.5 en agua DEPC
- Cloruro de litio (LiCl) 8 M
- Etanol 80 %
- Agua DEPC

Método:

1. Congelar el tejido de tomate en N<sub>2</sub> y triturar en un mortero
2. Recoger 1 gr de tejido en un tubo de centrifuga Sarstedt de 13 mL
3. Resuspender en 4 mL de solución de extracción
4. Añadir 100 µL de 2-mercaptoetanol y mezclar
5. Añadir 4 mL de fenol y mezclar
6. Añadir 800 µL de cloroformo y mezclar
7. Añadir 280 µL de acetato de sodio y mezclar
8. Incubar 15 min en hielo
9. Centrifugar a 4 °C a 12000 x g durante 10 min en el rotor JA-25.5 (Therrmo-Scientific) con los adaptadores adecuados.
10. Recoger la fase superior (acuosa) en un nuevo tubo Sarstedt de 13 mL conteniendo 4 mL de fenol:cloroformo:isoamil alcohol (25:24:1) y agitar vigorosamente
11. Incubar en hielo durante 15 min
12. Centrifugar a 4 °C a 12000 x g durante 10 min
13. Transferir la fase superior (acuosa) a un nuevo tubo Sarstedt de 13 mL y añadir un volumen igual de isopropanol.
14. Incubar el RNA a -20 °C durante 30 min o durante toda la noche
15. Centrifugar a 4 °C a 12000 x g durante 10 min y descartar el sobrenadante
16. Resuspender el pellet en 1 mL de etanol al 80%.
17. Centrifugar a 4 °C a 12000 x g durante 10 min y descartar el sobrenadante
18. Secar el pellet bajo una corriente de N<sub>2</sub> o a temperatura ambiente y resuspender en 1 mL de agua DEPC y transferir a un nuevo tubo de 1.5 mL.
19. Centrifugar a 12000 x g durante 5 min para remover cualquier partícula no disuelta y transferir a un nuevo tubo el sobrenadante

20. Añadir 500  $\mu$ L de LiCl y precipitar el RNA a 4 °C durante 3 h o toda la noche.
21. Centrifugar a 4 °C a 12000 x g durante 10 min
22. Descartar el sobrenadante y lavar añadiendo 1 mL de etanol al 80%
23. Centrifugar a 12000 x g durante 5 min y descartar el sobrenadante
24. Secar el pellet bajo una corriente de gas N<sub>2</sub> o a temperatura ambiente
25. Resuspender en un volumen de 100  $\mu$ L de agua DEPC
26. Cuantificar en un NanoDrop y confirmar la pureza en un gel de agarosa para RNA.

### 6.2.3. Separación electroforética de DNA

Materiales:

- Probeta
- Pipeta
- Sistema de electroforesis Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad)
- Fuente de poder Power Pac (Bio-Rad)

Reactivos y soluciones:

- Agarosa
- TAE 50x
  - 242 gr Tris
  - 100 mL EDTA 0.5 M pH 8.0
  - 57.1 mL ácido acético pH 8.2
  - Llevar a 1 Lt de agua MilliQ

- Tampón de carga 3x
  - 0.25% azul de bromofenol
  - 30% glicerol
- Bromuro de etidio 10 mg/mL

Método:

1. Disolver 0.5 gr de agarosa en 50 mL de TAE 1x en un microondas
2. Añadir la agarosa completamente disuelta en el portageles
3. Dejar enfriar unos minutos hasta que deje de emitir vapor
4. Añadir 5  $\mu$ L de bromuro de etidio 10 mg/mL, mezclar bien con la solución de agarosa con la ayuda de la punta de pipeta
5. Colocar el peine deseado para formar los pocillos de carga y dejar reposar durante 20-30 min
6. Retirar el peine del gel y colocar el portageles dentro de la cubeta de electroforesis
7. Añadir tampón TAE 1x a la cubeta hasta cubrir completamente el gel de agarosa
8. Añadir la solución de carga 6x a la muestra de DNA (1  $\mu$ L de solución de carga por cada 6  $\mu$ L de DNA)
9. Cargar las muestras en el gel de agarosa así como un marcador de peso molecular de DNA
10. Separar durante 20-30 min a 100 V
11. Revelar el DNA mediante exposición a luz ultravioleta sobre un transiluminador.

#### 6.2.4. Separación electroforética de RNA

Materiales:

- Probeta
- Pipeta
- Sistema de electroforesis Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad)
- Fuente de poder Power Pac (Bio-Rad)
- Bloque calentador a 65 °C
- Campana de gases

Reactivos y soluciones:

- Agarosa
- MOPS 10x
  - MOPS 200 mM
  - Acetato de Sodio 80 mM
  - EDTA 10 mM pH 7 (equilibrado con NaOH)
  - DEPC 0.1% (v/v)
- Tampón de carga 6x
  - 0.25% azul de bromofenol (w/v)
  - 30% glicerol (v/v)
- Tampón para RNA
  - Formamida 52.5% (v/v)



- Formaldehído 16% (v/v)
- MOPS 10x 11% (v/v)
- Tampón de carga 6x 20% (v/v)
- Bromuro de etidio 10 mg/mL 0.5% (v/v)

Método:

1. Limpiar el portageles y la cubeta de electroforesis con metanol para eliminar cualquier residuo de RNAasas.
2. Mezclar 0.5 gr de agarosa, 5 mL de MOPS 10x y 35 mL de agua MQ y disolver calentado en un microondas.
3. Mezclar hasta alcanzar una mezcla completamente homogénea.
4. Añadir 10 mL de formaldehído y colocar la mezcla en el portageles.
5. Colocar el peine deseado para formar los pocillos de carga y dejar reposar bajo campana durante 20-30 min.
6. Retirar el peine del gel y colocar el portageles dentro de la cubeta de electroforesis.
7. Añadir MOPS 1x a la cubeta hasta cubrir completamente el gel de agarosa.
8. Tomar 180-200 ng de RNA y añadir el doble de volumen del tampón para RNA.
9. Desnaturalizar la muestra en el bloque calentador a 65 °C durante 10 min.
10. Retirar la muestra del bloque y colocar en hielo.
11. Cargar las muestras en el gel de agarosa así como un marcador de peso molecular de DNA.
12. Separar durante 20-30 min a 100 V.
13. Revelar el RNA mediante exposición a luz ultravioleta sobre un transiluminador.

### 6.2.5. Síntesis de cDNA a partir de DNA

Luego de la extracción de RNA (protocolo descrito anteriormente), este es tratado con el kit DNase I, RNase-free de la casa comercial Thermo Scientific. Una vez obtenido el RNA tratado con DNase I se toma 1 µg de RNA y se utiliza con el kit RETROscript (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 6.2.6. Reacción de PCR utilizando *Taq* DNA polimerasa

La *Taq* polimerasa utilizada va ser la 2X PCR Master Mix con 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> de la casa Thermo Scientific. Esta mezcla comercial incluye le enzima *Taq* polimerasa, los deoxinucleótido trifosfatos (dNTPs) y la solución tampón.

Se realiza la reacción con las siguientes condiciones:

PCR Mix		Reacción			
		Pasos		T (°C)	Tiempo
Molde DNA	1-2µg	1	Desnaturalización inicial	94	3 min
<i>Primer forward</i> (10mM)	0,3 µL	2	Desnaturalización	94	30 seg
<i>Primer reverse</i> (10mM)	0,3 µL	3	Anillamiento	45-65	1 min 30s
Master Mix	5 µL	4	Extensión	72	0.5 min/Kb
Volumen total	10 µl	5	Volver al paso 2		25-30 ciclos
		6	Extensión final	72	Paso 4 + 1 min

### 6.2.7. Reacción de PCR utilizando *Pfu* polimerasa

La polimerasa *Pfu* utilizada va ser la *Pfu* DNA polymerase (Promega) con las siguientes condiciones:

PCR <i>Pfu</i>		Reacción			
Molde DNA	1-2µg	Pasos		T (°C)	Tiempo
<i>Primer forward</i> (10mM)	0,3 µL	1	Desnaturalización inicial	94	3 min
<i>Primer reverse</i> (10mM)	0,3 µL	2	Desnaturalización	94	30 seg
Sol. Tampón 10x	1	3	Anillamiento	45-65	1 min 30s
dNTP's	0,4 µL	4	Extensión <i>Pfu</i>	72	1 min/Kb
<i>Pfu</i> (10u/µL)	0,25u	5	Volver al paso 2		25-30 ciclos
Volumen total	10 µl	6	Extensión final	72	Pas0 4 + 1 min

### 6.2.8. Técnica de Real-Time qPCR con SYBR Green

Es importante diseñar *primers* que amplifiquen de manera específica la secuencia que se desea analizar. El tamaño óptimo de los *primers* es de 22 - 24 bp, y del producto de la reacción es de entre 50 - 200bp. La temperatura de melting así como el porcentaje del contenido de G-C es también un parámetro importante que debe tener los valores de:  $T_m = 62 - 64$  °C, G-C% = 30-60.

Se realiza la reacción con las siguientes condiciones:

qPCR Mix		Reacción				
		Pasos		T (°C)	Tiempo	
Molde DNA	1-2µg	Activación		95	1 min	
<i>Primer forward</i> (10mM)	0,3 µL		PCR	1. Desnaturalización	95	10 seg
<i>Primer reverse</i> (10mM)	0,3 µL	2. Extensión		60	30 seg	
SYBR Green Mix	5 µL					45 ciclos
Volumen total	10 µl	Melting			95	2 seg
					65	15 seg
			En rampa hasta		95	

### 6.2.9. Purificación de DNA de geles de agarosa

La banda de DNA es recortada con una hoja de bisturí y es tratada con el kit *Nucleospin Extract II* de Macherley-Nagel.

### 6.2.10. Digestión de DNA con enzimas de restricción

Método:

Identificar mediante análisis bioinformático las enzimas de restricción que se necesitan para digerir el DNA. Las enzimas utilizadas son de la casa comercial Promega.

1. Preparar la reacción:

DNA	1 µg
Buffer 10x	2 µL
E1	3-5 µg DNA
E2	3-5 µg DNA
H <sub>2</sub> O	hasta 20µl

2. Incubar la digestión a 37 °C durante 1-2 horas
3. Analizar los fragmentos generados mediante electroforesis en u gel de agarosa.

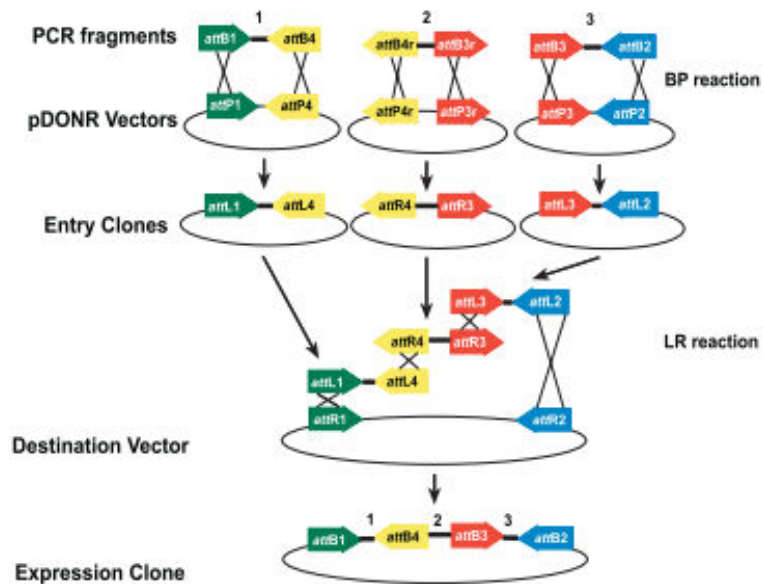
### 6.2.11. Construcción de plásmidos mediante el sistema de recombinación MultiSite Gateway PRO

El sistema MultiSite Gateway PRO (Invitrogen) que se utilizó en esta investigación nos permite recombinar 3 vectores pEntry en un vector de destino binario. Se diseñó *primers* específicos (ver Anexo I) para cada una de las secuencias que se recombinaron dentro de los vectores pDONR mediante una recombinación BP, y así crear los vectores pENTRY. Para

recombinar los vectores pEntry con el vector binario se realizan recombinaciones LR. El vector de destino binario utilizado en los experimentos fue el pKGW,0 (Karimi et al., 2002) adquirido del Department of Plant Systems Biology de la Universidad de Gent, Bélgica.

Para el protocolo de recombinación se siguieron las instrucciones del fabricante, utilizando exactamente las concentraciones y volúmenes recomendados.

El esquema general de las reacciones (Invitrogen, 2006) llevadas a cabo se muestra en la siguiente figura:



Método:

1. Mezclar en un tubo de 0.7 mL estéril los componentes descritos en la siguiente tabla:

Componentes	Cantidad
Clones pENTRY (10 fmoles cada uno)	1 - 7 $\mu$ L
Vector de Destino (20 fmoles)	1 $\mu$ L
1X Buffer TE, pH 8.0	Hasta 8 $\mu$ L

2. Añadir 2  $\mu$ L de la enzima LR Clonase Plus (Invitrogen) a cada muestra y mezclar bien mediante vortex.
3. Incubar la reacción a 25 °C durante 16 - 48 horas.
4. Añadir 1  $\mu$ L de la solución de proteinasa K a cada reacción e incubar a 37 °C durante 10 minutos.
5. Tomar 5  $\mu$ L de la reacción de recombinación y transformar una célula competente de *E. coli*.

### 6.3. Determinación de esteroides

#### 6.3.1. Detección de esteroides en TLC.

##### 6.3.1.1. Revelado de grupos glucosilados mediante el reactivo de Molisch.

Soluciones:

- Reactivo de Molisch
  - 2.5 %  $\alpha$ -naftol (Sigma-Aldrich)
  - 10 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

- 83 % Etanol
- 4.5 % H<sub>2</sub>O

Método:

1. Mezclar  $\alpha$ -naftol, agua y etanol.
2. Lentamente agregar a la mezcla el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
3. Mezclar mediante agitación todos los componentes.
4. Con la ayuda de un atomizador esprayar uniformemente sobre la placa de TLC.
5. Secar brevemente con un secador de pelo.

#### **6.3.1.2. Revelado de lípidos teñidos con Primulina.**

Soluciones:

- 5 % Primulina en agua (50 mg/mL)
- Acetona
- Agua MQ

Método:

1. Diluir la solución de primulina en acetona:agua (8:2 v/v) para obtener una concentración final de 0.05 % de primulina.
2. Con la ayuda de un atomizador esprayar uniformemente sobre la placa de TLC.
3. Secar brevemente con un secador de pelo.
4. Observar bajo luz UV.



### 6.3.2. Preparación de estándares internos para el análisis de esteroides.

Se obtuvo el colestanol como estándar interno del grupo de esteroides libres de la casa comercial Sigma-Aldrich. Los demás estándares internos para los grupos de ES, SG y ASG fueron obtenidos según los métodos descritos por Wewer and Dormann (2014) por el Dr. Marc Revés y el Dr. Rodolfo Lavilla.

### 6.3.3. Extracción, purificación y separación de esteroides de tomate

Materiales:

- Pipetas Pasteur de cristal
- Tubos de cristal 10x13 con tapa rosca
- Septum de PTFE
- Algodón
- Jeringas de cristal (100  $\mu$ L)(Hamilton)
- Placas TLC (Silica Gel 60 F254)
- Tanque cromatográfico
- Centrífuga
- SpeedVac

Soluciones:

- Cloroformo:Metanol:ácido fórmico (2:1:0.1, v/v/v) (Grado GC)
- Diclorometano:Metanol (92:8, v/v) (Grado GC)
- Cloroformo:Metanol (2:1, v/v) (Grado GC)
- Solución de primulina

- KOH 7.5% preparado en MetOH
- 2N HCl metanólico
- NaCl 0.9%
- Metanol (Grado GC)
- Cloroformo (Grado GC)
- Hexano (Grado GC)
- Isoctano
- Trimetilsilil (BSTFA)
- Mezcla de estándares internos
  - Mezcla preparada a partir de FS, ES, SG y ASG en cloroformo/metanol (2:1, v/v).
  - Los estándares internos se preparan a una concentración de 1 mg/mL.

Método:

1. Pesar 30 mg de tejido liofilizado en tubo de 10x13 con tapa rosca con el septum de PTFE.
2. En una campana extractora añadir 40  $\mu$ L de una mezcla de los estándares internos con la pipeta Hamilton (10  $\mu$ L FS, 10  $\mu$ L SE, 10  $\mu$ L SG y 10  $\mu$ L ASG).
3. Añadir 3 mL de Cloroformo:Metanol:ácido fórmico con una pipeta Pasteur previamente calibrada con 1.5 mL de MetOH.
4. Mezclar enérgicamente con la ayuda de un vortex.
5. Sonicar los tubos durante 10 min en un baño ultrasónico a temperatura ambiente.
6. Añadir 1 mL de NaCl 0.9% y mezclar.
7. Centrifugar durante 3 min a 3020 x g a temperatura ambiente (RT).
8. Recolectar la fase inferior orgánica con una pipeta Pasteur a través de otra pipeta Pasteur

(previamente preparada con un algodón a manera de filtro) y transferir a un nuevo tubo de cristal.

9. Repetir los pasos 2 – 5.
  10. Centrifugar durante 3 min a 3020 x g a temperatura ambiente (RT).
  11. Recolectar la fase inferior orgánica con una pipeta Pasteur y añadir al tubo del paso 8.
  12. Con la ayuda de un SpeedVac, evaporar secuencialmente 3 mL de las fases orgánicas recogidas durante 45 – 60 min.
  13. Resuspender todo el material seco en 50  $\mu$ L de Cloroformo:Metanol.
  14. Preparar el tanque cromatográfico con 100 mL de Diclorometano:Metanol (92:8, v/v) y dejar saturar la cámara durante al menos 45 min.
  15. Activar la placa de TLC a 60 °C durante 20 min.
  16. Colocar las muestras resuspendidas (paso 13) en carriles independientes. En distintos carriles colocar 10  $\mu$ L de cada estándar interno.
  17. Colocar la placa preparada dentro del tanque y dejar correr el experimento hasta que la fase móvil se encuentre a 1 cm de la parte superior de la placa.
  18. Esprayar la placa con la solución de primulina y secar con un secador de pelo.
  19. Visualizar los esteroides en la placa bajo la luz UV de una lámpara de mano.
  20. Marcar con un lápiz los diferentes esteroides.
  21. Raspar con una hoja de bisturí las zonas marcadas correspondientes a cada uno de los grupos de esteroides separados en la placa de TLC, y colocar en un nuevo tubo de cristal.
- 22. Extracción de FS:**
- a. Añadir 3 mL de hexano y mezclar con el vortex durante 2-3 min.
  - b. Centrifugar 5 min a 3020 x g.
  - c. Colectar la fase hexanica y transferir a un nuevo tubo.
  - d. Repetir los pasos a – c.
  - e. Evaporar las muestras en el SpeedVac.

- f. Mantener el material seco a -20 °C hasta la silinización.

**23. Extracción de ES, SG y ASG:**

- a. **Añadir 2 mL de diclorometano:metanol (2:1, v/v) y mezclar con vortex durante 2-3 minutos.**
- b. Centrifugar durante 5 min a 3020 x g
- c. Colectar la fase orgánica y transferir a un nuevo tubo.
- d. Repetir los pasos a – c.
- e. Evaporar las muestras en el SpeedVac.

**24. Saponificación de ES:**

- a. Al material seco añadir 1.5 ml de 7.5 % KOH preparado en MetOH y mezclar durante 30 segundos.
- b. Sonicar durante 1 minuto hasta una completa resuspensión.
- c. Incubar durante 1 hora a 80 °C.
- d. Añadir 1.5 ml de agua MQ para detener la saponificación.
- e. Añadir 3 mL de hexano y mezclar enérgicamente.
- f. Centrifugar durante 5 min a 3020 x g y colectar la fase hexánica.
- g. Repetir e – f.
- h. Evaporar el solvente en el SpeedVac y conservar a -20 °C hasta la silinización.

**25. Hidrólisis ácida de SG y ASG:**

- a. Al material seco añadir 1.5 ml de 2N HCl metanólico y mezclar durante 30 segundos.
- b. Sonicar durante 1 minuto hasta una completa resuspensión.
- c. Incubar durante 1 hora a 80 °C.
- d. Añadir 1 ml de NaCl 0.9 %.
- e. Añadir 3 mL de hexano y mezclar enérgicamente.

- f. Centrifugar durante 5 min a 3020 x g y coleccionar la fase hexánica.
- g. Repetir e – f.
- h. Evaporar el solvente en el SpeedVac y conservar a -20 °C hasta la silinización.

#### **6.3.4. Silinización de muestras de esteroides extraídas**

Soluciones:

- Isoctano
- Trimetilsilil (BSTFA)

Método:

1. Resuspender el material seco del apartado 5.3.3 en 50 µL de BSTFA.
2. Incubar durante 1 hora a 70 °C.
3. Evaporar el solvente en SpeedVac.
4. Resuspender en 50-75 µL de isoctano.

Nota: Las muestras silinizadas pueden ser conservadas a -20 °C durante un máximo 7 días hasta ser analizadas en el GC-MS

## 6.4. Técnicas de análisis de proteínas

### 6.4.1. Extracción y deslipidización de proteínas de tomate

Protocolo descrito por (Potocka and Zimowski, 2008) .

Materiales:

- 100 gr de hoja de tomate joven (2-3 meses)/pericarpo fresco de tomates en estadio naranja o breaker.
- Miracloth

Reactivos y soluciones:

- Acetona
- Buffer A:
  - 0.1 M Tris-HCl pH 7.3
  - 10 mM 2-mercaptoetanol
- Buffer B:
  - Tris-HCl 0.1 M pH 7.3
  - 2-mercaptoetanol 10 mM
  - 0.1% Triton X-100 (v/v)
- Buffer C:
  - Buffer fosfato 0.1 M pH 6.5

- 0.05% Triton X-100 (v/v)
- 2-mercaptoetanol 10mM

Método:

1. Homogeneizar la muestra de tomate en 200 mL de buffer A previamente enfriado a 4°C en la licuadora en una cámara fría. Para una mejor homogeneización del material utilizar un ultraturrax.
2. Filtrar el material homogeneizado a través de miracloth.
3. Centrifugar el material filtrado a 4 °C a 20000 x g durante 20 minutos (centrífuga previamente enfriada).
4. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en buffer A (el volumen de resuspensión dependerá de pellet, siendo entre 50 - 100mL). Utilizar el ultraturrax para una completa resuspensión del pellet.
5. Añadir el pellet resuspendido “gota a gota” en 10 veces el volumen acetona fría (-20 °C), y centrifugar a 4 °C a 3000 x g durante 5 minutos.
6. Descartar la acetona y resuspender el pellet obtenido en buffer B (el volumen de resuspensión dependerá de pellet, siendo entre 50 - 100mL) y centrifugar a 4 °C a 20000 x g durante 20 minutos.
7. Tomar el sobrenadante y pasarlo “gota a gota” en 10 veces el volumen de acetona fría (4 °C).
8. Centrifugar a 4 °C a 3000 x g durante 5 minutos. Se obtiene el polvo acetónico.
9. Resuspender el polvo acetónico en buffer C para continuar con el ensayo de actividad enzimática.

#### 6.4.2. Ensayo de actividad de la proteína SGAT

Materiales:

- Pipetas
- Probetas
- Cubeta para cromatografía en capa fina
- Placas para cromatografía en capa fina de sílica gel (Merk, TLC Silica Gel 60 F254)(fase estacionaria)
- Bloque calentador a 35 °C / 70 °C.
- Secador de pelos
- Lámpara de luz UV, Blak-Ray B-100 Series (UVP)

Reactivos y soluciones:

- Polvo acetónico (apartado anterior Materiales y Métodos)
- $\beta$ -Sitosterol  $\beta$ -D-glucósido, 1 nmol/ $\mu$ L (Sigma-Aldrich)
- Esteril-glucósido esterificado, 1 nmol/ $\mu$ L (Matreya)
- Fosfatidiletanolamina, 1 nmol/ $\mu$ L (Matreya)
- Cloroformo/metanol/amoníaco 40:10:2 (v/v) (fase móvil)
- Cloroformo
- Butanol
- Agua saturada con butanol
- Buffer C (apartado anterior Materiales y Métodos)



- Solución de primulina (Lefebvre et al., 2007)
  - % primulina (w/v) (Sigma-Aldrich)
  - 80% acetona

Método:

1. Preparar una solución de polvo acetónico 0.2 mg/mL disolviéndolo en buffer C.
2. Añadir 10  $\mu$ L de  $\beta$ -Sitosterol  $\beta$ -D-glucósido y 10  $\mu$ L de fosfatidiletanolamina e incubar la reacción a 35 °C durante 30 min.
3. Añadir 1 mL de butanol seguido de 0.5 mL de agua saturada con butanol para la extracción de los lípidos.
4. Mezclar vigorosamente y centrifugar a 15000 x g durante 1 minuto.
5. Extraer la fase superior (butanol) sin tomar la interfase y colocar en un nuevo tubo.
6. Evaporar el butanol a 70 °C bajo un flujo de N<sub>2</sub>.
7. Añadir 15  $\mu$ L de cloroformo y agitar por vortex para resuspender los lípidos.
8. Colocar la fase móvil dentro de la cubeta para cromatografía y dejar reposar durante 1 - 1.5 horas para lograr la saturación de la cubeta.
9. Marcar con lápiz sobre la placa para cromatografía (fase estacionaria) carriles verticales con 1 cm de separación entre ellos. Marcar una línea horizontal a 1 cm sobre la base de la placa y a 0.5 cm del límite superior de la placa.
10. Activar la placa para cromatografía (fase estacionaria) a 70 °C durante mínimo 20 min.
11. Colocar cada muestra, resuspendida en cloroformo, en la placa para cromatografía dentro de los respectivos carriles, y dejar evaporar completamente el solvente.
12. Colocar adicionalmente en la fase estacionaria una mezcla de 10 nmoles de cada patrón ( $\beta$ -Sitosterol  $\beta$ -D-glucósido, esteril-glucósido esterificado y fosfatidiletanolamina).
13. Colocar dentro de la cubeta cromatográfica (previamente saturada) la placa para

cromatografía y dejar separar hasta que la fase móvil alcance la línea superior.

14. Retirar la placa de la cubeta y secar con la ayuda de un secador de pelos.
15. Aplicar la solución de primulina de manera uniforme sobre la placa de sílica gel utilizando un atomizador.
16. Secar el exceso de la solución de primulina con el secador de pelos.
17. Revelar la placa de cromatografía con una lámpara de luz UV.

#### **6.4.3. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

Materiales:

- Pipetas
- Placa de 96 pocillos para ELISA
- Espectrofotómetro para placas

Reactivos:

- Solución de Bradford (Bio-Rad)

Método:

1. Preparar los patrones de albúmina con concentraciones comprendidas entre 0 y 1.5 mg/mL con la misma solución tampón que las muestras que se evalúan.
2. Cargar 2  $\mu$ L de las soluciones y muestras en los pocillos de una placa de 96, por duplicado.
3. Añadir 200  $\mu$ L de la solución de Bradford (Bio-Rad).

4. Incubar 10 min.
5. Leer la placa a una longitud de onda de 595 nm en un espectofotómetro.
6. Realizar el cálculo de la recta patrón generada por los valores obtenidos con los patrones medidos de albúmina, eliminando los puntos que muestren un patrón fuera de la linealidad de la recta.
7. Extrapolar los valores de las muestras en la recta patrón.

Para los casos en que la proteína contenga algún componente interferente con el reactivo de Bradford (ej. SDS, triton X-100, poliaminas, etc.) se debe utilizar el kit RC DC Protein Assay de Bio-Rad.

#### **6.4.4. Acondicionamiento de proteínas para SDS-PAGE**

Soluciones:

- Buffer Laemmli 2x:
  - Tris-HCl pH 6.8 120 mM
  - 20% glicerol (v/v)
  - 6% SDS (v/v)
  - 0.02% azul de bromofenol (w/v)
  - 4% 2-mercaptoetanol (v/v)

Método:

1. Tratar las muestras de proteínas con un volumen igual del buffer Laemmli 2X.

2. Hervir 5 - 10 min a 100 °C.
3. Atemperar en hielo durante 1 min.
4. Cargar 10 - 15  $\mu$ L en gels de 0.75 mm de grosor y 20 - 30  $\mu$ L en gels de 1.5 mm de grosor.

#### **6.4.5. Preparación de geles de poliacrilamida**

Materiales:

- Sistema Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad)

Reactivos y soluciones:

- 30% Acrilamida (BioRad)
- Buffer Separador
  - 1.5 M Tris-HCl pH 8,8
- Buffer Concentrador
  - 0.5 M Tris-HCl pH 6,8
- 10% SDS
- 10% APS (preparar al momento)
- TEMED
- Isopropanol
- Running Buffer 10x:
  - Glicina 1.92 M
  - SDS 1%

- Tris 0.25 M

Método:

1. Preparar las solución del gel separador a la concentración de acrilamida deseada según la tabla a continuación, sin añadir TEMED (la tabla de recetas indica el volumen necesario para 2 geles de 0.75 mm o un gel de 1.5 mm de grosor).

Gel:	Separador					Concentrador
	10%	12%	12,5%	15%	18%	
30% acrilamida	3.33 mL	4 mL	4.17 mL	5 mL	6 mL	390 µL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8						750 µL
H <sub>2</sub> O Milli-Q	4.13 mL	3.47 mL	3.30 mL	2.47 mL	1.47 mL	1,83 µL
SDS	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	15 µL
10% APS	33.33 µL	33.33 µL	33.33 µL	33.33 µL	33.33 µL	15 µL
Total	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	3 mL
TEMED (Añadir al momento de la polimerización)	6.67 µL	6.67 µL	6.67 µL	6.67 µL	6.67 µL	3 µL

2. Montar los dos vidrios en el formador de geles del equipo Mini-PROTEAN 3 Cell.
3. Añadir el TEMED necesario para el gel separador e inmediatamente rellenar el espacio entre los vidrios hasta 2 cm de la parte superior.
4. Cubrir con 0.5 mL de isopropanol para nivelar el gel separador.
5. Dejar reposar durante 30 - 45 minutos hasta la polimerización.
6. Preparar la solución del gel concentrador, sin añadir el TEMED.

7. Lavar la parte superior del gel con agua destilada y secar la parte superior con papel de filtro, retirando el exceso de agua de entre los vidrios.
8. Mezclar la cantidad de TEMED adecuada al gel concentrador e introducir el gel concentrador entre los vidrios hasta llenarlos por completo.
9. Introducir el peine entre la parte superior de los vidrios, dejando derramar el exceso de solución.
10. Esperar hasta la completa polimerización del gel (20 – 30 min)

#### **6.4.6. Separación electroforética de las proteínas (SDS-PAGE)**

Materiales:

- Pipeta
- Sistema Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad)
- Fuente de poder Power Pac (Bio-Rad)

Método:

1. Colocar los geles en el sistema Mini-PROTEAN 3 de BioRad.
2. Completar el equipo con Running Buffer 1x.
3. Cargar las muestras y el marcador de peso molecular.
4. Separar las proteínas a 10 mA por cada gel de 0.75 mm de grosor, o 20 mA por cada gel de 1.5 mm grosor, de manera que las muestras entren en el gel concentrador.
5. Cuando las proteínas hayan entrado en el gel separador aumentar el amperaje hasta 20 mA por cada gel de 0.75 mm de grosor, o 40 mA por cada gel de 1.5 mm grosor.

6. Detener el sistema cuando el azul de bromofenol haya llegado a la parte inferior del gel.

#### **6.4.7. Tinción de geles de proteínas**

##### **6.4.7.1. Tinción con azul de Coomassie para geles de proteínas**

Soluciones:

- Solución de fijación:
  - 25% isopropanol
  - 10% ácido acético en agua MQ
- Solución de tinción:
  - PhastGel blue R al 0.1% (GE Healthcare).
- Solución de desteñido:
  - 5% metanol
  - 7% ácido acético en agua MQ.

Método:

1. (Opcional) Fijar la proteína con la solución de fijación durante 2 horas.
2. Cubrir el gel con la solución de tinción durante 30 min o toda la noche.
3. Remover la solución de tinción.
4. Cubrir con la solución de desteñido y realizar cambios de solución cada 30 – 60 min hasta observar las bandas de proteínas en un fondo claro.

#### 6.4.7.2. Tinción de plata para geles de proteínas

Por cada gel de acrilamida que se desea teñir preparar 100 mL frescos de cada solución descrita a continuación. Se prefiere el uso de material de cristal previamente lavado con metanol y agua MQ. El correcto seguimiento de los tiempos de cada uno de los pasos es importante para un buen revelado de los geles.

##### **Fijación:**

40% v/v Metanol

10% v/v Ácido acético glacial

50% H<sub>2</sub>O MQ

- Sumergir el gel en la solución de fijación durante 30 minutos a temperatura ambiente con una agitación constante.

##### **Sensibilización:**

30% v/v Etanol

0.02% w/v Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

68 g/L Acetato de Sodio

- Remover la solución de fijación y reemplazar con la de sensibilización durante 30 minutos a temperatura ambiente con una agitación constante, seguida de 3 lavados de 5 minutos c/u con H<sub>2</sub>O MQ.

##### **Tinción:**

2.5 g/L AgNO<sub>3</sub>



- Colocar el gel en la solución de tinción durante 20 minutos a temperatura ambiente con una agitación constante, seguida de 2 lavados de 1 minuto c/u con H<sub>2</sub>O MQ.

**Revelado:**

25 g/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

400 μL/L HCOH 37% (formaldehído)

- Revelar el gel durante 2-5 minutos, observando la aparición de las bandas deseadas en el gel, pero teniendo cuidado del exceso de oscurecimiento del gel. Las bandas de mayor concentración aparecerán aproximadamente a los 30 segundos de haber colocado la solución de revelado.

**Bloqueo:**

14.6 g/L EDTA-Na<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O

- Colocar la solución de bloqueo inmediatamente después de remover la solución de revelado y dejar en agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados de 5 minutos c/u con H<sub>2</sub>O MQ.



# **BIBLIOGRAFÍA**



## 7. Bibliografía

- Alba R, Payton P, Fei Z, McQuinn R, Debbie P, Martin GB, Tanksley SD, Giovannoni JJ** (2005) Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *Plant Cell* **17**: 2954-2965
- Amemiya T, Kanayama Y, Yamaki S, Yamada K, Shiratake K** (2006) Fruit-specific V-ATPase suppression in antisense-transgenic tomato reduces fruit growth and seed formation. *Planta* **223**: 1272-1280
- Armougom F, Moretti S, Poirot O, Audic S, Dumas P, Schaeli B, Keduas V, Notredame C** (2006) Espresso: automatic incorporation of structural information in multiple sequence alignments using 3D-Coffee. *Nucleic Acids Res* **34**: W604-608
- Bach TJ** (1986) Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase, a key enzyme in phytosterol synthesis? *Lipids* **21**: 82-88
- Bach TJ, Benveniste P** (1997) Cloning of cDNAs or genes encoding enzymes of sterol biosynthesis from plants and other eukaryotes: heterologous expression and complementation analysis of mutations for functional characterization. *Prog Lipid Res* **36**: 197-226
- Baisted DJ** (1978) Steryl glucoside and acyl glucoside biosynthesis in maturing pea seeds. *Phytochemistry* **17**: 435-438
- Banas A, Carlsson AS, Huang B, Lenman M, Banas W, Lee M, Noiriel A, Benveniste P, Schaller H, Bouvier-Nave P, Stymne S** (2005) Cellular sterol ester synthesis in plants is performed by an enzyme (phospholipid:sterol acyltransferase) different from the yeast and mammalian acyl-CoA:sterol acyltransferases. *J Biol Chem* **280**: 34626-34634

- Barsan C, Sanchez-Bel P, Rombaldi C, Egea I, Rossignol M, Kuntz M, Zouine M, Latche A, Bouzayan M, Pech JC** (2010) Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis. *J Exp Bot* **61**: 2413-2431
- Bohlmann J, Keeling CI** (2008) Terpenoid biomaterials. *Plant J* **54**: 656-669
- Bombarely A, Menda N, Teclé IY, Buels RM, Strickler S, Fischer-York T, Pujar A, Leto J, Gosselin J, Mueller LA** (2011) The Sol Genomics Network (solgenomics.net): growing tomatoes using Perl. *Nucleic Acids Res* **39**: D1149-1155
- Boutté Y, Grebe M** (2009) Cellular processes relying on sterol function in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 705-713
- Bouvier-Nave P, Berna A, Noiriél A, Compagnon V, Carlsson AS, Banas A, Stymne S, Schaller H** (2010) Involvement of the phospholipid sterol acyltransferase1 in plant sterol homeostasis and leaf senescence. *Plant Physiol* **152**: 107-119
- Bugos RC, Chiang VL, Zhang XH, Campbell ER, Podila GK, Campbell WH** (1995) RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine. *Biotechniques* **19**: 734-737
- Campos N, Boronat A** (1995) Targeting and topology in the membrane of plant 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *The Plant Cell Online* **7**: 2163-2174
- Cantu D, Blanco-Ulate B, Yang L, Labavitch JM, Bennett AB, Powell AL** (2009) Ripening-regulated susceptibility of tomato fruit to *Botrytis cinerea* requires NOR but not RIN or ethylene. *Plant Physiol* **150**: 1434-1449
- Carrari F, Baxter C, Usadel B, Urbanczyk-Wochniak E, Zanon MI, Nunes-Nesi A, Nikiforova V, Centro D, Ratzka A, Pauly M, Sweetlove LJ, Fernie AR** (2006) Integrated analysis of metabolite and transcript levels reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit development and highlight regulatory aspects of metabolic network behavior. *Plant Physiol* **142**: 1380-1396

- Carrari F, Fernie AR** (2006) Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *J Exp Bot* **57**: 1883-1897
- Carvalho RF, Campos ML, Pino LE, Crestana SL, Zsogon A, Lima JE, Benedito VA, Peres LE** (2011) Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods* **7**: 18
- Chaturvedi P, Mishra M, Akhtar N, Gupta P, Mishra P, Tuli R** (2012) Sterol glycosyltransferases-identification of members of gene family and their role in stress in *Withania somnifera*. *Mol Biol Rep* **39**: 9755-9764
- Chen GQ, Lin JT** (2010) Use of quantitative polymerase chain reaction for determining copy numbers of transgenes in *Lesquerella fendleri*. *American Journal of Agricultural and Biological Science* **5**: 415-421
- Chen Q, Steinhauer L, Hammerlindl J, Keller W, Zou J** (2007) Biosynthesis of phytosterol esters: identification of a sterol o-acyltransferase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **145**: 974-984
- Choi D, Bostock RM, Avdiushko S, Hildebrand DF** (1994) Lipid-derived signals that discriminate wound- and pathogen-responsive isoprenoid pathways in plants: methyl jasmonate and the fungal elicitor arachidonic acid induce different 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase genes and antimicrobial isoprenoids in *Solanum tuberosum* L. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 2329-2333
- Choi D, Ward BL, Bostock RM** (1992) Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. *Plant Cell* **4**: 1333-1344
- Chow ETS, Jen JJ** (1978) PHYTOSTEROL BIOSYNTHESIS IN RIPENING TOMATOES. *Journal of Food Science* **43**: 1424-1426

- Dan Y, Yan H, Munyikwa T, Dong J, Zhang Y, Armstrong CL** (2006) MicroTom--a high-throughput model transformation system for functional genomics. *Plant Cell Rep* **25**: 432-441
- Daraselia ND, Tarchevskaya S, Narita JO** (1996) The promoter for tomato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene 2 has unusual regulatory elements that direct high-level expression. *Plant Physiology* **112**: 727-733
- DeBolt S, Scheible WR, Schrick K, Auer M, Beisson F, Bischoff V, Bouvier-Nave P, Carroll A, Hematy K, Li Y, Milne J, Nair M, Schaller H, Zemla M, Somerville C** (2009) Mutations in UDP-Glucose:sterol glucosyltransferase in Arabidopsis cause transparent testa phenotype and suberization defect in seeds. *Plant Physiol* **151**: 78-87
- DeBolt S, Scheible WR, Schrick K, Auer M, Beisson F, Bischoff V, Bouvier-Nave P, Carroll A, Hematy K, Li Y, Milne J, Nair M, Schaller H, Zemla M, Somerville C** (2009) Mutations in UDP-Glucose:sterol glucosyltransferase in Arabidopsis cause transparent testa phenotype and suberization defect in seeds. *Plant Physiology* **151**: 78
- Deikman J, Kline R, Fischer RL** (1992) Organization of Ripening and Ethylene Regulatory Regions in a Fruit-Specific Promoter from Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Physiol* **100**: 2013-2017
- Denbow CJ, Lang S, Cramer CL** (1996) The N-terminal domain of tomato 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductases. Sequence, microsomal targeting, and glycosylation. *J Biol Chem* **271**: 9710-9715
- Di Tommaso P, Moretti S, Xenarios I, Orbitg M, Montanyola A, Chang JM, Taly JF, Notredame C** (2011) T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res* **39**: W13-17
- Duke SO** (1990) Natural pesticides from plants. *Advances in new crops*: 511-517



- Duperon R, Thiersault M, Duperon P** (1984) High level of glycosylated sterols in species of solanum and sterol changes during the development of the tomato. *Phytochemistry* **23**: 743-746
- Durr IF, Shwayri AN** (1964) Metabolism of Mevalonic Acid by *Lactobacillus Plantarum*. *J Bacteriol* **88**: 361-366
- Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS** (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J* **45**: 616-629
- Eichenberger W, Siegrist HP** (1975) Steryl glycoside acyltransferase from carrots. *FEBS Lett* **52**: 153-156
- Elbein AD, Forsee WT, Schultz JC, Laine RA** (1975) Biosynthesis and structure of glycosyl diglycerides, steryl glucosides, and acylated steryl glucosides. *Lipids* **10**: 427-436
- Enfissi EM, Fraser PD, Lois LM, Boronat A, Schuch W, Bramley PM** (2005) Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnol J* **3**: 17-27
- Estornell LH, Orzaez D, Lopez-Pena L, Pineda B, Anton MT, Moreno V, Granell A** (2009) A multisite gateway-based toolkit for targeted gene expression and hairpin RNA silencing in tomato fruits. *Plant biotechnology journal* **7**: 298
- Faurobert M, Mihr C, Bertin N, Pawlowski T, Negroni L, Sommerer N, Causse M** (2007) Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening. *Plant Physiol* **143**: 1327-1346
- Fernandez AI, Viron N, Alhag Dow 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**: 1729-1740

- Forsee WT, Laine RA, Elbein AD** (1974) Solubilization of a particulate UDP-glucose: Sterol  $\beta$ -glucosyl-transferase in developing cotton fibers and seeds and characterization of steryl 6-acyl-d-glucosides. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **161**: 248-259
- Forsee WT, Valkovich G, Elbein AD** (1976) Acylation of steryl glucosides by phospholipids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **172**: 410 <last\_page> 418
- Frasch W, Grunwald C** (1976) Acylated Steryl Glycoside Synthesis in Seedlings of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiol* **58**: 744-748
- Fraser PD, Enfissi EM, Halket JM, Truesdale MR, Yu D, Gerrish C, Bramley PM** (2007) Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism. *Plant Cell* **19**: 3194-3211
- Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S** (2002) An early C-22 oxidation branch in the brassinosteroid biosynthetic pathway. *Plant Physiology* **130**: 930
- Gillaspy G, Ben-David H, Grisse W** (1993) Fruits: A Developmental Perspective. *The Plant Cell* **5**: 1439
- Giovannoni JJ** (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* **16** **Suppl**: S170-180
- Giovannoni JJ** (2007) Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 283-289
- Godoy-Hernández GC, Chappell J, Devarenne TP, García-Pineda E, Guevara-García AA, Lozoya-Gloria E** (1998) Antisense expression of hmg1 from *Arabidopsis thaliana* encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, reduces isoprenoid production in transgenic tobacco plants. *Journal of Plant Physiology* **153**: 415-424

- Goodwin TW** (1958) Studies in carotenogenesis. 25. The incorporation of  $^{14}\text{CO}_2$ , [2- $^{14}\text{C}$ ] acetate and [2- $^{14}\text{C}$ ]mevalonate into beta-carotene by illuminated etiolated maize seedlings. *Biochem J* **70**: 612-617
- Griebel T, Zeier J** (2010) A role for beta-sitosterol to stigmasterol conversion in plant-pathogen interactions. *The Plant Journal : for cell and molecular biology* **63**: 254
- Grille S, Zaslowski A, Thiele S, Plat J, Warnecke D** (2010) The functions of steryl glycosides come to those who wait: Recent advances in plants, fungi, bacteria and animals. *Prog Lipid Res* **49**: 262-288
- Grille S, Zaslowski A, Thiele S, Plat J, Warnecke D** (2010) The functions of steryl glycosides come to those who wait: Recent advances in plants, fungi, bacteria and animals. *Progress in Lipid Research* **49**: 262-288
- Hartmann M-A** (1998) Plant sterols and the membrane environment. *Trends in Plant Science* **3**: 170-175
- He ZM, Jiang XL, Qi Y, Luo DQ** (2008) Assessment of the utility of the tomato fruit-specific E8 promoter for driving vaccine antigen expression. *Genetica* **133**: 207-214
- Heinz E, Dieler HP, Rullkötter J** (1975) Enzymatic acylation of steryl glycoside. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **75**: 78-87
- Held MA, Boulaflous A, Brandizzi F** (2008) Advances in fluorescent protein-based imaging for the analysis of plant endomembranes. *Plant Physiol* **147**: 1469-1481
- Hemmerlin A** (2013) Post-translational events and modifications regulating plant enzymes involved in isoprenoid precursor biosynthesis. *Plant Sci* **203-204**: 41-54
- Hemmerlin A, Harwood JL, Bach TJ** (2012) A raison d'etre for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? *Prog Lipid Res* **51**: 95-148

- Ingham DJ, Beer S, Money S, Hansen G** (2001) Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. *Biotechniques* **31**: 132-134, 136-140
- Invitrogen** (2006) MultiSite Gateway Pro - User Manual, Vol Version B
- Jenkins SM** (1996) Tomato HMG-CoA Reductase: Characterization of a Multigene Family. University of California, Berkeley
- Ji W, Hatzios KK, Cramer CL** (1992) Expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in maize tissues. *Physiologia Plantarum* **84**: 185-192
- Jonas A** (2000) Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1529**: 245-256
- Kall L, Canterbury JD, Weston J, Noble WS, MacCoss MJ** (2007) Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat Methods* **4**: 923-925
- Karimi M, Inze D, Depicker A** (2002) GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* **7**: 193-195
- Klee HJ, Giovannoni JJ** (2011) Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annu Rev Genet* **45**: 41-59
- Kondo K, Uritani I, Oba K** (2003) Induction mechanism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in potato tuber and sweet potato root tissues. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**: 1007-1017
- Kopischke M, Westphal L, Schneeberger K, Clark R, Ossowski S, Wewer V, Fuchs R, Landtag J, Hause G, Dormann P, Lipka V, Weigel D, Schulze-Lefert P, Scheel D, Rosahl S** (2013) Impaired sterol ester synthesis alters the response of *Arabidopsis thaliana* to *Phytophthora infestans*. *Plant J* **73**: 456-468

- Learned RM, Fink GR** (1989) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from *Arabidopsis thaliana* is structurally distinct from the yeast and animal enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 2779-2783
- Lefebvre B, Furt F, Hartmann MA, Michaelson LV, Carde JP, Sargueil-Boiron F, Rossignol M, Napier JA, Cullimore J, Bessoule JJ, Mongrand S** (2007) Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiol* **144**: 402-418
- Leivar P, Gonzalez VM, Castel S, Trelease RN, Lopez-Iglesias C, Arro M, Boronat A, Campos N, Ferrer A, Fernandez-Busquets X** (2005) Subcellular localization of *Arabidopsis* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Plant Physiol* **137**: 57-69
- Lemaire-Chamley M, Petit J, Garcia V, Just D, Baldet P, Germain V, Fagard M, Mouassite M, Cheniclet C, Rothan C** (2005) Changes in transcriptional profiles are associated with early fruit tissue specialization in tomato. *Plant Physiol* **139**: 750-769
- Lepage M** (1964) Isolation and characterization of an esterified form of steryl glucoside. *Journal of Lipid Research* **5**: 587-592
- Lichtenthaler HK, Schwender J, Disch A, Rohmer M** (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Letters* **400**: 271-274
- Lippincott-Schwartz J, Altan-Bonnet N, Patterson GH** (2003) Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nat Cell Biol Suppl*: S7-14
- Llave C, Kasschau KD, Carrington JC** (2000) Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 13401-13406

- Luu DT, Martiniere A, Sorieul M, Runions J, Maurel C** (2012) Fluorescence recovery after photobleaching reveals high cycling dynamics of plasma membrane aquaporins in Arabidopsis roots under salt stress. *Plant J* **69**: 894-905
- Maldonado-Mendoza I, Burnett R, Lòpez-Meyer M, Nessler C** (1994) Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase by wounding and methyl jasmonate. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **38**: 351-356
- Marti E, Gisbert C, Bishop GJ, Dixon MS, Garcia-Martinez JL** (2006) Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *J Exp Bot* **57**: 2037-2047
- Martin SW, Glover BJ, Davies JM** (2005) Lipid microdomains--plant membranes get organized. *Trends Plant Sci* **10**: 263-265
- Mason G, Provero P, Vaira AM, Accotto GP** (2002) Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR. *BMC Biotechnol* **2**: 20
- Matas AJ, Yeats TH, Buda GJ, Zheng Y, Chatterjee S, Tohge T, Ponnala L, Adato A, Aharoni A, Stark R, Fernie AR, Fei Z, Giovannoni JJ, Rose JKC** (2011) Tissue- and Cell-Type Specific Transcriptome Profiling of Expanding Tomato Fruit Provides Insights into Metabolic and Regulatory Specialization and Cuticle Formation. *The Plant Cell Online* **23**: 3893-3910
- McCormick S** (1997) Transformation of tomato with *Agrobacterium tumefaciens*. In K Lindsey, ed, *Plant Tissue Culture Manual*. Springer Netherlands, pp 311-319
- Meissner R, Jacobson Y, Melamed S, Levyatuv S, Shalev G, Ashri A, Elkind Y, Levy A** (1997) A new model system for tomato genetics. *The Plant Journal* **12**: 1465-1472
- Mishra MK, Chaturvedi P, Singh R, Singh G, Sharma LK, Pandey V, Kumari N, Misra P** (2013) Overexpression of WsSGTL1 gene of *Withania somnifera* enhances salt tolerance, heat tolerance and cold acclimation ability in transgenic Arabidopsis plants. *PLoS One* **8**: e63064

- Moco S, Capanoglu E, Tikunov Y, Bino RJ, Boyacioglu D, Hall RD, Vervoort J, De Vos RC** (2007) Tissue specialization at the metabolite level is perceived during the development of tomato fruit. *J Exp Bot* **58**: 4131-4146
- Modi VV, Patwa DK** (1961) Occurrence of mevalonic acid in carrots. *Nature* **191**: 1202
- Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB** (2002) Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in lipid research* **41**: 457
- Morikawa T, Mizutani M, Aoki N, Watanabe B, Saga H, Saito S, Oikawa A, Suzuki H, Sakurai N, Shibata D, Wadano A, Sakata K, Ohta D** (2006) Cytochrome P450 CYP710A encodes the sterol C-22 desaturase in Arabidopsis and tomato. *The Plant Cell* **18**: 1008
- Noiriel A, Benveniste P, Banas A, Stymne S, Bouvier-Nave P** (2004) Expression in yeast of a novel phospholipase A1 cDNA from Arabidopsis thaliana. *Eur J Biochem* **271**: 3752-3764
- Notredame C, Higgins DG, Heringa J** (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* **302**: 205-217
- Nyström L, Schär A, Lampi A-M** (2012) Steryl glycosides and acylated steryl glycosides in plant foods reflect unique sterol patterns. *European Journal of Lipid Science and Technology* **114**: 656-669
- Ongun A, Mudd JB** (1970) The biosynthesis of steryl glucosides in plants. *Plant Physiol* **45**: 255-262
- Osorio S, Alba R, Damasceno CM, Lopez-Casado G, Lohse M, Zanor MI, Tohge T, Usadel B, Rose JK, Fei Z, Giovannoni JJ, Fernie AR** (2011) Systems biology of tomato fruit development: combined transcript, protein, and metabolite analysis of tomato transcription factor (nor, rin) and ethylene receptor (Nr) mutants reveals novel regulatory interactions. *Plant Physiol* **157**: 405-425

- Palma JM, Corpas FJ, del Rio LA** (2011) Proteomics as an approach to the understanding of the molecular physiology of fruit development and ripening. *J Proteomics* **74**: 1230-1243
- Pandian S, Saengchjan S, Raman TS** (1981) An alternative pathway for the biosynthesis of isoprenoid compounds in bacteria. *Biochem J* **196**: 675-681
- Park H, Denbow CJ, Cramer CL** (1992) Structure and nucleotide sequence of tomato HMG2 encoding 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase. *Plant Molecular Biology* **20**: 327-331
- Pike LJ** (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* **44**: 655-667
- Potocka A, Zimowski J** (2008) Metabolism of conjugated sterols in eggplant. Part 2. Phospholipid : steryl glucoside acyltransferase. *Acta Biochim Pol* **55**: 135-140
- Prusky D** (1996) Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annu Rev Phytopathol* **34**: 413-434
- Ramasarma T, Ramakrishnan T** (1961) Incorporation of [2-<sup>14</sup>C]mevalonic acid and [2-<sup>14</sup>C]acetic acid into lipids of mycobacteria. *Biochem J* **81**: 303-308
- Re EB, Brugger S, Learned M** (1997) Genetic and biochemical analysis of the transmembrane domain of Arabidopsis 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Cell Biochem* **65**: 443-459
- Rodríguez-Concepción M, Boronat A** (2015) Breaking new ground in the regulation of the early steps of plant isoprenoid biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **25**: 17-22
- Rodríguez-Concepción M, Forés O, Martínez-García JF, González V, Phillips MA, Ferrer A, Boronat A** (2004) Distinct Light-Mediated Pathways Regulate the Biosynthesis and



Exchange of Isoprenoid Precursors during Arabidopsis Seedling Development. The Plant Cell **16**: 144-156

**Rodriguez-Concepcion M, Gruissem W** (1999) Arachidonic acid alters tomato HMG expression and fruit growth and induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase-independent lycopene accumulation. Plant Physiol **119**: 41-48

**Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahm H** (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. Biochem J **295** ( Pt 2): 517-524

**Ruzicka L** (1953) The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. Experientia **9**: 357-367

**Schmidt M, Parrott W** (2001) Quantitative detection of transgenes in soybean [Glycine max (L.) Merrill] and peanut (Arachis hypogaea L.) by real-time polymerase chain reaction. Plant Cell Reports **20**: 422-428

**Schrick K, Debolt S, Bulone V** (2012) Deciphering the molecular functions of sterols in cellulose biosynthesis. Front Plant Sci **3**: 84

**Schuler I, Duportail G, Glasser N, Benveniste P, Hartmann MA** (1990) Soybean phosphatidylcholine vesicles containing plant sterols: a fluorescence anisotropy study. Biochim Biophys Acta **1028**: 82-88

**Schuler I, Milon A, Nakatani Y, Ourisson G, Albrecht AM, Benveniste P, Hartman MA** (1991) Differential effects of plant sterols on water permeability and on acyl chain ordering of soybean phosphatidylcholine bilayers. Proc Natl Acad Sci U S A **88**: 6926-6930

**Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D** (2006) Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. Plant Cell **18**: 1121-1133

- Sharma LK, Madina BR, Chaturvedi P, Sangwan RS, Tuli R** (2007) Molecular cloning and characterization of one member of 3 $\beta$ -hydroxy sterol glucosyltransferase gene family in *Withania somnifera*. *Arch Biochem Biophys* **460**: 48-55
- Shepherd CT, Moran Lauter AN, Scott MP** (2009) Determination of transgene copy number by real-time quantitative PCR. *Methods Mol Biol* **526**: 129-134
- Shou H, Frame B, Whitham S, Wang K** (2004) Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecular Breeding* **13**: 201-208
- Silvestro D, Andersen TG, Schaller H, Jensen PE** (2013) Plant Sterol Metabolism.  $\Delta$ 7-Sterol-C5-Desaturase (STE1/DWARF7),  $\Delta$ 5,7-Sterol- $\Delta$ 7-Reductase (DWARF5) and  $\Delta$ 24-Sterol- $\Delta$ 24-Reductase (DIMINUTO/DWARF1) Show Multiple Subcellular Localizations in *Arabidopsis thaliana* (Heynh) L. *PLoS ONE* **8**: e56429
- Stahl U, Carlsson AS, Lenman M, Dahlqvist A, Huang B, Banas W, Banas A, Stymne S** (2004) Cloning and functional characterization of a phospholipid:diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **135**: 1324-1335
- Suzuki M, Kamide Y, Nagata N, Seki H, Ohyama K, Kato H, Masuda K, Sato S, Kato T, Tabata S, Yoshida S, Muranaka T** (2004) Loss of function of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 (HMG1) in *Arabidopsis* leads to dwarfing, early senescence and male sterility, and reduced sterol levels. *Plant J* **37**: 750-761
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S** (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**: 2725-2729
- Tomato Genome C** (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**: 635-641

- Uemura M, Joseph RA, Steponkus PL** (1995) Cold Acclimation of *Arabidopsis thaliana* (Effect on Plasma Membrane Lipid Composition and Freeze-Induced Lesions). *Plant Physiol* **109**: 15-30
- Uemura M, Steponkus PL** (1994) A Contrast of the Plasma Membrane Lipid Composition of Oat and Rye Leaves in Relation to Freezing Tolerance. *Plant Physiol* **104**: 479-496
- Vranova E, Coman D, Gruissem W** (2013) Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 665-700
- Wallach O** (1912) Zur Kenntnis der Terpene und der ätherischen Öle. [Abhandlung CVIII.]. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **388**: 49-62
- Wang H, Nagegowda DA, Rawat R, Bouvier-Nave P, Guo D, Bach TJ, Chye ML** (2012) Overexpression of *Brassica juncea* wild-type and mutant HMG-CoA synthase 1 in *Arabidopsis* up-regulates genes in sterol biosynthesis and enhances sterol production and stress tolerance. *Plant Biotechnol J* **10**: 31-42
- Wang K, Senthil-Kumar M, Ryu CM, Kang L, Mysore KS** (2012) Phytosterols play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast. *Plant Physiol* **158**: 1789-1802
- Warnecke DC, Baltrusch M, Buck F, Wolter FP, Heinz E** (1997) UDP-glucose:sterol glucosyltransferase: cloning and functional expression in *Escherichia coli*. *Plant Mol Biol* **35**: 597-603
- Weng H, Pan A, Zhang LYC, Zhang ZLD** (2004) Estimating number of transgene copies in transgenic rapeseed by real-time PCR assay with HMG I/Y as an endogenous reference gene. *Plant Molecular Biology Reporter* **22**: 289-300
- Whelan S, Goldman N** (2001) A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol Biol Evol* **18**: 691-699

- Whitaker BD** (1988) Changes in the sterol lipid content and composition of tomato fruit during ripening. *Phytochemistry* **27**: 3411-3416
- Whitaker BD** (1988) Changes in the sterol lipid content and composition of tomato fruit during ripening. *Phytochemistry* **27**: 3411
- Whitaker BD** (1991) Changes in lipids of tomato fruit stored at chilling and non-chilling temperatures. *Phytochemistry* **30**: 757-761
- Whitaker BD, Gapper NE** (2008) Ripening-specific stigmasterol increase in tomato fruit is associated with increased sterol C-22 desaturase (CYP710A11) gene expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 3828
- White J, Stelzer E** (1999) Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. *Trends Cell Biol* **9**: 61-65
- Wojciechowski ZA, Zimowski J** (1975) Acyl composition and biosynthesis of acylated sterol glucosides in *Calendula officinalis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **398**: 111 <last\_page> 117
- Yamaguchi M, Kasamo K** (2001) Modulation in the activity of purified tonoplast H<sup>+</sup>-ATPase by tonoplast glycolipids prepared from cultured rice (*Oryza sativa* L. var. Boro) cells. *Plant Cell Physiol* **42**: 516-523
- Yang L, Pan A, Jia J, Ding J, Chen J, Cheng H, Zhang C, Zhang D** (2005) Validation of a tomato-specific gene, LAT52, used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic tomatoes. *J Agric Food Chem* **53**: 183-190
- Yang Z, Park H, Lacy GH, Cramer CL** (1991) Differential activation of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes by wounding and pathogen challenge. *Plant Cell* **3**: 397-405

**Yoshida S, Uemura M** (1986) Lipid Composition of Plasma Membranes and Tonoplasts Isolated from Etiolated Seedlings of Mung Bean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiol* **82**: 807-812

**Zabin I** (1957) The formation of radioactive lycopene in ripening tomatoes. *J Biol Chem* **226**: 851-859

**Zdzislaw A, Wojciechowski A, Zimowski J** (1975) Acyl composition and biosynthesis of acylated sterol glucosides in *Calendula officinalis*. *Biochim Biophys Acta* **398**: 111-117

**Zimowski JG, Wojciechowski ZA** (1983) Enzymatic synthesis of sterol 6'-*o*-acyl- $\beta$ -D-glucosides in *sinapis alba* and some other plants. *Phytochemistry* **22**: 2175-2178



# **ANEXOS**





Anexo I: Lista de *primers* usados

Nombre	# bp	Secuencias
Lat 1	22	AGACCACGAGAACGATATTTGC
Lat 2.1	22	GCCTTTTCATATCCAGACACAC
Lat.attB3.fw	50	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGCTCAGTGGGAAGGTGTGACTGATAA
Lat.attB2.rev	51	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAGCTTCTTGCATCCTTGAAC
qPCR E8:amiC22.fw	22	TGGCATCCTCATATTGAGATTT
qPCR E8:amiC22.rv	17	GTCCGAGCGTGTGTTTG
npt 1-5'	23	GACAGGTCGGTCTTGACAAAAAG
npt 1-3'	20	GAACAAGATGGATTGCACGC
att3-Tnos-2.for	56	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGCTCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTC T
att2-tnos-3.rev	48	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACCCGATCTAGTAACATAG
attB4r_amiRNA_For	47	GGGGACAACCTTTCTATACAAAGTTGCTCCCAAACACACGCTCGGA
attB3r_amiRNA_Rev	46	GGGGACAACCTTTATTATACAAAGTTGCTCCCATGGCGATGCCTTAA
C-22_des_1_I_miR-s	40	GATAAAAACCGACGCGGAACACAGTCTCTCTTTTGTATTCC
C-22_des_1_II_miR-a	40	GACTGTGTTCCCGTCGGTTTTTATCAAAGAGAATCAATGA
C-22_des_1_III_miR*s	40	GACTATGTTCCCGTCGGTTTTTTCACAGGTCGTGATATG
C-22_des_1_IV_miR*a	40	GAAAAAACGGACGCGGAACATAGTCTACATATATATTCT
C-22_des_2_I_miR-s	40	GATTACTTCTGGCCGACACCCGCTCTCTCTTTTGTATTCC
C-22_des_2_II_miR-a	40	GAGCGGGTGTGCGGCCAGAAGTAATCAAAGAGAATCAATGA
C-22_des_2_III_miR*s	40	GAGCAGGTGTGCGCCTGAAGTATTCACAGGTCGTGATATG
C-22_des_2_IV_miR*a	40	GAATACTTCAGGCCGACACCTGCTCTACATATATATTCT
HMGR2_1_I_miR-s	40	GATTTAACGAAACAATAGCGCCCTCTCTCTTTTGTATTCC
HMGR2_1_II_miR-a	40	GAGGGCGCTATTGTTTCGTTAAATCAAAGAGAATCAATGA
HMGR2_1_III_miR*s	40	GAGGACGCTATTGTTACGTTAATTCACAGGTCGTGATATG
HMGR2_1_IV_miR*a	40	GAATTAACGTAACAATAGCGTCTCTACATATATATTCT
HMGR2_2_I_miR-s	40	GATACTACTGTAGCCAAGACCCTTCTCTCTTTTGTATTCC
HMGR2_2_II_miR-a	40	GAAGGGTCTTGCTACAGTAGTATCAAAGAGAATCAATGA
HMGR2_2_III_miR*s	40	GAAGAGTCTTGCTAGAGTAGTTTCACAGGTCGTGATATG
HMGR2_2_IV_miR*a	40	GAAACTACTTAGCCAAGACTCTTCTACATATATATTCT
HMGR3_1_I_miR-s	40	GATATAAATGGCTTTACAGCCCTCTCTCTTTTGTATTCC
HMGR3_1_II_miR-a	40	GAGGGGCTGTAAAGCCATTTATATCAAAGAGAATCAATGA
HMGR3_1_III_miR*s	40	GAGGAGCTGTAAAGCGATTTATTTTCACAGGTCGTGATATG
HMGR3_1_IV_miR*a	40	GAAATAAATCGCTTTACAGCTCTCTACATATATATTCT
HMGR3_2_I_miR-s	40	GATGAACCTAACTACAGGACCTCTCTCTTTTGTATTCC
HMGR3_2_II_miR-a	40	GAGAGGTCCTGTAGTTAGGTTTCATCAAAGAGAATCAATGA
HMGR3_2_III_miR*s	40	GAGAAGTCTGTAGTAAGGTTCTTTCACAGGTCGTGATATG
HMGR3_2_IV_miR*a	40	GAAGAACCTTACTACAGGACTTCTCTACATATATATTCT

attB1.PPC2.For	52	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATACATTCTACTTTGAAGTTGTT
attB4.PPC2.Rev	51	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGTGAACCCCTTTTACTCAAACCT
Prom.PPC2.For	25	CGTGGCAAGTGTCTATTAGTGCCTG
Prom.PPC2.Rev	25	CCAAATTACGAGTAGCCATCAACCC
attB4r.HMGR1.For	32	CTATACAAAGTTGCTTGAGCAATGGACGTTCC
attB3r.HMGR1.Rev	36	TTATACAAAGTTGTCGACCTAAGAGGAATTGATTAC
attB4r.HMGR2.For	39	CTATACAAAGTTGCTATGGACGTTCCGCCGAGATCTGAA
attB3r.HMGR2.Rev	38	TTATACAAAGTTGTTTAGGAGGACGCCTTGGTGACATC
attB4r.C-22Des.For	36	CTATACAAAGTTGCG GTA CTT CAT CAC ATGGCATCC
attB3r.C-22Des.Rev	36	TTATACAAAGTTGTCATCGTGTGCACCTGTGTGCA
attB4r.For.B3r	26	GGGGACAACCTTTTCTATACAAAGTTG
attB3r.Rev.B4r	27	GGGGACAACCTTTATTATACAAAGTTGT
Seq.attB4.for	21	CAACTTTTCTATACAAAGTTG
Seq.attB3.rev	21	CAACTTTATTATACAAAGTTG
PLI.genotyping.fw	21	CGCATCTGGTGTAGTGGTATC
PLI.genotyping.rev	22	GTTGATCCAGGCACAGTGTAG
qPCR.HMGR2.fw	22	GTGCAGATACCAGTGGGAATAG
qPCR.HMGR2.rev	22	GCACCACCAGAAGCATAGATAG
E8.genotyping.fw	20	TACAACCTCCATGCCACTTG
E8.genotyping.rev	23	ACTTGGCACATGATGATTGTAAC
E8.genotyping2.rev	23	GTACCGAGCTCGAATTCATAAG
E8.genotyping3.rev	23	TCAACCTTTCACATGCGCCTAGG
C22.genotyping.fw	20	GAGAAAGTTCGGTCCGATGTAG
C22.genotyping.rev	20	GTCGGCGAAGGTCTTTATGT
amiRNA.genotyping.rev	25	CAT GTG TAA TAT GCG TCC GAG CGT G
attB4r.HMGR1.F	32	CTATACAAAGTTGCTTGAGCAATGGACGTTCC
attB3r.HMGR1.R	36	TTATACAAAGTTGTCGACCTAAGAGGAATTGATTAC
pKGW.Kana.fw	27	GGA GCA TTT TTG ACA AGA AAT ATT TGC
attB4r.CatDomH2.For	34	CTATACAAAGTTGCTATGTCAGCTTCGTCTGAGG
Actin.fw	26	AAGATGACYCAAATCATGTTTGAGAC
Actin.rev	23	TGRATNCCWGCAGCTTCCATTCC
FSP.qPCR.fw	21	GATGGCTCTTCGAGACATACC
FSP.qPCR.rev	20	TGGTCCGTCTTCTCCTTACA
qPCR.C22.fw	20	TCCACTCAACTGACCTCTCT
qPCR.C22.rev	20	GTCGGCGAAGGTCTTTATGT
qPCR PLI:amiH2.fw	23	AGGTTCCGCGATCTATACAATACT
qPCR PLI:amiH2.rev	19	GTAATATGCGTCCGAGCGT
qPCR 35S:C22.fw	21	CTATCCTTCGCAAGACCCTTC
qPCR 35S:C22.rev	21	GTGATGAAGTACCGAGCAACT
qPCR 35S:amiC22.fw	20	TCGCAAGACCCTTCTCTAT
qPCR 35S:amiC22.rev	17	CGTCCGAGCGTGTGTTT

qPCR.Actin.fw	20	CCTTCCACATGCCATTCTCC
qPCR.Actin.rev	19	CCACGCTCGGTCAGGATCT
qPCR.CAC.fw	21	CCTCCGTTGTGATGTAAGTGG
qPCR.CAC.rev	23	ATTGGTGGAAAGTAACATCATCG
qPCR.HMGR1.fw	23	CTTCCACTCCCATTGTACCTAAC
qPCR.HMGR1.rev	21	GATCTTCTCACGCCACCTTAC
qPCR.HMGR3.fw	22	TCGGCATATCTGGGAACTATTG
qPCR.HMGR3.rev	22	CCTTGATGATTGCCTCACAAAC
qPCR.K4D5B5.fw	22	GTGAAGCAGTGGAAAGAGTAGG
qPCR.K4D5B5.rev	20	CGCCAAGCCACTTCTTGATA
qPCR.Q71LX7.fw	20	GAGATGTGGCTGAAGCTGAT
qPCR.Q71LX7.rev	20	GGCAACACCCGGAACTAATA
qPCR E8:C22.fw	18	ATTCGGCACACCCAACCTT
qPCR E8:C22.rev	24	ACGCTTCTTCTTGATGTAAGAGAT
K4D5B5.fw	49	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGTTGAGTGAGTACTTC
K4D5B5.rev	48	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTATTGACCTGCATAAAG
K4D5B5 NoSTOP.rev	45	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTGACCTGCATAAAG
Q71LX7.fw	49	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGCGATGTTAATAGAG
Q71LX7.rev	48	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAAGCCCTTGCAGAAAC
Q71LX7.NoSTOP.rev	45	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAGCCCTTGCAGAAAC

**Anexo II: Secuencia de la región codificante del gen HMGR2 en la base de datos****SolGenomics**

> Solyc02g038740.2.1 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase

```
ATGGACGTTCCGCCGAGATCTGAAGAGCCTGTTTATCCATCTAAGGTCTTTGCCGCCGATGAAAAAC
CTCTCAAACCCACAAGAAACAACAACAACAAGAGGACAAGAATACCCTTCTCATTGATGCTTC
CGATGTCTCCCACTTCTTTGTATCTCACGAATGGCTTGTTTTCCACCATGTTTTCTCTGTTATGTATT
TTCTTCTATCAAGGTGGCGTGAGAAAATCAGGAATCCACTCCTTTACATGTCGTTACGCTTTCTGAA
TTGGGTGCTATTTTTCGTTAATTGCTTCTGTCATTTATCTTCTGGTTTCTTTGGGATTGGGTTTGTTCA
GACGTTTGTGTCAAGGGGAAATAATGATTCATGGGATGAAAATGATGAGGAATTTCTATTGAAGGA
AGATAGTCGTTGTGGGCCTGCAACTACTCTTGGTTGTGCTGTTCTGCACCACCTGCTCGACAAATTG
CCCCAATGGCACCACCTCAACCTTCTATGTCTATGGTAGAGAAACCTGCACCGTTGATAACATCAGCT
TCGTCTGAGGAAGACGAAGAGATAATTAATCCGTGGTGCAGGGGAAAATACCATCATACTCATTG
GAATCCAAGCTCGGTGATTGTAAGCGCGCTGCTTCGATAAGGAAAGAGGTGATGCAGAGGATTACA
GGGAAGTCTCTAGAAGGGCTACCATTGGAAGGATTTAACTATGAATCTATTCTTGGGCAGTGTTGTG
AGATGCCAATTGGGTACGTGCAGATACCAGTGGGAATAGCAGGGCCATTGTTGCTTAACGGAAAGG
AGTTTTCAGTGCCCATGGCAACCACAGAAAGATGTTTAGTGGCTAGCACCAATAGGGGTTGCAAGG
CTATCTATGCTTCTGGTGGTGTACATGCATTTTGCTTCGTGATGGGATGACCAGAGCACCATGTGTC
AGTTTCGGCACAGCCAAAAGGGCAGCAGAGTTGAAGtTctTTGtTGAAGATCCATAAAAATTTGAGA
CACTTGCTAACGTTTTCAACCAATCAAGCAGATTTGCCAGATTACAAAGAATTCAGTGTGCAATTGCG
GGAAAGAATCTTTACATGAGATTTGTATGTAGCACTGGTGTGCAATGGGAATGAACATGGTGTCC
AAAGGTGTACAAAATGTTCTTGATTACCTTCAGAATGAATATCCCGACATGGATGTCATCGGTATATC
TGGGAACTTTTGCTCGGACAAGAAGCCAGCAGCAGTTAATTGGATCGAGGGCAGAGGAAAGTCTGT
AGTTTGTGAGGCAATTATCACAGAAGAGGTGGTGAAGAAAGTTTTGAAAATGAGGTTGCTGCTCT
TGTGGAGCTGAACATGCTTAAAAATCTTACTGGCTCTGCCATGGCTGGTGCCTTGGAGGTTTCAAT
GCCCATGCCAGCAATATCGTCTCAGCTGTGTTTATAGCCACAGGTCAGGATCCAGCTCAGAACATAG
AGAGCTCGCACTGCATCACTATGATGGAGGCTGTAATGATGGCAAGGACCTCCATATTTCTGTTAC
AATGCCTTCCATTGAGGTTGGTACCGTTGGAGGTGGAACCTCAGCTTGCATCTCAGTCAGCTTGCTTA
AACTTGTTAGGAGTGAAAGGTGCCAACAGAGAGGCCACCAGGGTCAAATGCAAGGCTCTTGCTACA
GTAGTAGCTGGTTCGGTCTTGCTGGTGAATATCCCTCATGTCAGCTATATCGTCTGGGCAACTAGT
TAATAGCCACATGAAATACAATAGATCTACCAAAGATGTCACCAAGGCGTCTCTAA
```

### Anexo III: Secuencia de la región codificante del gen SD en la base de datos SolGenomics

> Solyc02g070580.1.1 Solanum lycopersicum sterol 22-desaturase (SD)

```
ATGGCATCCATTTGGGGTTTGTATCTCCATGGATACCTTATTTCAATTCCTTCATAGCTTTTTACTTC
TTCTTGAACAGATCTCTTACATCAAGAAGAAGCGTTTTCTCCTGGCCCACTCTTGTATCCCCTTCC
TTGGCAACGTAATTCCTTAGTCACAAATCCAATAAATTCTGGGACCTTCAATCAGCTTTAGCTAAG
TCTACTAGCCATGGTTTTCTGTAACTACATCATAGGTAAGTTCATTCTTTACATCCACTCAACTGAC
CTCTCTCATAAGGTCTTGCCAATGTCCGCCCTGACGCTTCCATCTTATCGGTCACCCTTTTGGGAAA
AAGCTATTCGGCGAACATAACTTGATTACATGTTTGGGCAAGAACATAAAGACCTTCGCCGACGAA
TTGCCCCAAATTTACCCCTAAAGCTCTGGGAACCTTACTGATATTCAACAGAGGATTATTATCAAA
CACTTCAAGTCCTGGTTAGATGAAGCATCAAATCCCCTAACACCCCAATCCCCTTCGTTACTTTG
CAGGGATATGAACTTGGATACTTCTCAGACTGTGTTGTTGGTCCATACTTGGATGGAGAATCGAGA
AAGAGATTTAATGTTGATTACAATTACTTCAATGTTGGGTTAATGAACTTCTGTTGATTTACCGGG
TTTTGCCTTCAGAAATGCTAGATTAGCAGTTGGGAGATTAGTTGACACCCTTCGGTTTGTGTGGAAC
AAAGCTTAAACAAGATGAAAAACGAAGAAGAACCACATGCTTGATTGATTTCTGGATGCAGGAAA
ATTTAAGAGAGATTAACGAAGCTAAGATCAATGGATTACAAAAGCCATTTTCAAGTACAGTAACAAGG
AACTTGGAGGTTACCTGTTGACTTCTCTTTGCTGCTCAAGATGCTTCTACTTCTGCTCTGTTATGGG
CAATCGTGCTTCTAGATTCTCACCCACAAGTTCTGGAGAAAGTTTCGGTCGGATGTAGCGAGATTCTG
GTCGCCAGAATCTGAGGAGCCGCTGACGGCGGAAATGCTCAGGGAAATGAAGTACCTGGAAGCGG
TGGCGCGTGAGATAATCAGAATCAGAGCTCCGGCGACAATGGTGCCACATATTGCCGGCGAAGAAT
TCCGGTTAACCGAAGATTACGTTATCCCAAAGGAACAATTGTGTTCCCGTCGGTTTTTTGATTCATCA
TTTTAGGGTTTTCTGAACCGGAGAAATTTGAACCGGACCGGTTTATGGAGGAGAGACAAGAGGAG
CGGGTTTACAAAAGAATTTCTAGCATTGTTGCTGGGCCCCATGCGTGTGTCGGCCAGAAGTATG
CTATTAACCACTTGATGCTTTTCATTGCTATGTTTACGGCTCTGATTGATTTCAAGAGACACAAAACC
GACGGCTGCGATGACATCTCGTATATTCCAACATTGCTCAAAGGATGATTGCAAAGTTTTCTTGC
ACACAGGTGCACACGATGA
```

## Anexo IV: Lista de proteínas obtenidas del análisis por Shotgun Proteomics

Accession	Protein	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]
K4BHA1	ferredoxin-dependent glutamate synthase 1, chloroplastic-like	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc03g063560.2 PE=4 SV=1 - [K4BHA1_SOLLIC]	632.07	49.54	1	60	60	169	1621	177.0
P04264		SWISS-PROT:P04264 Tax_Id=9606 Gene_Symbol=KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1	254.71	58.23	1	30	33	73	644	66.0
P35527		SWISS-PROT:P35527 Tax_Id=9606 Gene_Symbol=KRT9 Keratin, type I cytoskeletal 9	239.87	61.48	1	28	29	60	623	62.1
K4CLQ6		Phospholipase D OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc08g066800.2 PE=3 SV=1 - [K4CLQ6_SOLLIC]	212.80	44.98	1	24	26	60	807	92.0
P13645		SWISS-PROT:P13645 Tax_Id=9606 Gene_Symbol=KRT10 Keratin, type I cytoskeletal 10	195.65	58.01	1	26	29	52	593	59.5
P35908		SWISS-PROT:P35908 Tax_Id=9606 Gene_Symbol=KRT2 Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	181.72	65.58	1	26	31	48	645	65.8
P00761 SWISS- PROT:P0076 1		Trypsin - Sus scrofa (Pig). - [TRYP_PIG]	119.98	54.55	1	8	8	37	231	24.4
K4D9L9	heat shock cognate 70 kDa protein-like	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc11g066100.1 PE=3 SV=1 - [K4D9L9_SOLLIC]	97.03	42.05	1	6	16	24	654	71.4
K4B8P9	phosphoribosylformylglycinamide synthase [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc02g076720.2 PE=4 SV=1 - [K4B8P9_SOLLIC]	79.17	18.37	1	16	16	22	1459	159.8
K4CMQ6	nudix hydrolase 3 [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc08g075390.2 PE=4 SV=1 - [K4CMQ6_SOLLIC]	75.34	32.82	1	16	16	21	783	88.5
H1ZXA9		Heat shock protein 70 isoform 3 OS=Solanum lycopersicum GN=hsc70.3 PE=2 SV=1 - [H1ZXA9_SOLLIC]	68.78	35.48	1	3	13	19	651	71.3
K4AZ93		Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc01g091530.2 PE=4 SV=1 - [K4AZ93_SOLLIC]	62.03	26.57	1	7	7	14	414	43.0

K4BD63	subtilisin-like protease [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc02g092670.1 PE=4 SV=1 - [K4BD63_SOLLC]	61.72	31.56	1	14	14	17	754	79.9
K4BI68	Luminal-binding protein 2 [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc03g082920.2 PE=3 SV=1 - [K4BI68_SOLLC]	60.50	24.29	1	9	11	18	667	73.4
Q9FT17		Lipoxygenase OS=Solanum lycopersicum GN=LOC543818 PE=2 SV=1 - [Q9FT17_SOLLC]	58.02	22.74	1	12	14	17	862	97.4
K4DH34		Catalase OS=Solanum lycopersicum GN=cat1 PE=3 SV=1 - [K4DH34_SOLLC]	57.49	29.47	2	9	9	15	492	56.5
P02533		SWISS-PROT:P02533 Tax_Id=9606 Gene_Symbol=KRT14 Keratin, type I cytoskeletal 14	56.60	30.30	1	9	12	15	472	51.6
P26300		Enolase OS=Solanum lycopersicum GN=PGH1 PE=2 SV=1 - [ENO_SOLLC]	56.46	38.74	1	9	9	13	444	47.8
P13647		SWISS-PROT:P13647 Tax_Id=9606 Gene_Symbol=KRT5 Keratin, type II cytoskeletal 5	52.34	26.44	1	10	14	17	590	62.3
D3TI69		Beta-hexosaminidase OS=Solanum lycopersicum GN=LOC100529103 PE=2 SV=1 - [D3TI69_SOLLC]	46.19	16.52	1	8	8	13	575	64.0
K4BPB8	alpha-glucosidase 1 [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc04g009630.2 PE=4 SV=1 - [K4BPB8_SOLLC]	45.56	16.02	1	9	9	13	649	72.7
P38416		Linoleate 9S-lipoxygenase B OS=Solanum lycopersicum GN=LOX1.2 PE=2 SV=1 - [LOXB_SOLLC]	42.68	18.16	2	10	10	12	859	97.1
K4BUA1	rhamnogalacturonate lyase-like protein [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc04g076630.2 PE=4 SV=1 - [K4BUA1_SOLLC]	40.08	23.85	1	9	9	10	650	74.1
P38415		Linoleate 9S-lipoxygenase A OS=Solanum lycopersicum GN=LOX1.1 PE=2 SV=1 - [LOXA_SOLLC]	39.80	16.51	1	8	10	11	860	96.7
K4C8H3	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase precursor [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc06g071000.2 PE=4 SV=1 - [K4C8H3_SOLLC]	37.13	15.16	1	6	6	11	554	61.5
E0XN34		Alpha-mannosidase OS=Solanum lycopersicum GN=LOC100500729 PE=2 SV=1 - [E0XN34_SOLLC]	35.87	15.76	1	10	10	11	1028	116.4

K4D338	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc10g081510.1 PE=3 SV=1 - [K4D338_SOLLIC]	35.36	15.16	1	8	8	10	765	84.7
Q9M510		Dicyanin OS=Solanum lycopersicum PE=2 SV=1 - [Q9M510_SOLLIC]	34.45	9.34	1	3	3	11	332	34.2
P02769		SWISS-PROT:P02769 (Bos taurus) Bovine serum albumin precursor	33.65	15.82	1	10	10	11	607	69.2
Q5UNS2		Arginase 1 OS=Solanum lycopersicum GN=ARG1 PE=2 SV=1 - [Q5UNS2_SOLLIC]	32.98	28.40	1	6	6	9	338	37.0
K4BXC1	bifunctional alpha-l-arabinofuranosidase/beta-d-xylosidase [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc05g009470.2 PE=4 SV=1 - [K4BXC1_SOLLIC]	32.65	7.76	1	2	5	9	928	104.6
Q9SDZ6		Phospholipase D (Fragment) OS=Solanum lycopersicum GN=PLDa1 PE=2 SV=1 - [Q9SDZ6_SOLLIC]	32.42	11.87	1	4	6	7	809	92.1
K4C2V1	phosphoenolpyruvate carboxylase-like protein [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc05g056270.2 PE=4 SV=1 - [K4C2V1_SOLLIC]	31.60	14.26	1	4	4	7	505	54.6
K4D5V3	Zn-dependent exopeptidases superfamily protein [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc11g011480.1 PE=4 SV=1 - [K4D5V3_SOLLIC]	31.48	11.04	1	5	5	8	670	73.0
K4B2T0	vacuolar-sorting receptor 3 [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc01g107130.2 PE=4 SV=1 - [K4B2T0_SOLLIC]	30.40	11.90	1	4	4	8	630	69.8
K4B8P8	Granulin repeat cysteine protease family protein [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc02g076710.2 PE=3 SV=1 - [K4B8P8_SOLLIC]	27.66	14.40	1	5	5	7	500	55.5
K4BJW4		Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=GAPDH PE=3 SV=1 - [K4BJW4_SOLLIC]	27.06	31.75	1	5	6	7	337	36.7
K4BC16	chaperone protein ClpB3 [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=hsp100/ClpB PE=3 SV=1 - [K4BC16_SOLLIC]	26.90	10.51	2	6	7	7	980	110.3
K4BAW0		Fructose-bisphosphate aldolase OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc02g084440.2 PE=3 SV=1 - [K4BAW0_SOLLIC]	26.64	16.84	1	4	4	7	392	42.4
K4BLV4	amidase family protein [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc03g118030.2 PE=4 SV=1 - [K4BLV4_SOLLIC]	26.49	13.30	1	5	5	7	624	68.7



K4AWF7	COBRA-like protein 7 [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc01g065530.2 PE=4 SV=1 - [K4AWF7_SOLLIC]	26.02	14.04	1	6	6	7	648	70.7
O82777		Subtilisin-like protease OS=Solanum lycopersicum GN=sbt3 PE=1 SV=1 - [O82777_SOLLIC]	23.91	7.23	1	4	4	8	761	82.2
P05117		Polygalacturonase-2 OS=Solanum lycopersicum GN=PG2 PE=1 SV=1 - [PGLR_SOLLIC]	23.23	17.51	1	7	7	7	457	50.0
E5L4Q7		ABA aldehyde oxidase OS=Solanum lycopersicum GN=sitiens PE=4 SV=1 - [E5L4Q7_SOLLIC]	21.95	5.35	2	4	4	5	1290	140.6
K4BL25	chaperone protein ClpB1 [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc03g115230.2 PE=3 SV=1 - [K4BL25_SOLLIC]	21.91	9.33	1	5	6	6	911	101.1
K4BNM3		Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc04g007160.1 PE=4 SV=1 - [K4BNM3_SOLLIC]	21.84	20.45	1	2	3	6	269	30.3
P14280		Pectinesterase 1 OS=Solanum lycopersicum GN=PME1.9 PE=1 SV=5 - [PME1_SOLLIC]	21.18	12.45	1	4	4	6	546	60.0
K4BAN8	Glycosyl hydrolase family protein [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc02g083700.2 PE=4 SV=1 - [K4BAN8_SOLLIC]	21.04	7.43	1	5	5	5	1009	113.4
K4B2H0		Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc01g106010.2 PE=3 SV=1 - [K4B2H0_SOLLIC]	20.83	14.36	1	3	3	5	369	40.0
K4BE37	Neutral/alkaline non-lysosomal ceramidase [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc03g006140.2 PE=4 SV=1 - [K4BE37_SOLLIC]	20.69	8.77	1	4	4	5	764	83.8
K4BNT4		Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc04g007770.2 PE=4 SV=1 - [K4BNT4_SOLLIC]	19.78	29.25	1	4	4	6	147	16.6
K4BAL4	aspartyl protease family protein [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc02g083460.2 PE=3 SV=1 - [K4BAL4_SOLLIC]	19.62	15.40	1	5	5	6	539	58.1
K4CHJ1	putative glycerophosphoryl diester phosphodiesterase 1 [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc07g065120.2 PE=4 SV=1 - [K4CHJ1_SOLLIC]	19.47	7.70	1	4	4	5	753	82.1
K4BIG5	monocopper oxidase-like protein SKS1 [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc03g083900.2 PE=4 SV=1 - [K4BIG5_SOLLIC]	16.97	6.25	1	3	3	5	592	65.9

COLIR3		UDP-sulfoquinovose synthase OS=Solanum lycopersicum GN=SQD1 PE=2 SV=1 - [COLIR3_SOLLIC]	16.24	9.38	1	3	3	4	480	53.2
K4ASG4		Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc01g005980.2 PE=4 SV=1 - [K4ASG4_SOLLIC]	16.01	16.67	1	3	3	4	252	29.2
K4CWR4		Adenosylhomocysteinase OS=Solanum lycopersicum GN=SAHH PE=3 SV=1 - [K4CWR4_SOLLIC]	15.77	14.64	3	4	4	4	485	53.1
K4BYG6		Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc05g014470.2 PE=3 SV=1 - [K4BYG6_SOLLIC]	15.29	25.15	1	3	4	4	338	36.7
K4CQV5		Fructose-bisphosphate aldolase OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc09g009260.2 PE=3 SV=1 - [K4CQV5_SOLLIC]	15.12	12.57	1	3	3	4	358	38.7
Q9FV24		Aldehyde oxidase OS=Solanum lycopersicum GN=AO2 PE=2 SV=1 - [Q9FV24_SOLLIC]	14.64	4.46	1	4	4	4	1367	149.7
K4BNM2	alpha-xylosidase precursor [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc04g007150.2 PE=4 SV=1 - [K4BNM2_SOLLIC]	14.62	8.51	1	2	4	5	599	67.5
K4C3Y3	carbohydrate-binding-like fold- containing protein [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc06g009530.2 PE=4 SV=1 - [K4C3Y3_SOLLIC]	14.35	5.07	1	4	4	4	1202	130.9
K4BA10		Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc02g081400.2 PE=4 SV=1 - [K4BA10_SOLLIC]	14.27	7.47	1	2	2	3	388	42.0
B1VK36		Carbonic anhydrase OS=Solanum lycopersicum GN=ca3 PE=2 SV=1 - [B1VK36_SOLLIC]	12.98	20.00	1	3	3	3	255	28.6
Q86YZ3		SWISS-PROT:Q86YZ3 Tax_Id=9606 Gene_Symbol=HRNR Hornerin	12.14	2.25	1	3	3	4	2850	282.2
K4CNR8	multi-copper oxidase-like protein SKU5 [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc08g079090.2 PE=4 SV=1 - [K4CNR8_SOLLIC]	11.77	7.13	1	3	3	3	589	66.1
B8PWQ9		Chloroplast glutathione reductase OS=Solanum lycopersicum GN=GR PE=2 SV=2 - [B8PWQ9_SOLLIC]	10.76	7.36	2	3	3	3	557	60.1
K4ASQ6		Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc01g006900.2 PE=4 SV=1 - [K4ASQ6_SOLLIC]	10.68	35.22	1	3	3	3	159	17.5

K4CWL0	glutathione-disulfide reductase [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc09g091840.2 PE=3 SV=1 - [K4CWL0_SOLLIC]	8.88	6.83	1	2	2	2	454	49.4
K4D025		Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc10g047630.1 PE=4 SV=1 - [K4D025_SOLLIC]	8.48	7.32	1	2	2	3	410	45.7
P25306		Threonine dehydratase biosynthetic, chloroplastic OS=Solanum lycopersicum GN=TD PE=1 SV=1 - [THD1_SOLLIC]	8.34	5.71	1	2	2	2	595	64.9
A8W7B5		Heat shock protein 70 OS=Solanum lycopersicum GN=HSP70 PE=2 SV=1 - [A8W7B5_SOLLIC]	7.73	4.05	2	2	2	2	692	74.2
K4AXJ0	probable glutamyl endopeptidase [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc01g079450.2 PE=4 SV=1 - [K4AXJ0_SOLLIC]	7.45	3.78	1	2	2	2	978	108.9
K4BX34		Fructose-bisphosphate aldolase OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc05g008600.2 PE=3 SV=1 - [K4BX34_SOLLIC]	7.44	9.87	1	2	2	2	395	43.0
P28032		Alcohol dehydrogenase 2 OS=Solanum lycopersicum GN=ADH2 PE=2 SV=2 - [ADH2_SOLLIC]	7.36	8.16	2	2	2	2	380	41.0
Q38JD4		Temperature-induced lipocalin OS=Solanum lycopersicum GN=TIL PE=2 SV=1 - [Q38JD4_SOLLIC]	6.98	9.73	1	2	2	2	185	21.5
A3FMH5		Ubiquitin (Fragment) OS=Solanum lycopersicum PE=4 SV=1 - [A3FMH5_SOLLIC]	6.78	32.89	12	2	2	2	76	8.5
K4CPW9	purple acid phosphatase 27 [Arabidopsis thaliana]	Uncharacterized protein OS=Solanum lycopersicum GN=Solyc08g083250.2 PE=4 SV=1 - [K4CPW9_SOLLIC]	6.59	4.61	1	2	2	2	608	68.6
F8WS84		Leucine rich repeat receptor protein kinase CLAVATA1 OS=Solanum lycopersicum GN=SlpCLV1 PE=2 SV=1 - [F8WS84_SOLLIC]	6.39	2.56	1	2	2	2	1016	111.1

**Anexo V: Secuencias de aminoácidos de las proteínas SGAT, PSAT, ASAT y SGT de *Solanum lycopersicum*, *S. tuberosum*, *S. melongena*, *Oryza sativa* y *Arabidopsis thaliana*. Proteínas PLA2 y LCAT de *Homo sapiens*.**

>PSAT\_SI | XP\_004247505.1| PREDICTED: phospholipid--sterol O-acyltransferase isoform X2 [*Solanum lycopersicum*]

MRGGHVGFFVIFILLATAGNLGGEFAGDYSKLSGIIPGFASTQLRAWSILDPCYSPDLDFNPLDLVWLDTTKLSAVNCWLKCM  
MLDPYNQTDHNECKSRPDSGLSAITELDPGYITGPLSSVWKEWIKWCIEFGIEANAIIVPYDWRLSPSKLEERDLYFHKLKLTFE  
TALKLRGGPSIVFAHSLGNNVFRYFLEWLKLEIAPKEYGRWLDHIIHAYFAVGAPLLGAIETVKATLSGSTFGLPVSEGTVRLMF  
NTFGSSIWMLPFSKYCTTDNVYRRHFSGGNRKYHHAYHCDEHELKSKYSGWPTNIINIEVPSNRGNEVYPSVETPQTNSLGSKE  
CGFPTQLSFSAREVSDGTFKAIKNYDPSERLHLLKSKYHDDPILNPLTPWERPLKNIFCIYGVDSKTEVGYFAPSGKPYPDN  
WIITDVIYEIEGSLYSRSGNLVEGNPGATSGDETVPYHLSWCKNWLGPKNITRTPQSEHDGSDVQVHLNIEHQHGEDIIPNM  
TKLPTMKYITYEDESFPGTRTAVWELDKANHRNIVRSPALMRELWLEMWHDHHPDKKSKFVTKAKRGPLRDEDCYWDYGK  
ARCAWAEHCEYRVFVGDVHLGQSCRLKSSTSHILSHYV

>SGAT1\_SI | XP\_004250069.1| PREDICTED: phospholipase A(1) LCAT3 [*Solanum lycopersicum*]

MLSEYFSCLLPGRRSDSGNDVADRNPVLLVSGIAGSILHSHKSKKFGSFEFTRVWVRILLAEHEFKKLLWSIYNPKTYTEALDDST  
EIVVPQDDYGLYAIIDLPDMLVCKVHLTGYYHFHDMIDMLVKCGYKKGTTLFGFGYDFRQSNRIDKAMNDLKEKLATAYKAS  
GGRKVDIISHSMGGLLIKCFISLYSDVFSKYVKNWITVATPFQAGPGCIHDSLLTGVQFVDGFESNFFVSRWTVHQLLIECPSIYE  
MLPNPDFKWEKQPEILVWRKSKDGNVTVVKLERYDASTVTLFEEALKCNELNLNGKTVPLPFNLSILDWAASTRKILNDAQLP  
KGIPLYNIYGTSDFTPLDVSYGSEASPIEDITNVCHTMPHYSYVDGDGTVPAESAMADNCEAVERVGVQAGHRGLLRDEKVFEL  
IKKWLVGSDKKKVHSTTSRVMDLYAGQ

>SGAT2\_SI | NP\_001234755.1| lecithine cholesterol acyltransferase-like protein [*Solanum lycopersicum*]

MAMLIEELIKSIEMWLKLIKKPQEYIDPTLDPVLLVPGVAGSILNAVDDKKTGRTERVWVRILGADHEFCDKLWCRFDPSTGKTTN  
LDPDTSIEVPEDRYGLYAIIDLPDPMIIGSDCVYYYHDMIVEMLSWGYQEGKTLFGFGYDFRQSNRLQETMECFQAQKLESIIHTA  
SGGKINIISHSMGGLLVKCFMALHSDIFEKYVKNWIAIAAPFQAGPYITSSLLNGTSFVHGWEERFFISKWSMHQLLIECPSIY  
ELMGCPDFHWEHAPVLEIWKESNSNGESSVLESYSPLEAVSVYELALANNKVTYNGEKISLPFNLELLKWKANKTREILCHAKV  
LDKVKFYNIYGTNYETPHSVCYGSQNAPIIDLQQLPFVQSNYISVDGDGTVPTEAKADGLKAEARVGVPGDHRGIVCDRHVF  
RVIKHWLRADHDPYYPINDYVILPSTFDIERHHEKGLDVTSLREEWIEVSESQDGKENADSGTKVGSISVSHVGGDNTTWE  
AHATLIVHPKSEGKQHVELNAMSVSARA

>SGT1\_SI | XP\_004240463.1| PREDICTED: sterol 3-beta-glucosyltransferase UGT80A2-like isoform X2 [*Solanum lycopersicum*]

MDQTSPEVSMAPSTKFNKRSSSSSGELSVTVVKEDDISTAGAGADVGSREEAVGGSASNGVTNNSGTSGMELTRVSTLPSE  
NPQSPSDQPKLGRSKTEKPTHSSGFAQEAAKIFDDKISEQQLKLLKRIATVKDDGTVEFEIPGDVETTEVLGTGSESVHTAVEDE  
PLDATELQYFPPMQIVVLIVGTRGDVQPFPTAIGKRLQDFGHRVRLATHANFKEFVLSAGLEFYPLGGDPKVLGAGYMVKNKGFLP  
SGPSEIPVQRNQMKIEIISLLPACKEPDMDTGVFPKADAIANPPAYGHVHVAEALQIPIHIFFTMPWPTSEFPHPLSRVKQPA  
GYRLSYQIVDSLIWLGIRDMINDLRKKKLLQPVTYLSGSQSSELDIPHAYIWSPHLVPKPKDWGPKIDVVGFCFLDLATGYPPE  
ALVNWVWKAGPKPIYIGFSLPVQDPQGMDDTIVKALEITNQRGIINKGWGGGLNLAEPKDFVYLLDNVPHDWLFLQCAAVVH  
HGGAGTTAAGLKAACPTTIVPFGDQPFWGERVHARGVGPQPIEADQFTLDKLVHAIRFMLNPEVKERAIELAKAMENEDGV  
TGAVKAFFKQLSRKNEPRLPKPASTFSLRSCFCGCSST

>SGT2\_SI | XP\_004247104.1| PREDICTED: sterol 3-beta-glucosyltransferase UGT80A2-like isoform X1 [*Solanum lycopersicum*]

MSKEKTVDDYGDYIAITELDSREIVGGSVSNVSHSSETSGTEVARFTTLPHNIFSSDKSESHSGHLKLRSKTEPPTHSSQFAE  
EAANISDDSDSEQQLKLLKRIATVKDNGTVEFEIPGDESRVLGVESQSVSNEVEDEPLDEIELHYIPPMQIVMLIVGTRGDVQV  
FIAIGKRLQYGHVRLATHANFKEFVLTAGLEFYPLGGDPVVLGAGYMVKNKGFLPSAPSEIPVQRNQLKEIISLLPACPEPMD  
TGVPFKADAIANPPAYGHVHVAEALQIPIHIFFTMPWPTSEFPHPLSRKQIPAGYRLSYQIVDSLIWLGIRDMINDTRKRKLLR

PVTYLSSSQVSVLDIPHGYIWSPHLVKPKDWGPKVDVVGFCFLDLASGYEPPELVNWLKDGQKPIYIGFGLSPVQEPEKMTQ  
IIVEALERTGQRGIINKGWGLGNLAEPKDFVYLLDNCPHDWLFLQCSAVVHHGGAGTTAAGLKAACPTTIVPFFGDQPFWGE  
RVHARGVGPPIPIDEFSLPKLVEAIEFMLDPKVKENAVELAKAMENEDGVTGAVKAFKHLRNNEPDLDETPAPRSLFSLRRC  
LGFC

>SGT3\_SI | XP\_004237799.1 | PREDICTED: sterol 3-beta-glucosyltransferase UGT80B1 [Solanum lycopersicum]  
MDSSGLNGNQSTRDSEVPNNADERCDATFSDELGDWRTSSSSLKDIRSSDEHTDECLTPEMKYESTHRSSPPQARRGLEHCI  
TAPVTIGGGFLPEGQDMAFSRSLTERRVSPRHNVILDRLSERGGKQLIAELVKIQDGTVEVDLTKSTPETSELLELRSVEEPTLV  
DRIITDFNKSVPKLVIVLVGTRGDVQPFAMAKRLOAFGHVRLATHSNFRDFVKSGGIDYPLGGDPRVLGYMARNKGLI  
PSGPEISVQRKQLKAIIESLLPACTEPDIETGEPFRAQAIANPPAYGHAHVAEALGVPLHIFFTMPWPTSEFPHPMARVPQP  
AAYWLSYILVDLLVWWGIRGYINDFRKKLNLPPAIYFSTYHGSISHFPTGYMWSHVVPKPKDWGSLVDIVGYCFLNLGRNYQ  
PPEEFIKWIQNGPKPVYIGFGSMPLDITIKTTDIILEALRNTGQRGILDRGWGDLGTFQEIPEDVFLVAEYPHDWLFQCAAVVH  
HGGAGTTAAGLRAGCPTTIVPFFGDQFFWGDRIHEKGLGPAPIPIDKLSVEGLSDAITFMLQPDVKSVMELAVLLENEDGVAG  
AVDAFHRHLPSEMPLPTPAYEDIDGNPLQLWLFTRIGRICCLPCGSWL

>SGT4\_SI | XP\_004237491.1 | PREDICTED: sterol 3-beta-glucosyltransferase UGT80A2-like [Solanum lycopersicum]  
MDDSLEKNNGLKDSGEVVDVDFELVIQGDNGNQTNKESTVDNSINVQGSVSGDETGHSAITNVEKPKKSEPPTSQPKAGRHI  
QNKNGKGLVLAALKFDDRVLKRLKLFNRLATIQQDGTVQFEVPGDIKPGKLDFTGTVVYNGASDEAANDVADIPVPLPLQIV  
MLIVGTRGDVQPFVAIGKQLQENGRVRLATHANFKEFVLGAGLEFYPLGGDPKVLAAVMVKNKGFLPSGSEILIQRNQIKDI  
VFSLLPACVDPDPESNVFRVNAIANPPAYGHMHVAEALQVPLHLFFTMPTATSEFPHPLSRVKQSVANRLSYQVVDGLIW  
LGIRDVVNDFRKKLKLRRLYLSNSNSFSHSDVPFGYIWSPHLVKPKDWGQKIDVVGFCFLDLASNYEPPELVKWLLEDGENP  
VYIGFGLSPVQEPEKMTIIVQALEITGQRGIINKGWGLGSLKEPKDFVYLLDNCPHDWLFLHCAAVVHHGGAGTTAAGLAAA  
CPTTIVPFFGDQFFWGERVHARGVGPAPIPVDEFSLEKLVAAIRFMLDPEVKERAVELAKAMEHEDGVTGAVKAFYKHFPLES  
LEPKPEVSPRRPFRFLRRCIGH

>ASAT1\_SI | XP\_004250264.2 | PREDICTED: acyl-CoA--sterol O-acyltransferase 1-like, partial [Solanum lycopersicum]  
MEGNKDVIIYIEGIEIFIKVWLLIYVSLCYCYLSSKILPKGLFRLSSFLPVILFFLYVPLKINSVHLCGNTGFFISWLCNFKLILAFD  
QGPLSDSSLSIIFVLAFLAPIKIQKQSQIYVENRDKFHQNNHFQETPSNEKDFAKNDHFQETQFPSSIDKIENNPFDQGYFET  
PSKLVENGSSVQNGKDFAKSGYFKESSVPSFAKSNKGQKLNQYIKTLIFALIIRVYDYSDYIHPYIIMVYCFHIYLSLDIILAIVSGLA  
RGLLGLQLEPQFNEPYLSTLQDFWGRWNLIVTRILRPTIYKPVLSLANILGRKWAPIPAVMATFVVSGLMHLEIFYYLGRVKP  
TWEITWFFLLHGVCNLEIYAKKVINGRFKLPRIIGTILTVGFVMITGLWLFPPQLLRCNSDVRALAEYEAIGAFFKDFTRAVKSTFS  
R

>ASAT3.1\_SI | XP\_010312740.1 | PREDICTED: acyl-CoA--sterol O-acyltransferase 1-like [Solanum lycopersicum]  
MEGEIHNFIWVWVIVLASLCSYSHIAKFIKPKGSRFVATFPIVCLFYILPLYFTSINLGATTSFFITGLATFKLILFAFGKGLSSTSPPLP  
STFIPLACLPIKFKKSSKTKDVEITKATNSTFNLVTKIAILIRVYNYKENLHPKILFCYCLHIYFMLEIMLNIVSIMVRRVSRVEL  
EPAINNPHLASSLQDFWGRWNLMTNLRITVDYHVRVIVDQIPRWAPIPAVLATFFVVSGLMHLEFFYYIGRLKPSGEAMTF  
FLIHGVALSVEIVVKILNGKFLVPRIISGPLTAFIIFTSFWLFFPPFLRGNTLKLCEYIAFFKFIRYQQLSPTNITCPFL

>ASAT3.2\_SI | XP\_010312741.1 | PREDICTED: acyl-CoA--sterol O-acyltransferase 1-like [Solanum lycopersicum]  
MEGEIHNFIWVWVIVLASLCSYSHIAKFIKPKGSRFVAVFPIVCLFLFLPLYLTSIHLGGTTSFFIAWLATFKLILFAFGKGLSSTPPLP  
LSTFIPLACLPIKFKQKNSINDNVETKKTSTLNVHTKIALLAIFIRVYSYKDYLHPKIILSFYCFHIYFMLEIIFNMISAVVRGVSVEL  
EPPFYEPYLASSLQDFWGRWNLMTNLRITVDYHVRVIVDQIPRWAPIPAVLATFFVVSGLMHLEIFNYNRLMPNGDYIIF  
FLIHGVTLSVEITIKKSKGNFFLPRIISCPALGFIFFTSFWMFFPFLRGNTLKLCEYIAFFKFIRYQQLSPTNITCPFL

>ASAT3.3\_SI | Solyc11g012220.1.1 Wax synthase isoform 3 [Solanum lycopersicum] (Solgenomics DB)  
MEGEIHNFIWVWVIVLASLCSYSHIAKFIKPKGSRFVAIFPIVCLFFILPLYLTSIHLGATTTFFITGLATSKLILFAFGKGLSSTPPLPLS  
TFIPLACLPIKFKKSSKTKDVEITKATNSTFNLVTKITLAILRVYDYKDNLHPKILFCYCINIYIMLEILNMVSAAVRRVSRVDL  
DPPFNPEYLTSSLQDFWGRWNLMTNLRILAVYDPRVLRVIVADRIIPSMWAPISAVFVTFVVSGLVHELLLYIERSKPSGEAMM  
FFLIHGVALCIVEIKKMANGKILVPRITISGPLTAFIIFTSFWLFFPPFLRSNTEFKLCTEYIAFFKFIRYQQLSPTNITCSFL

>ASAT3.4\_SI | XP\_010312742.1 | PREDICTED: acyl-CoA--sterol O-acyltransferase 1-like [Solanum lycopersicum]  
MEGEIHNFIWVWVIVLASLCSYSHIAKFIKPKGARFVAIFPIVCLFLFLPLYLTSINLGCTTSFFIAWLATFKILLFVFGKGLSSTPPLPLS  
STFIPLACLPIKFKYKSTDDVETTKATNSTFNLVKIALLATLIRVYNYKDNLHPKIILFCYCLHIYFMLEIILMVSATVRRVSRVELE

PPFNPEYLASSLQDFWGRWNLMVTNLRPTIYDPIHSMVANRISRKWAPLPAVIATFFVSGLMHELIFYYNGRLKPNGEVMM  
FFLIHGVALSVEIVIKKLNKGLVLPRIISGPLALSFIIFTSFWLFFPPFLRGNTELKACTEFIAFLFIRYGLKISPTNITCPLL

>ASAT3.5\_SI | XP\_010312743.1 | PREDICTED: acyl-CoA--sterol O-acyltransferase 1-like [Solanum lycopersicum]  
MKGEIHNFIWVTVLISLCYCHTIKFFPNGKSRFVAIPIVCLFFILPLYLTSINLGGTTCFFIAWLANFKILLFAFGKGPLSSIPPLPLS  
TFIPLACLPIKYQKHSPSDNVETTKTTNSTLNLVTKITLLAILRVVNYKDNLHPKLLFCYCLHIYFFLEILLTMVSTMVVRVASQVEL  
EPPFDEPYKTSSLQDFWGRWNLMVTNLRPTVYNLVRSLMLDRIPRKWAPLPAVLATFFVSGIMHELIFYYISREKPSWEVTCF  
FIHGVALSVEIMVKKLLNGKLLVPRFISGPLTLGFIILTSFWLFFPPFLRGPDKVKGNCESIAFLFVRYGKLVSPDNITCPLM

>ASAT3.6\_SI | XP\_004250553.2 | PREDICTED: acyl-CoA--sterol O-acyltransferase 1-like [Solanum lycopersicum]  
MVGEIHNFIWVTVLISLCYCHTIKFFPNGKSRFVAIPIVCLFFILPLNLSINLGAITSFFIAWLATFKLILFAFGKGPLSSTTPPLPL  
TFIPLACLPIKFQTPSTNTTQKSTNSTLNIVIKIALLATLIWVYSFKAHLHPYIILLLYCFHIYFSLEIILLTMVSTMVVRVVSQVELEPPFDE  
PYKTSSLQDFWGRWNLMVTNLRPTVYVVRMLMTERISRKWAPLPAVLATFFVSGLMHELIFYNIGRLKPSGEVTCFFIIHG  
VALTLEIVIKKLLNGTVLVPKIISGPLALGFIILTSFWLFFPPFLRGAEKIACCTEFIAFLFVKYKGLVSPSNITCPLVL

>ASAT4\_SI | XP\_010314632.1 | PREDICTED: acyl-CoA--sterol O-acyltransferase 1-like [Solanum lycopersicum]  
MENYKIMIIKFLNPFLLIFLLLSLNYSYFIIPKFKGIPRIILSIFILYFLPWCFSAFLRGLSFFITWITSFKLILFCFNKGPLSLCKN  
PIDFILISILPLKISIFDEKSVRNTSEKSIHDEKIVDRKYEISDKTSIKKLISDLKDVQKYEIFDMSIYKRYEMEEIFKQPYLATSFRDFW  
GKRWRNRYSSKMLRLTIYDPTNEALKNLGKNTSNLLAIVCTFVVSAIMHELMFYITCGLCLKPTCEVMWFFVLQGCISCEKFFYA  
KNWVIMDARISILLKRIFIVFSFYLLVLPVVREGKNTCEVTK

>PSAT\_St | XP\_006367219.1 | PREDICTED: phospholipid--sterol O-acyltransferase-like isoform X1 [Solanum  
tuberosum]  
MRGGHVGFVVFILLAAAGNLGCEFAGDYSKLSGIIIPGFASTQLRAWSILDCPYSPLDFNPLDLVWLDTTKLLSAVNCWLKCM  
MLDPYNQTDHRECKSRPDSGLSAITELDPGYITGLSSVWKEWIKWCIEFGIEANAIAPYDWRLSPSKLEERDLYFHKLKLTFE  
TALKLRGGPSIVFAHSLGNNVFRYFLEWLKLEIAPKEYGRWLDHIIHAYFAVGAPLLGAIETVKATLSGSTFGLPVSEGTARLMF  
NTFGSSIWMLPFSKHCTTDNVYRRHFSGGNRKYHHAYHCDEHELKSKYSGWPTNIIIEVPSIRGNEVYPSVETAQTNLSGM  
ECGFPTQLSFSAREVSDGTFKAIKNYDPSERLHLLKSYHDDPILNPLTPWERPPLKNIFCIYGVDSKTEVGYFAPSGBKPYPD  
NWIITDVIYEIEGSLYRSNGLVEGYPGATSGDETVPYHLSWCKNWLGPKNITRTPQSEHDGSDVQVHQNIEHQHGEDIIPN  
MTKLPTMKYITYEEDSESPGTRTAVWELDKANHRNIVRSSALMRELWLEMWHDIHPDKKSNFVKAKRGLRDEDCYWDY  
GKARCAWSEHCEYRYVFGDVHLGQSCRLKCSTSHLLSHYV

>SGAT1\_St | XP\_006353270.1 | PREDICTED: phospholipase A(1) LCAT3-like [Solanum tuberosum]  
MLTDYFSCLLPGRSSDSGDSVADRNPLVLLVSGLAGSILHKSCKKFGSFETRVRVWVRLLLAEHEFKKLLWSIYNPKTYEALDDST  
EIVVPQDDYGLYAIIDLPSLMVKCVHLTGVIYHFDMIDMLVKCGYKKGTTLFGFGYDFRQSNRIDKAMNDLKEKLAAYKAS  
GGRKVDIISHSMGGLLIKCFISLYSDVFSKYVNWITATPFQAGPCINDSLLTGQVQVDFGFSNFFVSRWTMHQLLIECPSIYE  
MLPNPDFKWEKQPEILVWRKSKDGNVVKLERYDASTSVTLFEEALKTNELNLHGKTMPLPFNLSDWAASRTRKILNDAQLP  
KGMPLYNIYGTSDTDFDVSYGSEASPIEDLTNVCHTMPQYSFVDGDTVPTESAMADNCEAVERVGVQAGHRGLLREDEKVF  
ELIKKWLGVSDKKKVHSRTRSRVMDLYAGQ

> SGAT2\_St | XP\_006362589.1 | PREDICTED: lecithin-cholesterol acyltransferase-like 4-like [Solanum  
tuberosum]  
MAMLIEELIKSIEMWLKLIKKPQEYIDPNLDPVLLVPGVAGSILNAVDKKTGRTERVWVRILGADHEFCDKLWCRFPDSTGKTTN  
LDPDTSIEVPEDRYGLHAIDNLDPDMIVGSDCVYYHDMIVEMLSWGYQEGKTLFGFGYDFRQSNRLQETMECFAQKLESIH  
ASGGKKINIISHSMGGLLVKCFMALHSDIFEKYVKNWIAIAAPFQAGPYITSSLLNGTSFVHGWEEFFIKWSMHQLLIECPSI  
YELMGCPDFHWEHAPLEIWIKEKSNNGESSVLESYSPLAHSVYELALSNNKVTYNGEKISLFPNLELLKWANKTREILCHAK  
VPDKVKFYNIYGTNYETPHSVCYGSQNAISDLQQLPFVQSNYISVDGDGTVPTESAKADELKAEARVGVPGDHRGICDRHVF  
RVIKHWLRADHPYYPNTNDYVILPTSFDIERHREKGLDVTSLREEWEIVSESQDGKENADSGKTKVGSISVSHVGGDNTTWE  
AHATVIVHPKSEKQHVLELNAMSVSARA

> SGT\_St | XP\_006364544.1 | PREDICTED: sterol 3-beta-glucosyltransferase UGT80A2-like [Solanum tuberosum]  
MDHQKQTSPEVPMAPSTNFDRRSSSSSGEVSVTVKKENDINTAGAGADVDSREEAVGGSASNGVTNSSGTPGMELTRVN  
TLPEKQSTDLHLKLEKSKTEKPTHSSGFAQEAAKIFDNKISEQQKLLKRIATVKDDGTVEFEIPGDVETTEVLGTGSESVLTA  
VEDEPLDATALQYFPPMQIVILVIGTRGDVQPFATAIGKRLQDFGHRVRLATHANFKEFVLSAGLEFYPLGGDPKILAGYMVKNKG  
FLPSGSEIPVQRNQMKIISLLPACKEPDMDTGVPFKADAIANPPAYGHVHVAEALQIPIHIFFTMPWPTPTSEFPPLSRVKQ  
PAGYRLSYQIVDTLIWLGIRDLINDLRKTKLKRVPVTVLSGSHISELDIPHAYIWSPHLVKPKDWGPKIDVVGFCFLDLVTGYEPPE

SLVNWKAGPKPIYIGFGLSPVQDPQRMTDTIVKALEVTNQRGIINKGWGGLGLTAEPKDFVYLLDNVPHDWLFLQCAAVVH  
HGGAGTTAAGLKAACPTTIVPFQDQPFWGERVHARGVGPLIEADQFTLDRLVHAIRFMLNPEVKERAIELAKAMENEDGVT  
GAVKAFFKQLSRTKSEPPQLPKPTSTFSLRSCFGCS

>ASAT\_St | XP\_006352358.1 | PREDICTED: acyl-CoA--sterol O-acyltransferase 1-like [Solanum tuberosum]  
MEGEIHNFIWVWTIVIASLCYSHTIAKFVPGKSRFVAIFPIICLFFILPLYLTSINLGCCTTSFFIAWLANFKILLFVFGKPLSSTPPLPL  
STFIPLACLPIKFQKNSTSDNVETTKKATNSTFNVLTKIALLATLIRVYNYKDNLHPKILFCYCLHIYFMLEIILIMVSATVRRVSRVEL  
EPPFNEPYLASSLQDFWGRWNLMTNLRPTIYDPIHSMVADRISRKWAPLPAVIATFFVSGVMHELIFYYNGRLKPNGEVM  
MFFLIHGVALSLEIVIKKIFNGKFLVPRIISGPLALSFIIFTSFWLFFPPFLRSNTELKACTEFIAFLEFIRYKGLINPTNITCPLL

>PSAT\_At | NP\_171897.2 | phospholipid sterol acyl transferase 1 [Arabidopsis thaliana]  
MGANSKSVTASFTVIAVFFLICGGRTAVEDETEFHGDYSKLSGIIIPGFASTQLRAWWSILDCPYTPLDFNPLDLVWLDTTKLLSAVN  
CWFKCMVLDPNQTDHPECKSRPDSGLSAITELDPGYITGPLSTVWKEWLKWCVEFGIEANAIVAVPYDWRLSPTKLEERDLYF  
HKLKLTFTETALKLRGGPSIVFAHSMGNNVFRYFLEWLRLEIAPKHLYKWLQDHIHAYFAVGAPLLGSVEAIKSTLSGVTFGLPVSE  
GTARLLSNSFASLLWMPFSKNCKGDNTFWTHFSGGAACKDKRVYHCDEEEYQSKYSGWPTNIIIEIPSTSVTETALVNMTS  
MECGLPTLLSFTARELADGTLFKAIEDYDPSKRMLHQLKLYHDDPVFNPLTPWERPPIKNVFCIYGAHLKTEVGYFFAPSGKP  
YPDNWIITDIIYETEGSLVSRSGTVVDGNAGPITGDETVPYHLSWCKNWLGPKNITMAPQPEHGDSDVHVELNVDHEHGS  
DIANMTKAPRVKITYFYEDSESIKRTAVWELDKTNHRNIVRSPVLMRELWLQMWHDIQPGAKSKFVTKAKRGLRDADCY  
WDYKACCAWQEYCEYRYSFGDVHLGQSCRRLNNTSANMLLQYI

>SGAT1\_At | NP\_566201.1 | phospholipase A(1) LCAT3 [Arabidopsis thaliana]  
MGWIPCPCWGTNDNENAGEVADRDPVLLVSGIGGSILHKKNSKSEIRVWVRIFLANLAFKQSLWSLYNPKTYTEPLDDNIE  
VLVPDDDDHGLYADILDPSWFVKLCHLLEVEYHFDHMIEMLVGCGYKGGTTLFGYGYDFRQSNRIDLLILGLKKTLETAYKRSGGR  
KVTIISHSMGGLMVSCFMYLHPEAFSKYVNWITATPFQAGPGCINDSILTGVOFVEGLESFFVSRWTHMQLLVECPISYEM  
MANPDFKWKQPEIRVWRKSENDVDTVELESFGLIESIDLFDALKNNELSYGGNKIALPFNFAILDWAAKTREILNKAQLPD  
GVSFYNIYGVSLNTPFDVYCYGTETSPIDDLSEICQTMPEYTYVDGDTVPAESAAAQFKAVASVGVSGSHRGLLDRDERVFELIQ  
QWLGVPEPKAKRKHRLRTHKVVDSG

>SGAT2\_At | NP\_193721.2 | calcium-independent phospholipase A [Arabidopsis thaliana]  
MSLLEIIRSVALLKLRNRNQEPYVDPNLPVLLVPGIAGSILNAVDHENGNEERVWVRIFGADHEFRTKMWSRFPDSTGKTI  
SLDPKTSIVVQDRAGLHAIDLDPDMIVGRESVYFHEMIVEMIGWGFEEGKTLFGFGYDFRQSNRLQETLDQFAKLETYVK  
ASGEKINIVISHSMGGLLVKCFMGLHSDIFEKYVQNWIAIAAPFRGAPGYITSTLLNGMSFVNGWEQNFFVSKWSMHQLLIEC  
PSIYELMCCPYFKWELPPVLELWREKESNDGVGTSYVLESYCSLESLEVFTKLSNNTADYCGESIDLFPNWKIMEWAHKTKQ  
VLASAKLPPVKFYNIYGTNLETPHSVCYGNKMPVKDLTNLRYFQPTYICVDGDGTVPMESAMADGLEAVARVGVPEHRGI  
LNDHRVFRMLKWLNVGEPDPFYNPNVDYVILPTTYEFKFEHENGLEVASVKESWDIISDDNIGTTGSTVNSISVSQPGDDQ  
NPQAEARATLTVQPQSDGRQHVELNAVSVSDA

>SGT\_At | CAB06082.1 | UDP-glucose:sterol glucosyltransferase [Arabidopsis thaliana]  
MPEISPAELAKVSSSSSSSSSSGRASVKIEIEGGAAASGVVIVSELETNPKTVVASIADETVAESSTGNKSFSRVWMTMPLEG  
SSSSDRAESSSTNQPRLDKSKTERQKQVTHILAEADAAKIFDDKISAGKLLKNRIATVKHDGTVEFEVPADAIPQPIVVDRGESK  
NGVCADESIDGVDLQYIPPMQIVMLIVGTRGDVQPFVAIAKRLQDYGHRVRLATHANFKEFVLTAGLEFYPLGGDPKVLGYM  
VKNKGFLPSGPSEIPIQRNQMKDIIYSLLPACKEPDPSGISFKADAIANPPAYGHTHVAEALKIPIHVFFTMPWPTSEFPPLS  
RVKQPAGYRLSYQIVDSLWLGIRDVNDLRKKLKLRPVYLSGTQSGSNIPHGYMWSPHLVPKPKDWGPQIDVVGFCLD  
LASNYEPPAELVEWLEAGDKPIYIGFGLSPVQPEKMTIIVEALQRTKQRGIINKGWGGLGNLKEPKDFVYLLDNVPHDWLFP  
CKAVVHHGGAGTTAAGLKAACPTTIVPFQDQPFWGERVHARGVGPSPVDEFSLHKLEDAINFMLDDKVKSSAETLAKAMK  
DEDGVAGAVKAFFKHLPSAKQNISDPIPEPSGFLSFRKCFGCS

>ASAT\_At | NP\_190765.1 | acyl-CoA sterol acyl transferase 1 [Arabidopsis thaliana]  
MASFIKAWGLVIISLCYTFIIFIAKLVPKGIKRLILFFPVFLIFFVIFLIYSLHLLGITAFFIAWLANFKLLLFALGRGPLSSNHKPLSLPIFL  
AVSCLPIKIQSPKPTKTHSHEGSTEGPLIYTIKAVFVLIKAYEYSTKLPEKVVLTLYAIHIYFALEIILAATAAAVRAMSDLELEPQF  
NKPYLATSLQDFWGRWNLMTGILRPTVYEPSLQLFSLVGNYSQILAAFGTFFVSGIMHELIFYYMGRRLRPDWKMMWFFLI  
NGFCTTVEIAIKKTINGRWRFPKAIQVLTFTVMVTALWFLPEFNRCNIVEKALDEYAAIGAFAVEVRRKLTAYLF

>PSAT\_Sm | Sme2.5\_02896.1\_g00002.1 | S. melongena  
MRGGHVGFVVTIFILLSAVGIVSTEFAGDYSKLSGIIIPGFASTQLRAWWSILDCPYSPDFNPLDLVWLDTTKLLSAVNCWLKCM  
LDPYNQTDHSECKSRPDSGLSAITELDPGYITGPLSSVWKEWIKWCIEFGIEANAIAVAVPYDWRLSPLSKLEERDLYFHKLKLTETA

LKLRGGSSIVFAHSLGNNVFRYFLEWLKLEIAPKEYKRWLDDHIHAYFAVGAPLLGAIETVKATLSGATFGLPVSEGTARLMFNFT  
 GSSLWMLPFSKYCTTDNVYRKHFSGGNRKTTHAYHCDENELQSKYSGWPTNIINIEVPSIRGNEAYPSFVETAQTNLSGMECG  
 FPMQLSFSAREVSDDPFNPLTPWERPPLKNIFCIYGVDSKTEVGYFAPSGKPYDPNWIITDVIYEIEGSLYSRSGNLVEGNPGAT  
 SGETAGDKKLAAGKWKLESSTRS

>SGAT1\_Sm | Sme2.5\_09108.1\_g00001.1 | *S. melongena*  
 MFSDYFSCLLPGRSSDSVNDVADRNPVLLVSLAGSILHSKSKFGFETRNVWRLLLAELFEKLLWSIYNAKTGYTESLDDSTE  
 IVVPQDDYGLYVIDVLDPSLMVKCVHLTNVYHFHDMIDMLVKCGYKKGTTLFGFGYDFRQSNRIDKAMNDLKEKLAAYKAS  
 GGRKVDIISHMSGLLIKCFISLHSDNYHSSMSGIPNASNTFQVFSKYVNWISIATPFQAGPGCINDSLLTGVQFVDFGFSNFV  
 SRWTMHQLLVECPISYEMLPDPDFKWEKQPEILVWRKSKDGNIVVKLERYDASTSVTLFKKALKSNELNLNGKTVLALPFLNSIL  
 DWAERTRKILNDAQLPEVIPFYSIYGTSTFDTPFDVSYGSEASPIEDLEDVCHTMADNFEAVERVGVQAGHRGLLRDEKVFALIKT  
 WLGVS DKMKVHRSRVM DLYSGQ

>SGAT2\_Sm | Sme2.5\_01492.1\_g00005.1 | *S. melongena*  
 MAMLLEELIKSMEMWLKLIKKPQEYIDPTLDPVLLVPGIAGSILKATDKKTGRTERVWVRILGADHEFCDKLWCRFPDSTGRTE  
 NLDPDTSIEVPEDRYGLYVIDNLDPMIIGSDCVYYYHDMIIEMLSWGYQEGKTLFGFGYDFRQSNRLQETMECFAQKLESHT  
 ASGGKINIISHMSGLLVKCFMALHSDIFEKYVKNWIAIAAPFQAGPGYIASSLLNGTSFVHGWEKFFISKWSMHQLLIECP  
 YELMGCPDFQWEHAPLLEIWKESNSNGESTVVLESYTPLEAVSVYELALSNNKVTYDGEKISMPFNFELLNWANKTREILCHA  
 KVPDKVKFYNIYGINYETPHSVCYGSQNAPISDLQQLPFVQSNYITVDGDGTVPTEAKADGLNAEARVGVAGDHRGIIICDRHV  
 FRMVKHWLRADHDPYYPVNDYVILPTAFDIEKHHEKGLDVTSVREEWEIVSEREDGKENAASGKTKVGSISVSHVGSVDTMF  
 EEAHATVIVHPKSEGKHHVELNAMSLSASA

>SGT\_Sm | Sme2.5\_08093.1\_g00002.1 | *S. melongena*  
 MPQKTSGEESVTAEKENGSTGGAVGGAVA EVASNEAVDGSVNSNGSTGTPGMGLTRVNTLPPEILSSEKPEPSDDFKL  
 GRSKTETPTHSSGFAQEAAKIFDNKISEQQKLLKRIATVKDDGTVEFEIPGDVEPTGVLGTGSESVHTAVEDEPLDATELQYFP  
 PMQIVMLIVGTRGDVQPFATIGKRLQDFGHRVRLATHANFKEFVLAAGLEFYPLGGDPKILAGYMVKNKGFLPSGPEIPVQR  
 NQMKEIISLLPACKEPDMDTGVVPFKADAIANPPAYGHVHVAEALQIPIHIFTMPWPTTEFPHPLSRVKQPAGYRLSYQIVD  
 SLIWLGI RDLINDVRKKKLLRPVTYLSGSQSELDLPHAYI WSPHLVPKPKDWGPKIDVVGFCLDLATGYEPPELVKWL EAGP  
 KPIYIGFGLSPVQDPQRM TETIVKALEITNQRGIINKGWGGLGNLAEPKDFVYLLDNCPHDWLFLQCSAVCPTTIVPFFGDQPF  
 WGERVNARGVGPQIPADQFTLDRLVHAIRFMLDPPVKQRAIELAKAMENEDGVTGAVKAFFKQLPRNKHESELPKTTSSFS  
 VRSCFGCS

>ASAT\_Sm | Sme2.5\_00983.1\_g00010.1 | *S. melongena*  
 MDVNMELQNFIRVWFAAIGALCYCYCVTRIPSGILRLLFVLPVYFFLILPLDLSSFHGAPTIFYLVWLANFKLLFCFDRGPLSSY  
 SSLPLLHFLSIALLPVKPKQSGQSTERPGLFWGKIILAAIIRAYKYRELLHSNVILVLYCLHIYLAVELILAITVVPVQAFGLGIEPQFN  
 DPYLATSLQDFWRRWNLMVPGILRPAVYFPVRAISTCYLGKELANLPAIFATFLVSGMLHELIYYLSRVRPTWEVTFVFLH  
 GFCVCTEVTVKKFFHGGWQMNRVLSGVLTAFVAWTGDWLFPPQIIRNEMDRKTINEYVLLDLVKHRLLPWDGPWS

>PSAT\_Os | BAD21662.1 | phosphatidylcholine acyltransferase-like [*Oryza sativa* Japonica Group]  
 MPRRRLRRGDLACSVAVAVAAVAVAAVAVGAVGGGGADFDYRKLSGIIPGFASTQLRAWSVLDPCYSPDFNPLDSVWL  
 DTAKLLSAVNCWLKCMLLDPYNQTDHPECKSRPDSGLSAITELDPGYITGPLSSVWKEVWVWCVFEFGIEANAIIVPYDWRLLP  
 SMLEERDLYFHKLKLT FETALKLRGGPSLVFAHSMGNVFRYFLEWLKLEIAPKHYIRWLDEHIHAYFAVGAPLLGSTEAVKAALS  
 GATFGLPVSEGTARLMFNAGSSWMLMPFSEYCKADNIYWKHFEGKGGCHHRQQCDEMEYKSEYSGWPTNLVSIPTVR  
 DTEAYPSIMDTTENITSSMECGKPTLLSFSAREVSDGTLFKTIKDWDPQSIGLIHQLEKYYQGDVPLNPLTPWERPPIKNVFCIYG  
 LDSKTEVGYFAPSGKPYDPNWIITDIIYEFEGSLLSRQNKIVTQFILSRGNSVTGKPNSSGDGTVSYNSLSWCKNWLGPKNVNI  
 TRAPQAEHDGSDLQTKMNVDDHVGQGLPNMTRTPHVKYITYFEDAESIPGWRTAVWELDKANHRNVRMPVLMRELWLE  
 MWHDMPDAKSKFVTKAFRGLRNDCHWDYAKARCGFPEHCEYRYTFGDVHLGMSCKLKNSSNTLLQQYL

>SGAT1\_Os | EEE5027.1 | hypothetical protein OsJ\_02688 [*Oryza sativa* Japonica Group]  
 MAVLGVGAAVRLRLVLRHLRLRGRRRRRRRGGGGVEDEEGREAVVLVSGMGGSVLHARRRSNPRFLRVVWRILRA  
 DADFRKYLWSLYNPDTGYVEPLDDDDVEIVVPEDDHGLFAIDILDPWFVEILHLSMVYHFHDMIDMLVDCGYKKGTTLFGYGY  
 DFRQSNRIDKVMVGLRAKLETAYKASGGKKNVISHMSGLLVSCFMSMNRDIFAKYVNWICACPFQAGPGCINDSLLTGL  
 QFVYGFESFFFVSRWVMHQQLLVECPISYEMLPNPHFKWKKAPVQVWRKKPEKDGAELVLYEATDCLSLFQALRNNELKYN  
 GKTIALPFNMSVFKWATETRRIEDAELPDTVSFYNIYGTSTYDTPYDVCYGESESSPIGDLEVCHTMPVYTYVDGDGTVP  
 ADGFAAKERVGIADHRGLLCDENVFELLKWLGVKEESTRRRRLSKSKVTDFAFS



>SGAT2\_Os | NP\_001053867.1 | Os04g0615100 [Oryza sativa Japonica Group]

MAVLEDLIRAIELWLRIAKEQVPLVDPTLDPVLLVPGIGGSILEAVDEAGKKERVVVRILAADHEFRAHLWSKFDASTGKTVSVD  
 EKTNIWVPEDRYGLYAITDLDPMIIGDDSVCIYHDMIVQMIKWGYQEGKTLFGFGYDFRQSNRLSETLDRFSRKLESVYIASGE  
 KKINLITHSMGGLLVKCFMSLHSDVFEKIKSWIAIAAPFQAGPYITTSLLNGMSFVEGWESRFFISKWSMQQLLECPYIYELL  
 ANSTFWEDTPYLQIWRQKLDNTNGKKSAMLESYEPDEAIKMIREALSKEIISDGMHIPLPLDMDILRWAKETQDVLCAKLPK  
 SVKFNINIGTDYDTAHTVRYGSEHHPISNLSDLLYQGNVICVDGDSVPVESAKADGLDAVARVGVAAADHRGIVCDRHVFRII  
 QHWHLAGEPDPFYDPLNDYVILPTAFEIEKYHEKHGDITSVREDWEIISHRDESKRPAELPPMFNTLSASREGEDGSLEEAAQAT  
 IFVHPESKGRQHVEVRAVGVTHDG

>SGT\_Os | NP\_001052094.1 | Os04g0131900 [Oryza sativa Japonica Group]

MASAAEEAKGVEEGGGASANGGDNPATATASASAAAAASSSPADDRGLPRSTMPGGINNVEITNETAGPSNLSRTER  
 RRQNNPADDPTKQLFDDKISLKKLEMLNRIATVKDDGTVVVDVPSLETSTTDGVAYDGYSDVTVEEPLDGADISVRPPMDIV  
 ILIVGTRGDVQPFIAIGKRLQDYGHRVRLATHANFKEFVLTAGLEFFPLGGDPKILAEYMVKNKGFLPSGPSEIPIQRKQMKIIFS  
 LLPACKEPDPTGIPKVDAILANPPAYGHTHVAEALKVPIHIFTMPWTPTSEFPPLSRVKQAAGYRLSYQIVDSMIWLGIRD  
 MINEFRKKLKLRPVTYLSGAQSGNDIPHGYIWSPHLVPKPKDWGPKIDVVGFCDLSDASNYVPEPLVKWLEAGDKPIYVGF  
 GSLPVQDPAKMTEVIVKALEITGQRGIINKGWGGLGTLAEPKDFVYLLDNCPHDWLFLQCKAVVHHGGAGTTAAGLKAACPT  
 TIVPFFGDQPFWGDVRHARGVGPLPIVDQFSLQKLVDAINFMMEPKVKDनावेलकामेसेदगवसगवराफलरहलपस्राए  
 TAPQQTSSFLFLGPVSKCLGCS

>ASAT\_Os | NP\_001046772.1 | Os02g0454500 [Oryza sativa Japonica Group]

MATAVMDSEFGSLVKVSAAVWAAMFYARLAAASLRGAPRLAALLPVVALFCVVPFSTTTFRGCSAFFLSWLGVFKLLLLAA  
 GRGPLNPTHPLHHVFSASLPVKLRHLASAKPAKGVDPAPANESAAGKILVSGAVIPLIITYQFKNAMSRYLILLYTGHYIFSLQ  
 LLLAVVHGLIHGVLGMEPEPQVDRPYLASSLRDFWGRRWNLMPAILRPSVYRVRARLGDAAAGVLAFLVSLMHEAMFF  
 YIMWRPPSGEVTVFLLHGVTAAEAWWARHAGWWRPPRAAVPLTLAFVAGTGFWLFPPAMIKAGLDEMVLHECQGM  
 VAVMEQSGRWLAGATNLTFATR

>LCAT\_Hs | NP\_000220.1 | phosphatidylcholine-sterol acyltransferase precursor [Homo sapiens]

MGPPGSPWQWVTLGLLLPAAFPWLLNVLPHTTPKAELSNHTRPVILVPGCLGNQLEAKLDPDVVNWMCYRKTEDFF  
 TIWLDLNMFLPLGVDWCWIDNTRVYVNRSSGLVSNAPGVQIRVPGFGKYSVEYLDSSKLAGYLHTLVQNLVNNGYVRDET  
 VRA APYDWRLEPGQEEYRKLGLVEEMHAAYGKPVFLIGHSLGCLHLLYFLLRQPQAWKDRFIDGFISLGA PWGGSIKPMLVLAS  
 GDNQGIPISSIKLKEEQRITTTSPWMFPSRMAWPEDHVFISTPFSNYTGRDFQRFADLHFEEGWYMWLQSRDLLAGLPAP  
 GVEVYCLYGVGLPTPRTYIYDHGFYTDVPGVLYEDGDDTVATRSTELCGLWQGRQPQPVHLLPLHGIQHLNMVFSNLTL  
 LEHI NAILLGAYRQPPASPTASPEPPPE

>PLA2\_Hs | NP\_036452.1 | group XV phospholipase A2 precursor [Homo sapiens]

MGLHLRPYRVGLLPDGLLFLLLMLLADPALPAGRHPVVLVPGDLGNQLEAKLDPKPTVVHYLCSKKTESYFTIWLNLLELLPVII  
 DCWIDNIRLVYNKTSRATQFPDGVDRVPGFGKTFSLFLDPSKSSVGSYFHTMVESLVGWGYTRGEDVIRGAPYDWRRAPNE  
 NGPYFLALREMIEMYQLYGGPVVLVAHSMGNMYTLYFLQRQPQAWKDKYIRAFVSLGAPWGGVAKTLRVLASGDNNRIPV  
 IGPLKIREQQRSAVSTSWLLPYNYSPEKVFVQPTINYTLRDYRKFQDIFEDGWLMRQDTEGLVEATMPPGVQLHCLYG  
 TGVPTPDSFYYESFPDRDPKICFGDGDGTVNLKSALQCAWQSRQEHQVLLQELPGEHIEMLANATTLAYLKRVLGLP