



Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires,
Carrera de Lic. En Ciencias Biológicas

Tesis de Licenciatura

Función de la subunidad catalítica C2b de la fosfatasa de proteínas de tipo 2A en la respuesta molecular y bioquímica al estrés hídrico en plantas de papa.

Ignacio Yaconis

Director: Dra. María Noelia Muñiz García

Noviembre

2024

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres”. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. INGENI-CONICET.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'IYaconis'.

Ignacio Yaconis

Tesista

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. Noelia'.

Dra. María Noelia Muñiz García

Directora de Tesis

INDICE

Resumen	4
Introducción	5
1. Transducción de señales en plantas.....	5
2. Respuesta al estrés hídrico.....	6
3. Fosfatasas de proteínas.....	8
4. Fosfatasas de proteínas serina(Ser)/treonina(Thr) tipo 2 (PP2A).....	9
La subunidad A (PP2A-A).....	9
La subunidad B (PP2A-B).....	9
La subunidad C (PP2A-C).....	10
Holoenzima PP2A.....	10
5. <i>Solanum tuberosum</i>	11
Tuberización de la papa.....	11
6. PP2A en <i>Solanum tuberosum</i>	13
Funciones fisiológicas de PP2A en <i>Solanum Tuberosum</i>	15
Hipótesis y objetivos	17
Materiales y métodos	18
Material vegetal y condiciones de cultivo.....	18
Tratamiento de estrés hídrico.....	19
Determinación de prolina.....	19
Determinación de contenido de clorofila.....	19
Medición del contenido de almidón y azúcares.....	19
Determinación de actividad CAT y APX.....	20
Cuantificación de proteínas totales.....	20
Medición de expresión génica por RT-qPCR.....	21
Reacción de PCR en tiempo real.....	21
Análisis estadístico.....	21
Resultados	22
1. Contenido de prolina.....	22
2. Contenido de clorofila.....	23
3. Azúcares solubles y almidón.....	24
4. Actividad de las enzimas detoxificadoras de Ros Catalasa (CAT) y Ascorbato Peroxidasa (APX).....	26
5. Niveles de expresión de los genes StLEA27 y StTAS14.....	26
Discusión y Conclusión	28
Bibliografía	31

RESUMEN

La familia de fosfatasa de proteínas de tipo 2A (PP2A) desempeña un papel crucial en la transducción de señales en todas las células eucariotas. Las PP2As están involucradas en múltiples procesos fisiológicos en las plantas, abarcando respuestas a diversos estreses abióticos y mecanismos de defensa. Además, se ha determinado que las PP2As son mediadores centrales en las vías de señalización desencadenadas por varias hormonas vegetales.

Las PP2As están compuesta por tres subunidades distintas: una subunidad catalítica (C), una subunidad estructural (A) y una subunidad regulatoria (B). La holoenzima puede existir en dos formas: ya sea como un dímero compuesto por las subunidades C y A, o como un trímero que abarca las subunidades C, A y B. En la papa cultivada (*Solanum tuberosum*), se han caracterizado seis isoformas de la subunidad C de PP2A, tres genes que codifican subunidades A, y cuatro, once y tres genes que codifican subunidades B, B' y B'', respectivamente. El análisis fenotípico de plantas de papa transgénicas que sobre-expresan constitutivamente la subunidad catalítica C2b (StPP2Ac2b-OE) ha revelado un papel polifacético de PP2A en procesos fisiológicos vitales. Estos incluyen la inducción de la tuberización, la dinámica de la brotación de los tubérculos, la senescencia, la susceptibilidad a *Phytophthora infestans*.

A lo largo de su ciclo de vida, las plantas enfrentan distintas condiciones ambientales adversas. El estrés hídrico puede ser causado por sequía, generando un efecto de tipo osmótico, o por alta salinidad, dando lugar a un efecto osmótico combinado con toxicidad iónica. Las plantas son capaces de generar respuestas de aclimatación al estrés hídrico, que le permiten sobrevivir bajo esta condición. Resultados del grupo, sugieren que *StPP2Ac2b* cumpliría una función en la regulación de las respuestas de aclimatación al estrés hídrico en plantas de papa. Para evaluar esta hipótesis, en este trabajo se estudió la respuesta de las plantas StPP2Ac2b-OE al estrés hídrico. Se encontraron respuestas alteradas en la acumulación de prolina (que actúa como osmoprotector), cambios en el contenido de clorofila y carotenoides, así como una variación en el contenido y perfil de hidratos de carbono. Sin embargo no se encontraron alteraciones significativas en la activación de enzimas detoxificadoras de ROS (CAT y APX). Los resultados indican que StPP2Ac2b dispara cambios en la respuesta metabólica, bioquímica y molecular a salinidad, estrés osmótico y ácido abscísico en plantas de papa. Esto refuerza el rol de PP2A en la organización de las vías de transducción de señales en condiciones de estrés por déficit hídrico. Más aun, los altos niveles de prolina junto con la inducción de *StLEA27* y *StTAS14*, en condiciones de no-estrés en las plantas StPP2A-OE, implica un rol de PP2A como regulador positivo de la respuesta adaptativa al déficit de agua en plantas de papa.

El trabajo compilado en esta Tesis de Licenciatura forma parte de la publicación:

The phosphatase 2A gene family in *Solanum tuberosum*: Roles in salt and osmotic stress responses. Martina Zubillaga¹, Ignacio Yaconis¹, Juan I. Cortelezzi, Daniela A. Capiati*, María N. Muñiz García*

¹ ambos autores contribuyeron equitativamente al trabajo

*autores para correspondencia

El manuscrito está en revisión para su publicación en **Theoretical and Experimental Plant Physiology (TXPP, IF 2.2)**, desde el envío del manuscrito original el 10 de mayo de 2024 y de la versión revisada en 4 de octubre de 2024.

INTRODUCCION

1. Transducción de señales en plantas

Como organismos sésiles las plantas a lo largo de su ciclo de vida deben enfrentar amplias y frecuentes variaciones en las condiciones ambientales e interacciones con otros organismos. La percepción de señales relacionadas con estos estímulos y estreses juega un papel crucial en la asignación de recursos de la planta, lo cual se ve reflejado en la gran plasticidad fenotípica que poseen y garantiza su supervivencia. Señales ambientales como la temperatura, el espectro de luz incidente, la disponibilidad de agua y las concentraciones iónicas del suelo, entre otras, son percibidas simultáneamente e integradas por diferentes partes de la planta.

Durante el proceso de transducción de señales en las plantas, desde la percepción de los estímulos ambientales hasta la respuesta a ellos (Figura 1), se dan procesos específicos altamente regulados como:

- La percepción de la señal, que implica la activación de receptores/sensores específicos para la misma.
- La transducción, que implica la respuesta del receptor/sensor ante la percepción de la señal, produciendo segundos mensajeros intracelulares.
- La transducción y la respuesta de las células receptoras a los mensajeros intercelulares conducen a cambios fisiológicos, bioquímicos y funcionales, los cuales se reflejan finalmente en la respuesta y adaptación de las plantas a los estímulos ambientales.
- La amplificación e integración de las señales, que está dada por la transmisión intercelular de los segundos mensajeros, que amplía la intensidad de la señal, pero también dispara la convergencia de la percepción de múltiples estímulos en vías de transducción centrales, que permite a las plantas dar una respuesta global a un ambiente complejo y cambiante.

La percepción de señales ambientales se produce en todo momento por receptores/sensores distribuidos por toda la célula, que inician una cascada de señalización mediada por hormonas, y segundos mensajeros. Los segundos mensajeros son pequeñas moléculas sintetizadas o liberadas de manera transiente y concentrada, que expanden la magnitud de la señal e integran vías a diferentes niveles por intermediarios y componentes comunes. Los iones de calcio (Ca^{+2}) son uno de los segundos mensajeros más importantes (Dodd *et al.* 2010). La transducción de la señal continua hasta alcanzar al efector, el cual depende de la célula blanco y puede implicar un cambio fisiológico directo (como sería un cambio en la actividad de una enzima, por ejemplo) o indirecto (si se trata de por ejemplo un factor de transcripción, el cual a su vez será el responsable de cambios en la expresión de múltiples genes blanco). La integración de las señales por el sistema de transducción y la llegada del estímulo a diferentes tejidos garantiza que las respuestas puedan actuar de forma sinérgica o antagónica en diferentes etapas del ciclo de vida de la planta (Trewaras y Malho 1997).

2. Respuesta al estrés hídrico

El estrés hídrico afecta diferentes funciones en la planta, siendo uno de los principales procesos afectados la transpiración, la cual se reduce para evitar la pérdida de agua y desecación de la planta (Wu *et al.* 2022). Esta disminución en la transpiración afecta negativamente la fotosíntesis y fijación de carbono, ya que al reducir la transpiración también se reduce el intercambio gaseoso

Mecanismos moleculares de respuesta al estrés abiótico

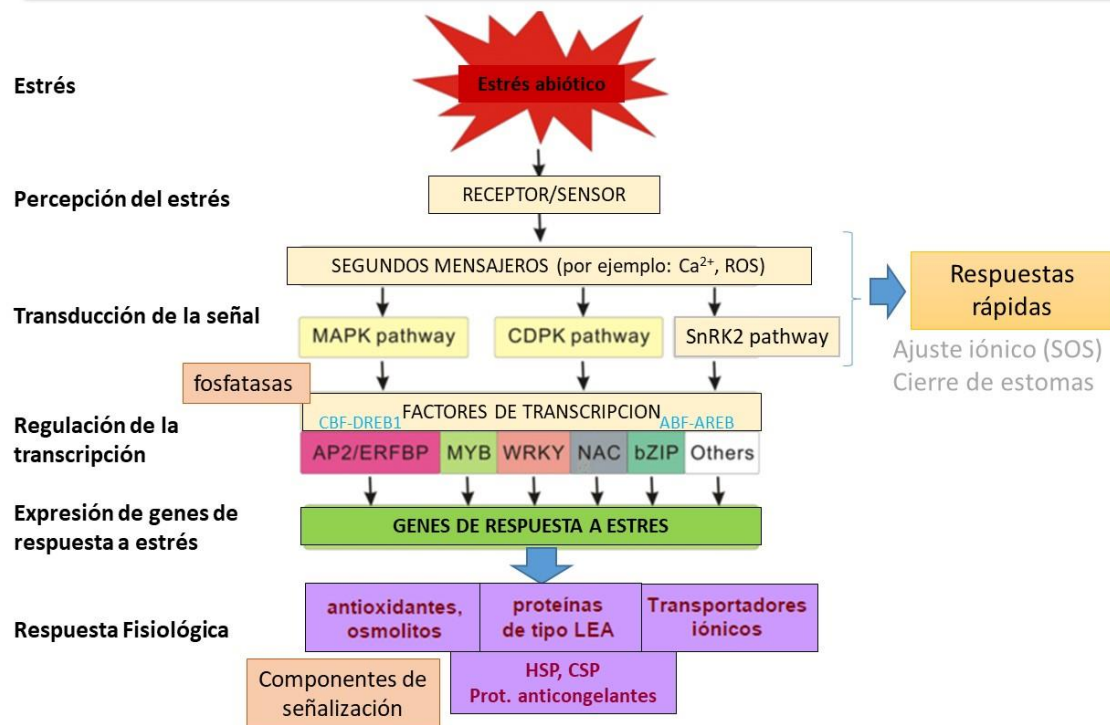


Figura1. Mecanismos moleculares involucrados en la cascada de señalización general en respuesta a estrés abiótico. La señal de estrés es percibida por sensores que activan complejas cascadas de señalización intracelular, incluyendo la generación de segundos mensajeros y cascadas de fosfoproteínas. Las vías de señalización resultan en la activación de factores de transcripción y la expresión de genes de respuesta a estrés cuyos productos contribuyen directa o indirectamente a aumentar la tolerancia al estrés, así como la modulación de la actividad de efectores directos. Esquema adaptado de Wang *et al.* 2016.

de CO_2 y O_2 . Si el estrés persiste en el tiempo se producen cambios en el crecimiento y estructura de la parte aérea, para optimizar el agua disponible, y en la raíz, la cual ve favorecido su crecimiento y cambia su arquitectura en búsqueda de suelo con mayor contenido de agua (Wu *et al.* 2022). Como puede verse la respuesta al estrés hídrico implica grandes cambios en la utilización de los recursos de la planta y suelen ser contrarios al crecimiento normal de la misma, por esto es crucial para una planta poder detectarlo y adaptarse al mismo.

Las raíces perciben cambios de estrés mecánicos en la membrana plasmática por la pérdida en la turgencia y el descenso en el potencial osmótico del suelo (Gorgues *et al.* 2022; Kuromori *et al.* 2022) debido al bajo contenido de agua en el mismo. Por su parte, la parte aérea es capaz de detectar la humedad relativa del aire a través de los estomas, cerrando los mismos para reducir la transpiración (Driesen *et al.* 2020). La respuesta al estrés hídrico puede diferenciarse en dos tipos, una respuesta a corto plazo y otra respuesta a largo plazo. El ácido abscísico (ABA por sus siglas en inglés) es una hormona que cumple un rol crucial en ambas respuestas. Ante un incremento en la tasa de transpiración los estomas se cierran estabilizando la pérdida de agua (Mott y Parkhurst, 1991). La respuesta a corto plazo ocurre en las hojas e implica cambios rápidos en la concentración citoplasmática de ABA por medio de su liberación desde el retículo endoplasmático por la hidrólisis del ácido abscísico-éster de glucosa (ABA-GE por sus siglas en inglés), una forma inactiva de ABA, por medio de la enzima β -glucosidasa (Lee *et al.* 2006). En la célula de la guarda el ABA promueve la activación de canales aniónicos que provocan la salida de aniones, despolarizando la membrana plasmática, lo que activa canales de potasio, que lo

bombear fuera del citosol, provocando la salida de agua, pérdida de turgencia y el cierre del estoma (Buchanan *et al.* 2015).

La respuesta a largo plazo implica adaptaciones en el metabolismo y perfil de expresión de la planta. Uno de estos cambios es la síntesis de-novo y acumulación de ABA (Thomas y Frank 2019), aumentando la expresión de su vía de síntesis principalmente en raíces incrementando su conductancia hidráulica (Thompson *et al.* 2007), para luego transportarse por xilema hasta la parte aérea, donde en células de la guarda y el mesófilo también se produce un incremento en la síntesis de-novo (McAdam y Brodribb 2018).

El calcio regula de manera directa o indirecta la mayoría de los procesos fisiológicos de las plantas, principalmente como segundo mensajero activando quinasas dependientes de calcio (CDPKs), que a su vez afectan la expresión y actividad de genes y proteínas (Kudla *et al.* 2010). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son otro componente clave en la señalización del estrés hídrico. Los cloroplastos y las mitocondrias son las principales fuentes de ROS en las plantas. El incremento de estos compuestos durante el estrés afecta los procesos metabólicos normales de la célula particularmente en los fotosistemas y mitocondria. Las ROS reducen la eficiencia de los fotosistemas I y II, disminuyendo la concentración de NADP⁺ y aumentando el uso de O₂ como aceptor de electrones. En las mitocondrias, un proceso similar ocurre durante la transferencia de electrones en la cadena respiratoria, donde algunos electrones se filtran, provocando la formación de O₂⁻ (Dietz 2016; Pospíšil 2012). Las ROS también pueden actuar como moléculas mensajeras mitigando los efectos del propio estrés. Incrementos en la concentración de H₂O₂ (la forma más común de ROS) regulan positivamente la expresión del sistema de defensa anti-oxidativo, regular la movilización de calcio y la fosforilación de proteínas (Jalmi y Sinha 2015; Demidchik y Shabala 2017; Buchanan *et al.* 2015). El resultado final de estas cascadas de señales son cambios en el desarrollo al cambiar el perfil de expresión de genes que le permitan adaptarse a las condiciones adversas.

Las moléculas orgánicas pequeñas como los osmolitos (entre ellos la prolina, el manitol y el pinitol) pueden formar muchos puentes de hidrógeno con el agua. Mediante estas interacciones, logran reducir el potencial hídrico de la célula y mantener el gradiente de potencial en la planta, lo que ayuda a conservar su capacidad de transpirar y absorber la escasa agua disponible en el suelo. Otro efecto negativo de la pérdida de agua en la célula es la desnaturalización de proteínas, al perder la capa de moléculas de agua que rodean a las proteínas y estabilizan sus estructuras, estas se desnaturalizan. Los osmoprotectores son capaces, mediante puentes de hidrógeno, de estabilizar la capa de agua que rodea las proteínas y de esta manera prevenir su desnaturalización (Liang *et al.* 2013; Singh *et al.* 2015; Buchanan *et al.* 2015).

Al incrementar los niveles de ROS también se incrementa la expresión de las vías de detoxificación de ROS. La detoxificación puede ocurrir por vías enzimáticas o no enzimáticas que involucran enzimas y compuestos que no se distribuyen uniformemente y que varían entre los compartimentos subcelulares (Buchanan *et al.*, 2015). Las vías no enzimáticas constan de compuestos capaces de interactuar con ROS y ser oxidados. Entre los principales antioxidantes no enzimáticos se encuentran el ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutatión reducido (GSH) y carotenoides (Buchanan *et al.* 2015;). Las vías enzimáticas catalizan la transformación de las especies ROS a otras menos reactivas, hasta llegar a la forma H₂O₂. Catalasa (CAT), y ascorbato peroxidasa (APX) son dos de las principales antioxidantes enzimáticos, estas catalizan uno de los últimos pasos en la detoxificación, la conversión de H₂O₂ a H₂O (Figura 2). APX utiliza ácido ascórbico (vitamina C) como donador de electrones (Shigeoka *et al.* 2002). CAT cataliza la conversión H₂O₂ sin intervención de otros compuestos (Buchanan *et al.* 2015; Willekens *et al.* 1997).

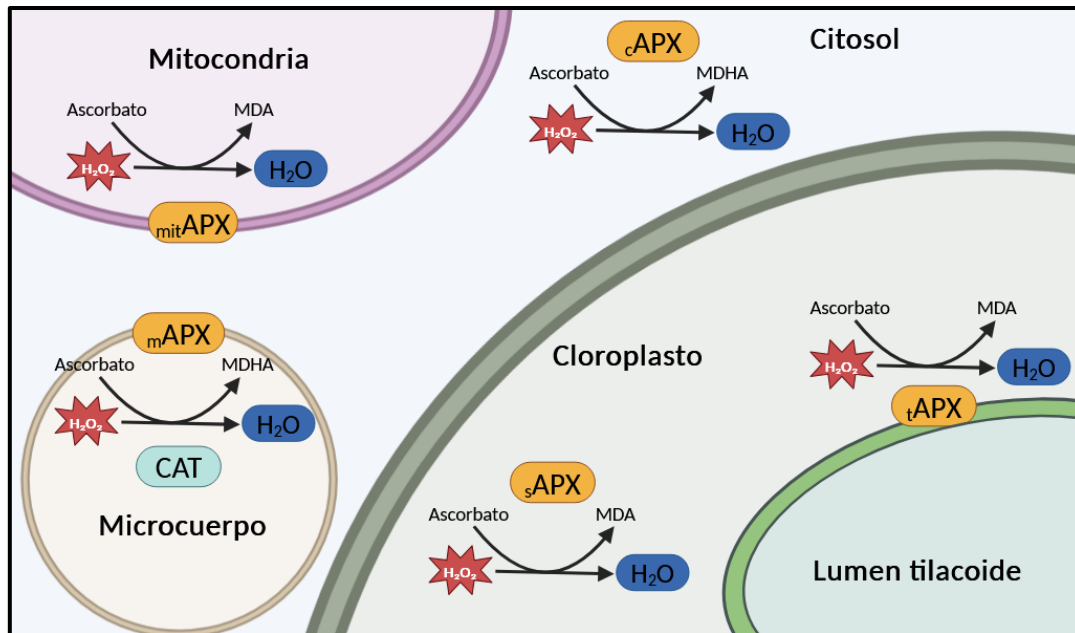


Figura 2. Vías de detoxificación de H_2O_2 y su localización en células vegetales por las enzimas APX y CAT. Figura adaptada de Shigeoka *et al.*, (2002).

3. Fosfatasa de proteínas

Como ya se mencionó la fosforilación de proteínas es una modificación post-traducciona reversible que forma parte de las vías de señalización y respuestas de las plantas. La fosforilación ocurre principalmente en tres aminoácidos polares, conocidos como sitios canónicos de fosforilación, serina (Ser), triptófano (Thr), y tirosina (Tyr). La presencia o ausencia de grupos fosfato presente en estos aminoácidos, y por consiguiente su carga positiva, produce cambios conformacionales en las proteínas. Estos cambios conformacionales pueden alterar una amplia variedad de parámetros en las proteínas afectadas como cambiar actividades enzimáticas, afinidad a otros compuestos, inducir la traslocación o degradación y permitir la interacción con otras proteínas. De esta manera pueden regularse los mecanismos de percepción de estímulos y transducción de señales en las células (Luan 2003). Por esto las fosfatasa cumplen un rol crítico en las vías de señalización por medio de la desfosforilación. La fosforilación reversible representa un nivel de regulación post-traducciona y evidencia el papel fundamental de las proteínas fosfatasa en la modulación de las respuestas a estrés.

En eucariotas las proteínas quinasa derivan de un ancestro común, en cambio, las proteínas fosfatasa poseen varios orígenes evolutivos independientes, por lo que presentan una variedad de estructuras, sitios y mecanismos catalíticos (Farkas *et al.* 2007; Denu y Dixon 1998; Brautigan 2013; Das *et al.* 1996). Las fosfatasa pueden dividirse según su mecanismo catalítico en fosfatasa de fosfoproteínas (PPP), fosfatasa de proteínas metalo-dependientes (PPM), fosfatasa de tirosina proteica (PTP), y fosfatasa dependientes de aspartato. A su vez las fosfatasa pueden dividirse según el aminoácido al cual desfosforilan (Figura 3):

- Fosfatasa específicas de serina (Ser) / treonina (Thr) (**STP**): comprenden a las familias PPP y PPM, pese la ausencia de homología de secuencia estas familias de proteínas poseen una estructura y mecanismo catalítico similar el cual utiliza un residuo de cisteína activo (Farkas *et al.* 2007; Brautigan 2013; Das *et al.* 1996).

- Fosfatasa de tirosina proteica (**PTP**): poseen un dominio catalítico sin homología de secuencia con las STP, requiriendo de iones Fe^{+2} y Mg^{+2} en su catálisis (Denu y Dixon 1998; Das *et al.* 1996) y desfosforilan residuos Tyr específicamente.
- Fosfatasa de dual especificidad (**DsPTPs/DSPs**): desfosforilan residuos de Ser, Thr y Tyr mediante la formación de intermediarios aspartil-fosfato dependiente de Mg^{+2} (Brautigan 2013).

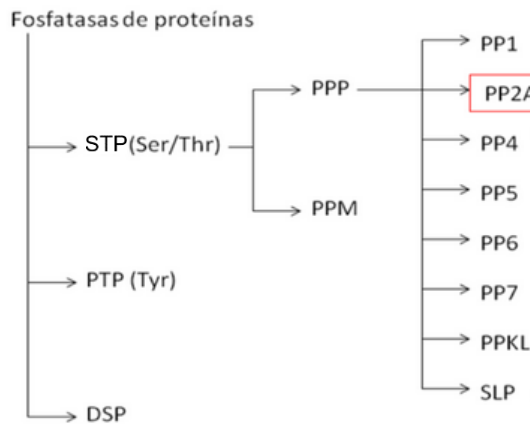


Figura 3. Clasificación de las fosfatasa de proteínas en plantas. Se recuadra la subfamilia PP2A, tema de la presente tesis, perteneciente a la familia PPP de fosfatasa de proteínas de serina (Ser) /treonina (Thr) (STP).

4. Fosfatasa de proteínas serina (Ser)/treonina (Thr) tipo 2 (PP2A)

Dentro de las fosfatasa de fosfoproteínas (PPP) encontramos fosfatasa de proteínas serina/treonina tipo 2A (PP2A, Figura 2). Las PP2A son holoenzimas compuestas por 3 subunidades ABC: subunidad A que funciona de andamio, una subunidad B determinante de sustrato y localización celular subdividida en tres subfamilias: B, B' y B'', y una subunidad C catalítica (PP2Ac) (Virshup 2000; Janssens y Goris 2001). Cabe notar que a diferencia de animales en plantas los linajes de subunidades de PP2A presentan una divergencia evolutiva reciente (Booker y DeLong, 2017). El alto número de genes de PP2A en plantas comparado a animales y su expresión en todos los tejidos de la planta indican la expansión funcional y diversificación de este tipo de fosfatasa en plantas, que refleja la importancia de la regulación por fosforilación/desfosforilación en su fisiología.

La subunidad A (PP2A-A)

Esta subunidad funciona como andamio de la holoenzima, mediante sus interacciones con las subunidades B y C. Consta de 15 repeticiones de dominios HEAT (cada uno formado por 39 aminoácidos, conformando un par de α -hélices antiparalelas). Los motivos HEAT 2 a 8 están asociados a la interacción con la subunidad B, mientras que los dominios 11 a 15 se relacionan a la interacción con la subunidad C. La superposición en los sitios de unión de las isoformas de ambas subunidades implica que la unión de una isoforma excluye mutuamente a las otras (Groves *et al.* 1999). La unión de los 15 motivos HEAT forma una estructura continua y curvada, similar a una "herradura", compuesta en su totalidad por α -hélices. Esta estructura le otorga a la subunidad A cierta flexibilidad, lo que resulta crucial en la interacción con las subunidades B y C en la cara cóncava de la herradura (Xu *et al.* 2006; Groves *et al.* 1999; Cho y Xu 2007).

La subunidad B (PP2AB)

Conocida como la subunidad regulatoria, determina el sustrato y localización celular de la holoenzima (Máthé *et al.* 2023). En plantas, se conservan las familias B, B' y B'', las cuales

presentan poca homología entre sí y están compuestas por múltiples miembros, cuya cantidad varía según la especie de planta (Liu *et al.* 2014; Máthé *et al.* 2023). La familia B contiene múltiples repeticiones del dominio WD40, cada uno de aproximadamente 40 aminoácidos (Farkas *et al.* 2007). Los miembros de la familia B' poseen una región central de la proteína, particularmente los dominios ASBD1 and ASBD2, asociados a la interacción con el dinero AC por medio de interacciones con el extremo N-terminal de la subunidad A. En cambio, las regiones N-terminal y C-terminal son altamente variables (Li y Virshup 2002). La familia B'' también posee estos dominios altamente conservados ASBD1 y ASBD2, a su vez contiene los motivos EF-hand, de unión a Ca⁺² (Leivar *et al.* 2011).

La subunidad C (PP2AC)

La subunidad C es la subunidad con actividad catalítica de la PP2A y se agrupan según la homología de sus secuencias en dos subfamilias, I y II (Casamayor *et al.* 1994; He *et al.* 2004; País *et al.* 2009a). La estructura de la subunidad C posee una forma elipsoidal compacta similar a las fosfatasas PP1 (Cho y Xu 2007). El sitio activo de PP2Ac incluye bucles proteicos conectados a dos hojas-β centrales. En estos bucles, seis residuos altamente conservados (Asp57, His59, Asp85, Asn117, His167 y His241) quelan de manera estable dos iones metálicos catalíticos. Estos iones son comunes a todas las STPs (Gou *et al.* 2014). El extremo C-terminal de este dominio catalítico contiene motivos conservados entre las subunidades catalíticas de las fosfatasas del tipo PP2A, PP4 y PP6 (Lyons *et al.* 2021).

Holoenzima PP2A

El alto número de isoformas de subunidades de PP2A, que permite las numerosas combinaciones de la holoenzima, es responsable de las múltiples formas de localización, uso de sustratos y funciones de la holoenzima. Análisis computacionales indican que los aminoácidos altamente conservados en las subunidades A, B y C no son determinantes en la composición final de la holoenzima (Lyons *et al.* 2021). Nuestra comprensión sobre las interacciones internas y estructura de la holoenzima PP2A en plantas proviene, en su mayoría, de estudios realizados en su homólogo en humanos. La unión de la subunidad A con la subunidad C formando el dinero AC, la unión de las subunidades induce cambios conformacionales sustanciales en la estructura tridimensional en los motivos HEAT de la subunidad A (Xu *et al.* 2006; Cho *et al.* 2007) y estabiliza la conformación activa de la subunidad C, incrementando su actividad fosfatasa (Wu *et al.* 2017). Los detalles de la interacción entre la subunidad B y la subunidad A han sido elusivos para los investigadores, sin embargo, su interacción con la subunidad C es más comprendida. Las interacciones entre las subunidades B y C resultan en un entorno fisicoquímico completamente diferente comparado al sitio activo de la subunidad C por si sola (Xu *et al.* 2006).

Las modificaciones post-traduccionales poseen un rol importante en la conformación de la holoenzima PP2A, la metilación de la cola C-terminal de la subunidad C es un paso crucial para el reclutamiento de la subunidad B al dímero AC (Lyons *et al.* 2021; Rasool *et al.* 2014). La metilación del grupo carboxilo C-terminal de la subunidad C elimina la carga negativa sin cambios en la estructura del resto de la subunidad. En ausencia de la metilación se produce repulsión carga-carga entre el grupo carboxilo C-terminal cargado negativamente y la región ácida de la subunidad A (Wu *et al.* 2017; Xu *et al.* 2006).

La diversidad de posibles holoenzimas PP2A se refleja en la amplia gama de procesos biológicos en los que participan, demostrando su importancia en el desarrollo y adaptación no solo de las plantas, sino que en todas las células eucariotas. En plantas, actúan como reguladores críticos de los programas de desarrollo (Spinner *et al.* 2013; Máthé *et al.* 2023) y de la dinámica del citoesqueleto (Yoon *et al.* 2018); participan activamente en las vías de señalización de varias

hormonas (Pernas *et al.* 2007; Tang *et al.* 2011; Zhu *et al.* 2021), en la respuesta a las rizobacterias promotoras del crecimiento (Averkina *et al.* 2020).

5. *Solanum tuberosum*

La papa (*Solanum tuberosum*) es la hortaliza de mayor importancia a nivel global, siendo el tercer cultivo en importancia mundial luego del trigo y el arroz (FAOSTAT, 2016). Su consumo, tradicional en Argentina, se encuentra en los 40,8 kg/habitante por año (Dirección de producción agrícola, 2023). De entre todas las especies de papa, las más importantes a nivel comercial son aquellas 200 especies capaces de tuberizar, crucial para su propagación vegetativa a gran escala por medio de “tubérculos semilla”. Estas comprenden un grupo de subespecies tetraploides ($2n=4x=48$). En Argentina la variedad de mayor producción es *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* (L.) *Spunta*. De origen holandés se destaca por tener altos rendimientos y buenas cualidades comerciales

La planta de papa posee un sistema aéreo herbáceo formado por hojas compuestas, tallos, inflorescencias y frutos, y un sistema subterráneo compuesto raíces, estolones y tubérculos (Figura 4, arriba). Los tubérculos de papa son tallos modificados y tienen todas las características de un tejido caulinar, el extremo basal del mismo está unido al estolón que lo conecta con el resto de la planta durante el crecimiento. El sistema radicular se concentra en los primeros 40 cm de profundidad lo que lo vuelve sensible a sequías y requiere alta concentración de nutrientes en la parte superior del suelo (Huarte y Capezio 2013).

El ciclo de vida de la papa tiene una duración relativamente corta, de entre 70 y 150 días desde la siembra hasta la madurez. Sus etapas de desarrollo (Figura 4, abajo) se describen a menudo en términos de brotación del tubérculo (I), desarrollo vegetativo (II), iniciación del tubérculo (III), engrosamiento del tubérculo (IV) y, finalmente, senescencia de la planta (V) (Huarte y Capezio 2013; Obidiegwu *et al.* 2015).

Tuberización de la papa

Como ya se mencionó la tuberización es un proceso crítico en el ciclo de vida de la papa, al tratarse de un mecanismo de supervivencia y reproducción vegetativa, motivo por el cual, está altamente coordinado a nivel genético, bioquímico, fisiológico y ambiental. De particular impacto son la temperatura, fotoperiodo, nitrógeno en el suelo, azúcares y hormonas.

La temperatura óptima de crecimiento de los tubérculos se encuentra entre 15 y 25 °C, temperaturas más altas inhiben la tuberización (Timlin *et al.* 2006). Respecto al fotoperiodo, los días cortos inducen la tuberización en todas las variedades de papa (Rodríguez-Falcón *et al.* 2006). La importancia de este estímulo en la regulación varía según la variedad de papa, dado que cada especie presenta un grado de requerimiento diferencial de este estímulo para tuberizar. Las especies silvestres presentan una dependencia estricta del fotoperiodo de día corto para tuberizar, lo mismo ocurre en la variedad cultivada *andígena*. Otras variedades como *Spunta*, no son fotoperiódicas estrictas, siendo este factor solo un modulador del proceso.

La giberelina (GA) es la hormona esencial para el crecimiento de los estolones, y la disminución de sus niveles es requisito para el comienzo de uno de los primeros indicios visibles del proceso de tuberización: el engrosamiento subapical del estolón. Este engrosamiento inicia con la pérdida de dominancia apical en el crecimiento, cesando las divisiones celulares longitudinales e incrementando la división transversal en la región subapical (Xu *et al.* 1998a, b). Al cesar las divisiones longitudinales las células comienzan a dividirse con planos aleatorios, aumentando el

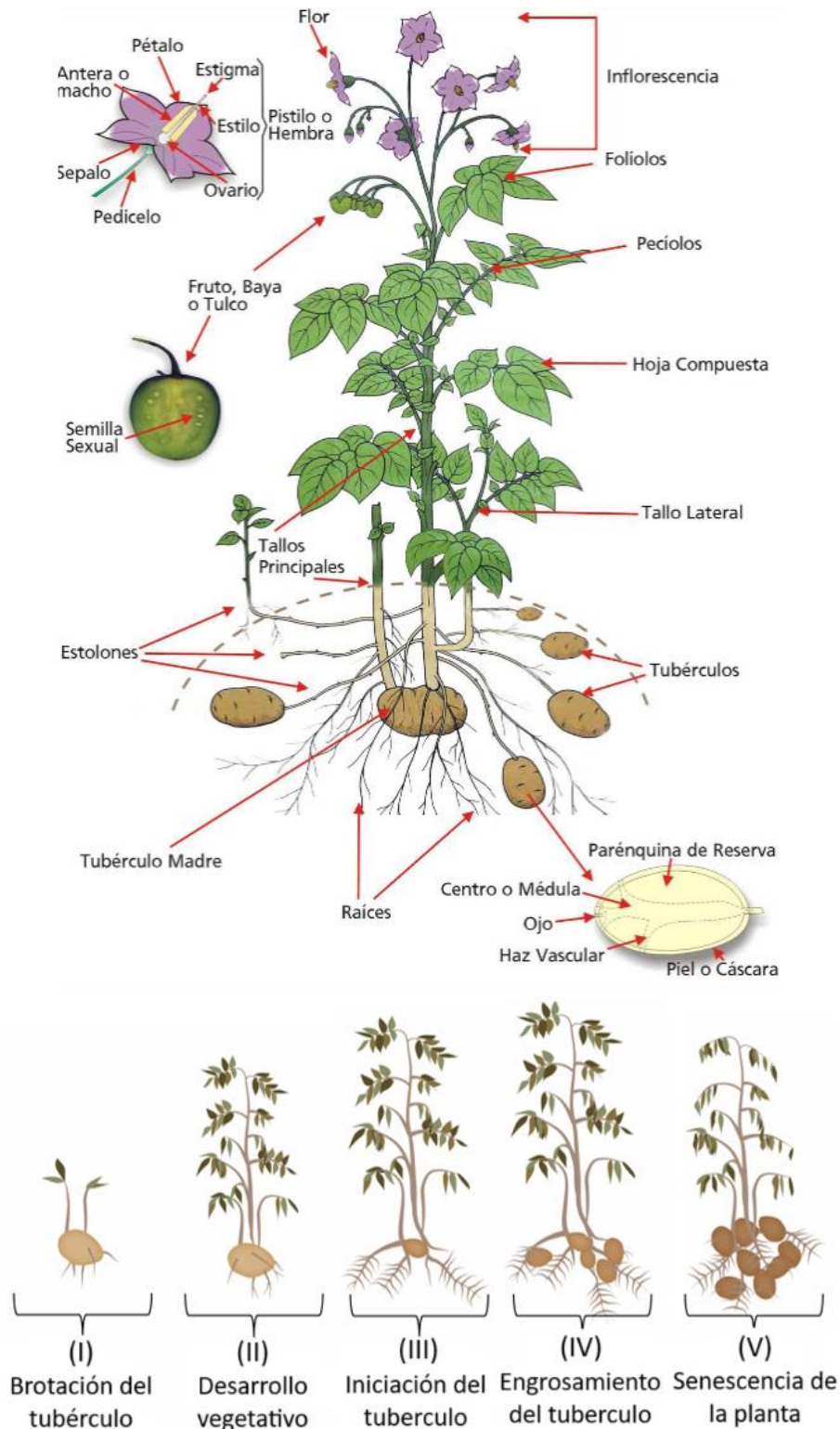


Figura 3. Características de la planta de papa (*Solanum tuberosum*). Arriba, Esquema de la planta de papa *Solanum tuberosum* L, donde se indican las diferentes estructuras anatómicas de la planta (tomado de FAOSTAT). Abajo, las etapas del ciclo de vida de la planta de papa. (Figura adaptada de Obidiegwu *et al.* 2015).

tamaño del tubérculo hasta finalizar su crecimiento (Rodríguez-Falcón *et al.* 2006). Otras hormonas relacionadas al crecimiento de tubérculos son auxinas, citoquininas y ABA. Las primeras dos están relacionadas a los cambios y promoción del crecimiento durante el desarrollo

del tubérculo (Rodríguez-Falcon et al. 2006). Si bien ABA se considera promotora de tuberización, al inhibir la elongación del estolón y sus niveles aumentan durante la tuberización, su acción no es directa ya que su síntesis no es necesaria para inducir el proceso, sino que su acción se da como por consecuencia de su actividad antagonista a GA (Xu et al. 1998a).

6. PP2A en *Solanum tuberosum*

En nuestro laboratorio, anteriormente se identificaron seis subunidades catalíticas de StPP2A: *StPP2A-C1*, *C2a*, *C2b*, *C3*, *C4* y *C5* (País et al. 2009a). No se habían estudiado en *S. tuberosum* hasta el momento los genes de las subunidades A y B de StPP2A, por lo que con el objetivo de identificar estos genes se realizó un análisis exhaustivo de la versión más reciente del genoma (Pham et al. 2020). Este análisis reveló la presencia de tres genes *StPP2A-A*, cuatro genes *StPP2A-B*, 11 genes *StPP2A-B'* y tres genes *StPP2A-B''* (como se resume en la Figura 5 y Tabla 1, resultados aún no publicados). A través de predicciones bioinformáticas de localización subcelular utilizando WoLF PSORT, se determinó la ubicación de las diferentes isoformas. Si bien se encontraron distintas localizaciones para las subunidades (Tabla 1), las proteínas StPP2A-C, StPP2A-A2 y A3 se localizaron predominantemente en el citosol, StPP2A-A1 en la membrana plasmática y StPP2A-B principalmente en el núcleo. Las proteínas StPP2A-B' y StPP2A-B'' presentaron una localización más variable.

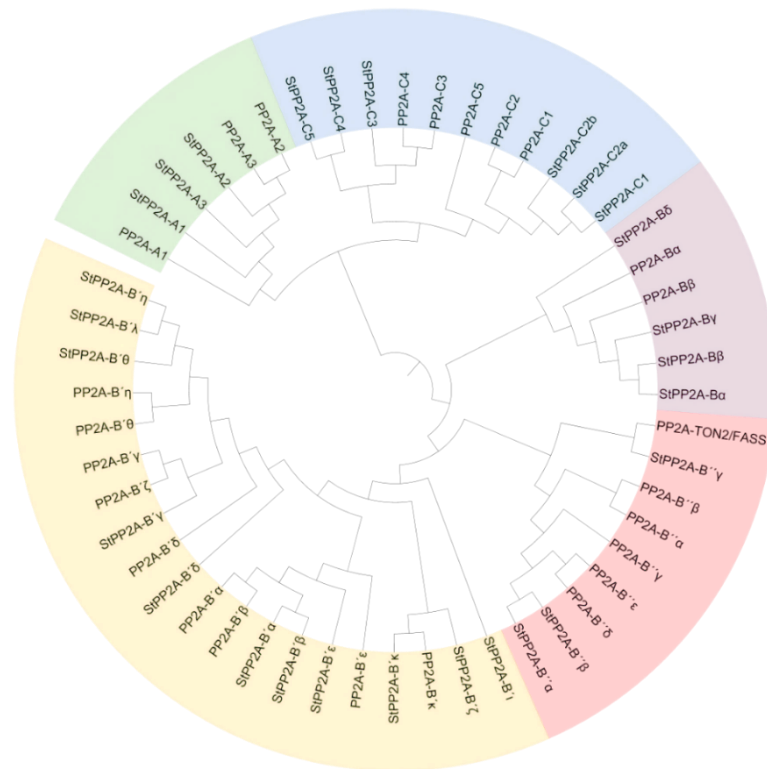


Figura 5. Árbol filogenético de las subunidades PP2As de *Solanum tuberosum* (*StPP2As*) y *Arabidopsis thaliana* (*AtPP2As*). Todas las secuencias proteicas fueron alineadas con el software de alineamiento múltiple de secuencias y se construyó un árbol filogenético no enraizado usando el software iTOL.

Nombre	ID del transcrito	Cromosoma	AA	LOC
StPP2A-C1	Soltu.DM.05G008870.1*	5	308	Citosol
	Soltu.DM.05G008870.2		351	Citosol
	Soltu.DM.05G008870.3		304	Citosol
StPP2A-C2a	Soltu.DM.01G010360.1*	1	303	Citosol
	Soltu.DM.01G010360.2		276	Citosol
StPP2A-C2b	Soltu.DM.04G000130.1	4	278	Citosol
	Soltu.DM.04G000130.2		306	Citosol
	Soltu.DM.04G000130.3*		306	Citosol
StPP2A-C3	Soltu.DM.01G028660.3*	1	312	Citosol
StPP2A-C4	Soltu.DM.01G013460.1*	1	306	Citosol
	Soltu.DM.01G013460.2		287	Citosol
StPP2A-C5	Soltu.DM.01G001500.1	1	313	Citosol
	Soltu.DM.01G001500.2		276	Citosol/Golgi
	Soltu.DM.01G001500.3		207	Citosol
Membrana plasmática				
StPP2A-A1	Soltu.DM.04G001870.1	4	632	Membrana plasmática
	Soltu.DM.04G001870.2*		949	Membrana plasmática
StPP2A-A2	Soltu.DM.05G002820.1	5	587	Citosol
StPP2A-A3	Soltu.DM.06G025160.1*	6	581	Citosol
	Soltu.DM.06G025160.2		581	Citosol
Núcleo				
StPP2A-B α	Soltu.DM.03G036140.1	3	518	Núcleo
	Soltu.DM.03G036140.2		557	Citoesqueleto
	Soltu.DM.03G036140.3*		517	Núcleo
StPP2A-B β	Soltu.DM.12G009710.1*	12	516	Núcleo
	Soltu.DM.12G009710.2		516	Núcleo
	Soltu.DM.12G009710.3		617	Núcleo
StPP2A-B γ	Soltu.DM.06G022760.1	6	432	Núcleo
StPP2A-B δ	Soltu.DM.06G022760.1	6	515	Núcleo
	Soltu.DM.06G022760.2*		494	Núcleo
Mitocondria				
StPP2A-B' α	Soltu.DM.09G005170.1	9	415	Núcleo/Mitocondria
StPP2A-B' β	Soltu.DM.10G024460.1	10	492	Mitocondria
	Soltu.DM.10G024460.2*		492	Mitocondria
	Soltu.DM.10G024460.3		498	Citosol
StPP2A-B' γ	Soltu.DM.07G016320.1	7	545	Mitocondria
StPP2A-B' δ	Soltu.DM.03G000130.1	3	287	Mitocondria
StPP2A-B' ϵ	Soltu.DM.05G026210.1	5	475	Mitocondria/Núcleo
StPP2A-B' ζ	Soltu.DM.12G024760.1	12	451	Citosol
StPP2A-B' η	Soltu.DM.02G010680.1	2	524	Mitocondria/Núcleo
StPP2A-B' θ	Soltu.DM.05G010730.1	5	392	Citosil/Mitocondria
StPP2A-B' ι	Soltu.DM.01G051340.1	1	446	Mitocondria
StPP2A-B' κ	Soltu.DM.06G019700.1	6	498	Núcleo
StPP2A-B' λ	Soltu.DM.02G033860.1*	2	520	Núcleo/Mitocondria
	Soltu.DM.02G033860.2		424	Mitocondria
Núcleo				
StPP2A-B'' α	Soltu.DM.04G006950.1*	4	539	Núcleo
	Soltu.DM.04G006950.2		539	Núcleo
	Soltu.DM.04G006950.3		539	Núcleo
StPP2A-B'' β	Soltu.DM.05G025530.1*	5	539	Citosol
	Soltu.DM.05G025530.2		539	Citosol
	Soltu.DM.05G025530.3		539	Citosol
	Soltu.DM.05G025530.4		540	Citosol
StPP2A-B'' γ	Soltu.DM.01G022380.1*	1	478	Núcleo/Citosol

Tabla1. Subunidades de StPP2A identificadas en *Solanum tuberosum*. Cromosoma: localización cromosomal; AA: número de aminoácidos; LOC: localización subcelular predicha; *: variante de splicing más abundante.

Funciones fisiológicas de PP2A en *Solanum tuberosum*.

Como ya hemos mencionado, existe una amplia gama de procesos biológicos en los que participan las PP2A. Nuestro grupo desde hace varios años ha estudiado el rol de PP2A en *S. tuberosum*. La expresión de los genes correspondientes a la subfamilia I es regulada positivamente ante estrés salino y exposición a elicitores fúngicos, y negativamente por GA (un inhibidor de tuberización). En particular se observó que la expresión de la isoforma *StPPAc2b* incrementaba en hojas de plantas sometidas a tratamientos inductores de tuberización (País *et al.*, 2009a; b), por lo que, se decidió profundizar en el estudio de esta isoforma particular y su rol en el proceso. Estudios con plantas que sobre-expresan *StPP2Ac2b* (*StPP2Ac2b*-OE) confirmaron un rol positivo de esta isoforma en la inducción de la tuberización (Muñiz García *et al.* 2017), debido a una alteración en la vía de GA. *StPP2Ac2b* también está involucrado en la regulación de la brotación de los tubérculos (Muñiz García *et al.* 2022), siendo un regulador negativo del proceso, posiblemente por un mecanismo similar al ya mencionado, asociado a los bajos niveles de GA. Sabemos también que *StPP2Ac2b* tiene un efecto promotor de la senescencia en hojas una vez iniciado el proceso y en la respuesta al patógeno *Phytophthora infestans*, promoviendo la inducción de genes relacionados a defensa y senescencia (Muñiz García *et al.*, 2022b).

PP2A se encuentra involucrada en la regulación del metabolismo de azúcares en plantas de papa. Los tubérculos *StPP2Ac2b*-OE presentan niveles alterados de azúcares reductores, sacarosa y glucosa que reflejan un desbalance fuente-sumidero en tubérculos y brotes durante el almacenamiento en frío, aumentando la fuerza de sumidero de los brotes (Muñiz García *et al.* 2022a).

Con respecto al estrés hídrico en particular, los primeros estudios, mostraron que la inducción de la respuesta a estrés por salinidad requiere de la actividad PP2A (Figura 6A; País *et al.* 2009a). En este mismo sentido, se observaron patrones de expresión diferenciales en condiciones de estrés y en diferentes tejidos en los genes correspondientes a las subunidades catalíticas, sugiriendo un posible rol en la modulación de la señalización en estas condiciones (Figura 6B, País *et al.* 2009a; b). Este aumento en la tasa transcripcional se vio reflejado en un aumento en los niveles proteicos de las PP2Ac (Figura 6C, País *et al.* 2009a), reforzando la idea de un rol de PP2A en la regulación de la respuesta a este estrés. Al estudiar *in vivo*, el rol de las PP2A en el estrés abiótico, observamos que las líneas *StPP2Ac2b*-OE (L1, L4 y L7) poseen una mayor sensibilidad al estrés hídrico en ensayos en macetas en invernadero (Muñiz García *et al.* 2023). Se observó una pérdida más rápida de agua en hojas y una respuesta alterada al ABA (Figura 6D, E respectivamente; Muñiz García *et al.* 2023). La principal explicación fue por una alteración en el desarrollo de las hojas, particularmente el desarrollo de los estomas (Muñiz García *et al.* 2023), siendo estos más grandes, pero con menor densidad en las hojas junto con una menor sensibilidad a ABA que determina una mayor pérdida de agua. Sin embargo, se requiere más información acerca de la respuesta a los componentes del estrés hídrico para entender el rol de la fosfatasa en la modulación de la respuesta.

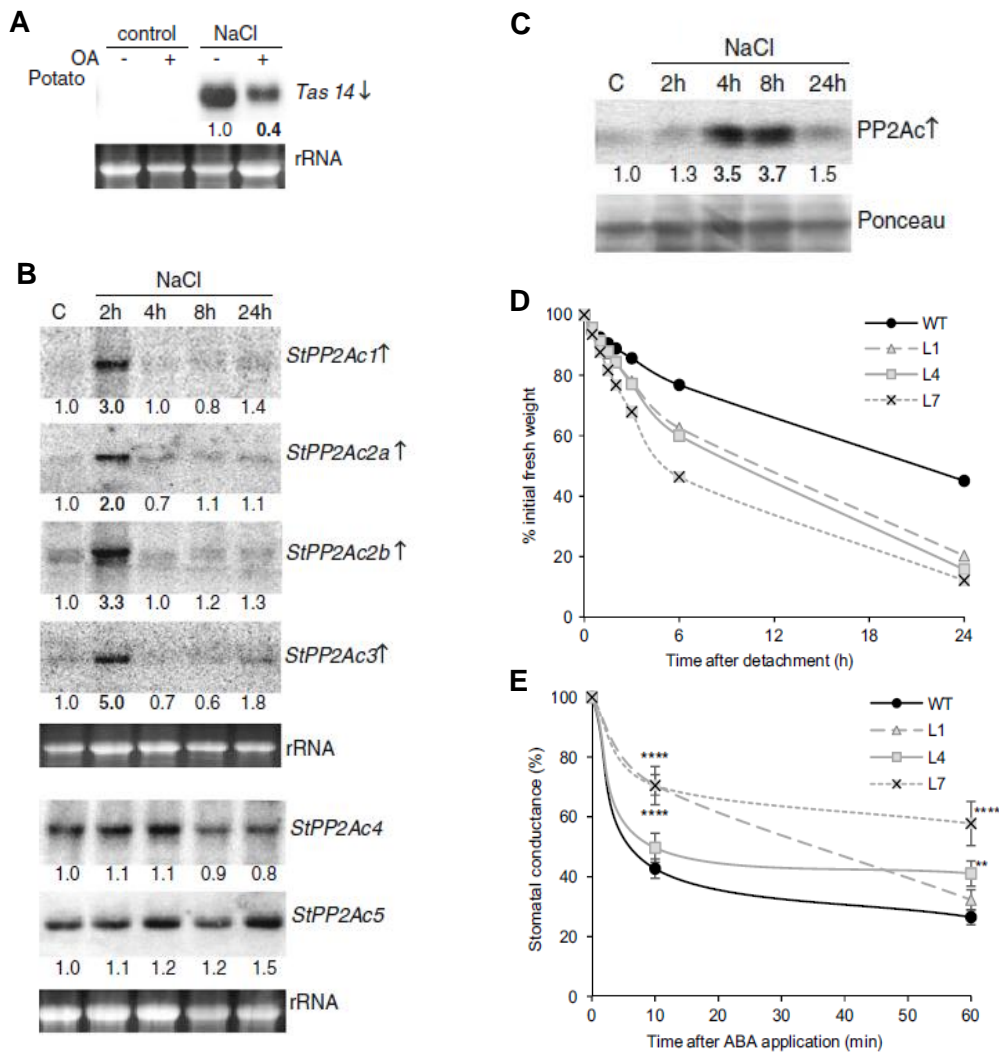


Figura 6. PP2A en la respuesta a estrés hídrico. Resultados previos del grupo indican que inhibidores de la actividad PP2A limitan la inducción de genes de respuesta a estrés salino como *Tas14* (A) y las subunidades catalíticas (en particular las isoformas de la subfamilia I) estarían involucradas en la respuesta a salinidad ya que su abundancia aumenta tanto a nivel transcripcional (B) como proteico (C) en respuesta a este estrés. Experimentos usando plantas sobre-expresan la subunidad c2b de la StPP2A (L1, L4 y L7) presentan una mayor tasa de pérdida de agua en hojas (D) y una respuesta alterada a ABA (E). Todos los paneles fueron tomados de Pais *et al.* 2009a (A, B, C) y Muñoz García *et al.* 2023 (D y E).

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Evidencias fisiológicas y moleculares del grupo indican que StPP2Ac2b podría regular la respuesta al estrés hídrico. Si esto es cierto, las plantas StPP2Ac2b-OE presentarán diferencias en distintos parámetros moleculares y bioquímicos en respuesta a estrés osmótico y salino.

En este sentido los objetivos de este trabajo de Tesis de Licenciatura pretenden estudiar la respuesta a estrés hídrico de plantas StPP2Ac2b-OE y salvajes (WT), a partir de la evaluación de los siguientes parámetros moleculares y bioquímicos:

1. Acumulación de prolina
2. Contenido de carotenoides y clorofila (total y la relación entre clorofila a y clorofila b)
3. Contenido de almidón, glucosa y sacarosa
4. Actividad de las enzimas detoxificadoras de ROS catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX)
5. Niveles de expresión de los genes *StLEA27* y *StTAS14*

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal y condiciones de cultivo

Se trabajó con plantas de papa (*Solanum tuberosum*) de la variedad Spunta. Se utilizaron 3 líneas independientes de plantas transgénicas (L1, L4 y L7) que sobre-expresan constitutivamente el gen *StPP2Ac2b* bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de coliflor (*StPP2Ac2b*-OE) (Figura 7). L4 es morfológicamente similar al tipo silvestre, mientras que las diferencias morfológicas entre L1 y L7 y el tipo silvestre son más marcadas. L1 y L4 contienen tres copias del transgén, mientras que L7 es un transformante de copia única. L1, L4 y L7 derivan de eventos de integración independientes y presentan expresión de la subunidad c2b en todos sus tejidos (Muñiz García *et al.*, 2017). Como control, se utilizaron plantas sin transformar, pero obtenidas mediante el mismo método de regeneración (WT). Las plantas fueron micropropagadas *in vitro* en medio Murashige y Skoog (MS; Prod no. M519, PhytoTechnology Laboratories, Shawnee Mission, KS, USA) conteniendo 2% (p/v) de sacarosa, solidificado con 0.7% (p/v) de agar. Las plantas se cultivaron bajo un fotoperiodo de 16 h de luz, con una intensidad de 5000 lux, a 22°C.

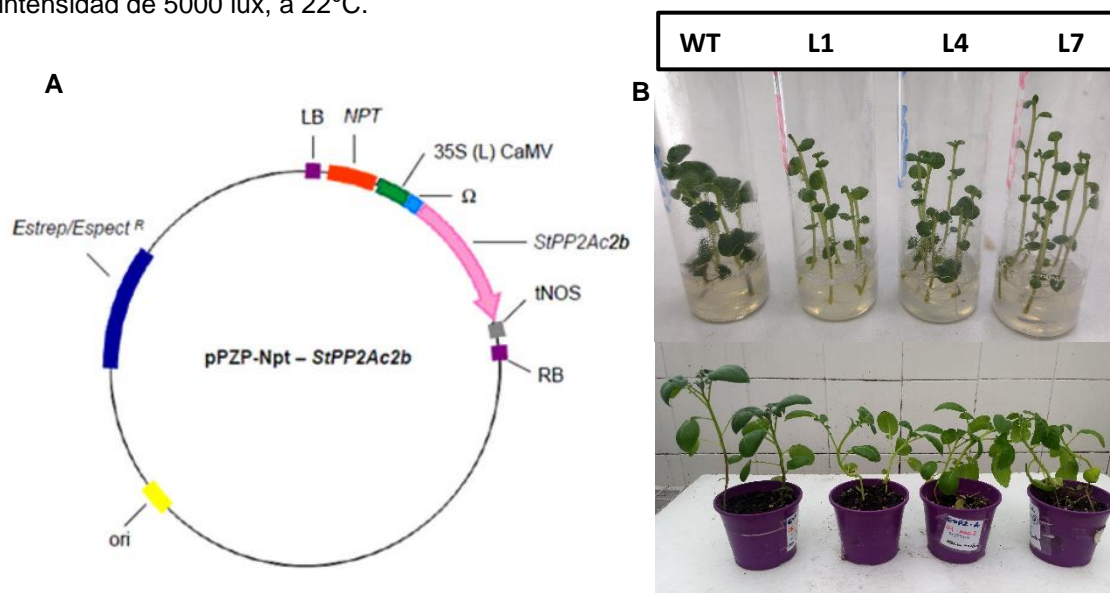


Figura 7: A) Esquema de la construcción realizada para la sobreexpresión de *StPP2Ac2b* en plantas de papa. Vector binario pPZP-Npt conteniendo el cassette [35S (L) CaMV - Ω - *StPP2Ac2b* - tNOS]. *StPP2Ac2b*: secuencia codificante completa de *StPP2Ac2b*. Ampicilina R: gen que confiere resistencia al antibiótico ampicilina. Estrep/Espect R: gen que confiere resistencia a los antibióticos estreptomina y espectinomicina. ori: origen de replicación bacteriano. 35S (L) CaMV: versión extendida del promotor 35S del Virus del Mosaico del Coliflor. Ω: secuencia potenciadora de la traducción del Virus del Mosaico del Tabaco. tNOS: secuencia terminadora de la transcripción de la nopalina sintetasa. LB: borde izquierdo del ADN-T. RB: borde derecho del ADN-T. NPT: gen que codifica para la neomicina fosfotransferasa y confiere resistencia al antibiótico kanamicina. Adaptado de la Tesis de Licenciatura de Lic. Luciana Mazzocchi. **B)** Imagen representativa de las diferentes líneas y el WT en condiciones normales de crecimiento *in vitro* (arriba) o en macetas en invernadero (abajo), en ambas fotos orden de izquierda a derecha: WT – L1 – L4 – L7 (*StPP2Ac2b*-OE).

Tratamientos de estrés hídrico

Plantas obtenidas *in vitro* a partir de ápices fueron cultivadas en medio MS sólido (2% sacarosa) por una semana para permitir el desarrollo de raíces. Luego se transfirieron a medio MS líquido

(2% sacarosa) y se crecieron por otra semana. Las plantas fueron tratadas con NaCl 150 mM (estrés salino), manitol 260 μ M (estrés osmótico) o ácido abscísico (ABA) 50 μ M por 24 h. Luego de los respectivos tratamientos, las hojas o plantas completas fueron pesadas y se congelaron en nitrógeno líquido para ser utilizadas en las posteriores determinaciones.

Determinación de prolina

Se determinó por el método de Bates *et al.* (1973) modificado. Las muestras se disgregaron en morteros con nitrógeno líquido, se resuspendieron con 200 μ L de agua destilada por 50mg de tejido. La resuspensión fue colocada en un tubo eppendorf, los cuales se incubaron en agua hirviendo a 100°C por 30 min y se centrifugaron 10 min a 18000g. Se tomaron 100 μ L del sobrenadante, colocándolo en un nuevo tubo eppendorf y se mezcló con 100 μ L de buffer citrato de sodio (pH 4.6) 0.2 M, luego se hizo reaccionar con 400 μ L de ninhidrina 1% (p/v) preparada en ácido acético:agua (3:2) por 45 min a 100 °C en baño de agua hirviendo, frenando la reacción en hielo. La mezcla de reacción se extrajo con 800 μ L de tolueno y se midió la absorbancia a 515 nm por triplicado. La concentración de prolina se determinó a través de una curva de calibración de prolina.

Determinación del contenido de clorofila

El contenido de clorofila (clorofila A, clorofila B y clorofila total) y el contenido total de carotenoides se determinaron espectrofotométricamente a partir de absorbancias. Se disgregaron plantas enteras en mortero con nitrógeno líquido, luego se homogenizaron en acetona 80% (v/v) (1 mL por 10 mg de tejido) y se centrifugaron a 3000g por 5 min. Se midió la absorbancia a 663, 645 y 480 nm por duplicado. El contenido de clorofilas se calculó mediante las siguientes fórmulas (modificación de Arnon 1984):

$$\text{Clorofila A (ug/g FW)} = (12.7 \times A_{663}) - (2.69 \times A_{645}) \text{ V/FW}$$

$$\text{Clorofila B (ug/g FW)} = (20.9 \times A_{645}) - (4.68 \times A_{663}) \text{ V/FW}$$

$$\text{Clorofila total (ug/g FW)} = (20.2 \times A_{645}) + (8,02 \times A_{663}) \text{ V/FW}$$

El contenido total de carotenoides se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Carotenoides (mg/g FW)} = [A_{480} + (0.114 A_{663}) - (0.638 A_{645})] \text{ V/1000 FW}$$

donde V es el volumen total de extracción y FW es el peso fresco (mg) de la muestra extraída.

Medición del contenido de almidón y azúcares

Se realizó la extracción de azúcares de una muestra correspondiente a 10 mg de peso fresco de tejido en 100 μ L de etanol 80% v/v. La extracción se realizó durante 90 min a 70 °C en estufa. Se centrifugó a 2000g y se determinó la concentración de glucosa y sacarosa presentes en el sobrenadante como se detalla a continuación. A partir del pellet se determinó el contenido de almidón de los tubérculos.

- **Contenido de glucosa:** Se midió glucosa con el kit para la determinación de glucemia (Wiener Lab, Argentina) basado en el método de la glucosa oxidasa. Se utilizaron 10 μ L de muestra y las determinaciones se realizaron por duplicado.
- **Contenido de sacarosa:** Para determinar la sacarosa, se utilizó el método de glucosa oxidasa/invertasa descrito en Teixeira *et al.* (2012), aunque la glucosa se determinó con el kit para la determinación de glucemia (Wiener Lab, Argentina). El contenido de

sacarosa fue determinado como la diferencia entre la glucosa basal y la liberada tras el tratamiento con invertasa (Sigma), la cual se supone, libera toda la glucosa que se encuentra como sacarosa en la muestra. Se utilizaron 10µl de muestra y las determinaciones se realizaron por duplicado.

- **Contenido de almidón:** A partir de la fracción no soluble en etanol, obtenida luego de la extracción de azúcares, se realizó la extracción de almidón. Para esto, se lavó el pellet con 1 mL de etanol 80% v/v y se incubó a 90 °C por 20 min, se centrifugó a 2000g por 10 minutos y se repitió el lavado utilizando 1 ml de etanol 80 % v/v. El pellet se secó a temperatura ambiente. Se determinó el contenido de almidón del tubérculo como se describe en Stritzler *et al.* (2017), utilizando 1 ml HCl 1 M durante la hidrólisis, pero la glucosa fue finalmente determinada con el kit para la determinación de glucemia de Wiener Lab (Argentina), con el método de glucosa oxidasa. Se utilizaron 2-5 µl de muestra y las determinaciones se realizaron por triplicado.

Determinación de actividad CAT y APX

La extracción de las enzimas del tejido (200 mg) se realizó mediante homogenización en mortero con nitrógeno líquido, en 2 mL de buffer fosfato de potasio 0.2M pH 7. Se centrifugaron las muestras a 15000g por 15 min a 4°C. El sobrenadante se conservó para la determinación de la actividad CAT y APX. Las actividades de CAT y APX se midieron en términos de la descomposición de H₂O₂ y ascorbato, respectivamente.

La descomposición del H₂O₂ por la CAT se determinó por la medida de la tasa de disminución de la absorbancia a 240 nm por 1 min (Aebi, 1984). La reacción se llevó a cabo en 0.5 mL de una solución 10 mM H₂O₂ en 50 mM buffer fosfato de potasio (pH: 7.0), utilizando 12.5 µL del extracto. La actividad CAT se expresó como µmol de H₂O₂ descompuesta ($\epsilon = 39.4 \text{ M/cm}$) por minuto por mg de proteína.

La actividad APX se midió por la disminución de la absorbancia del ascorbato a 290 nm ($\epsilon = 2.8 \text{ mM/cm}$) durante 1 min (Kwon *et al.*, 2002). La reacción se llevó a cabo en 0.5 mL de una solución 0.5 mM H₂O₂, 0.5 mM ácido ascórbico en 50 mM buffer fosfato de potasio (pH: 7.0), utilizando 25 µL del extracto. La actividad APX se expresó como µmol de ascorbato descompuesto ($\epsilon = 2.8 \text{ mM/cm}$) por minuto por mg de proteína.

Las reacciones se iniciaron con el agregado del extracto (fuente de enzimas) y la rotación de las cubas para asegurar la homogenización. Las reacciones realizaron a 25 °C.

Cuantificación de proteínas totales.

La concentración de proteínas de las muestras se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976), empleando un lector de ELISA (VERSAmix ELISA microplate reader, Molecular Devices) a 595 nm para las lecturas de absorbancia. Se realizaron diluciones de las muestras y se preparó una curva de BSA (stock 10 mg/ml, BioLabs) abarcando un rango de concentraciones entre 0.05 y 6.00 µg/µL.

Se colocaron 200 µL de reactivo Bradford en placas de 96 *wells*, agregando 10 µL de las muestras a cuantificar, utilizando 10 µL de agua destilada como blanco.

Medición de expresión génica por RT-qPCR

Síntesis de ADNc por transcripción reversa

Se sintetizó ADNc utilizando la enzima transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina (M-MLV RT, Thermo). La síntesis se realizó según el siguiente protocolo:

- 5 µg de ARN, 0.5 µg de un *primer* oligo-(dT)₁₂₋₁₈ junto con 0.5 µg de *primers* hexámeros al azar (BioDynamics) y 1 µL de una mezcla de los cuatro dNTPs (*stock* 10 mM) se llevaron a un volumen de 12 µL con agua destilada estéril.
- Se incubó la mezcla de reacción a 70°C durante 5 min y luego se enfrió en hielo. Este paso permite desnaturalizar la estructura secundaria del ARN.
- Se agregaron 4 µL del *buffer* de reacción 5x provisto con la enzima, 2 µL de DTT 0.1 M y 1 µL (40 U) del inhibidor de ARNasas *RNaseOUT* (Invitrogen).
- Se agregó 1 µL (200 U) de la enzima M-MLV RT (Fermentas).
- Se incubó a 42°C durante 1 h y se inactivó la enzima por calentamiento a 70°C por 15 min. Las muestras se guardaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

Reacción de PCR en tiempo real

Para las reacciones de PCR en tiempo real se sintetizó ADNc como se indicó en la sección 1.1, usando oligo dT como oligonucleótido iniciador y 5 µg de ARN total como templado. Antes de iniciar el trabajo, el ADNc se diluyó con agua libre de ARNasas. Las reacciones se realizaron en un ciclador DNA Engine Opticon (BioRad), en 20 µL finales conteniendo 4 µL de mezcla para PCR en tiempo real (5XHOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus, Solis-Biodyne), 1 µL de una mezcla de primer FW y RV 2.5 µM y el volumen de ADNc correspondiente a 15 ng de RNA total.

Se utilizó el siguiente ciclo: 50°C/2 min (1 ciclo); 95°C/15 min (1 ciclo); 95°C/15 seg, 60°C/1 min, 72°C/30 seg (35-40 ciclos). El análisis de los datos se realizó utilizando el método $\Delta\Delta CT$ de expresión relativa.

Los primers utilizados se indican en la Tabla 2.

Gen		Primer FW	Primer RV
<i>StLEA27</i>	Gen codificante de proteína LEA (Charfeddine <i>et al.</i> , 2017)	TCAGTTGACCGACCAATACG	TGGTTGCAACACCAGTAAGG
<i>StTAS14</i>	Gen codificante de dehidrina (Charfeddine <i>et al.</i> , 2017)	TCGGTTATTGCTGCCAAAG	CTGTGAGTGCATTGAAGCTG
<i>EF1-α</i>	Gen de expresión constitutiva (Nicot <i>et al.</i> , 2005)	ATTGAAAACGGATATGCTCCA	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA

Tabla 2: Secuencia de los primers utilizados en las reacciones de RT-qPCR.

Análisis estadístico

Para todos los experimentos se realizarán al menos 3 réplicas biológicas (en cada ensayo se indicará el número de muestras). El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa Microsoft Excel, mediante la prueba “t de Student”. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

A fin de entender el rol de StPP2A en la respuesta metabólica, bioquímica y molecular de la planta de papa frente al estrés hídrico, se sometieron plantas sobre-expresan la subunidad c2b de la StPP2A (StPP2Ac2b-OE, líneas independientes L1, L4 y L7 descritas en Muñiz García *et al.* 2017) y WT (plantas WT, obtenidas por regeneración en la misma ronda de transformación), a diferentes tratamientos que emulan diversas condiciones y componentes del déficit hídrico: alta salinidad, estrés osmótico (utilizando manitol) y la aplicación de ABA, por 24h como se describe en Materiales y Métodos. Se analizó la respuesta de las distintas plantas frente a estos tratamientos a partir de la medición del contenido de prolina, clorofila y carotenoides, azúcares, enzimas detoxificadoras de ROS y la inducción de la expresión de genes marcadores de estrés.

1- Contenido de prolina

El ajuste osmótico es un mecanismo involucrado en la tolerancia al estrés por lo que se evaluó el contenido de prolina (una molécula osmoprotectora típica) en plantas StPP2Ac2b-OE y WT sometidas a los tratamientos (control, salinidad, estrés osmótico y ABA) por 24 h (Figura 8). Las líneas StPP2Ac2b-OE mostraron contenidos de prolina mayores a las plantas WT en condiciones normales de crecimiento (control; Figura 8). Se observaron aumentos del contenido de prolina para todas las plantas analizadas en respuesta a alta salinidad y ABA. No se observaron cambios significativos en los niveles de prolina para ninguna de las plantas evaluadas en respuesta al tratamiento con manitol (estrés osmótico).

Es interesante, que, en las condiciones de estrés evaluadas, no se observaron diferencias en el contenido de prolina de las líneas StPP2Ac2b-OE y las plantas WT. Es decir, que en condiciones de crecimiento normal (control), las plantas StPP2Ac2b-OE presentan niveles aumentados de prolina respecto de plantas WT, sin embargo estas diferencias desaparecen por los tratamientos aplicados. En salinidad y ABA, el aumento del contenido de prolina como respuesta al estrés, disipa las diferencias entre transgénicas y WT, sugiriendo una menor amplitud de respuesta en las plantas StPP2Ac2b-OE.

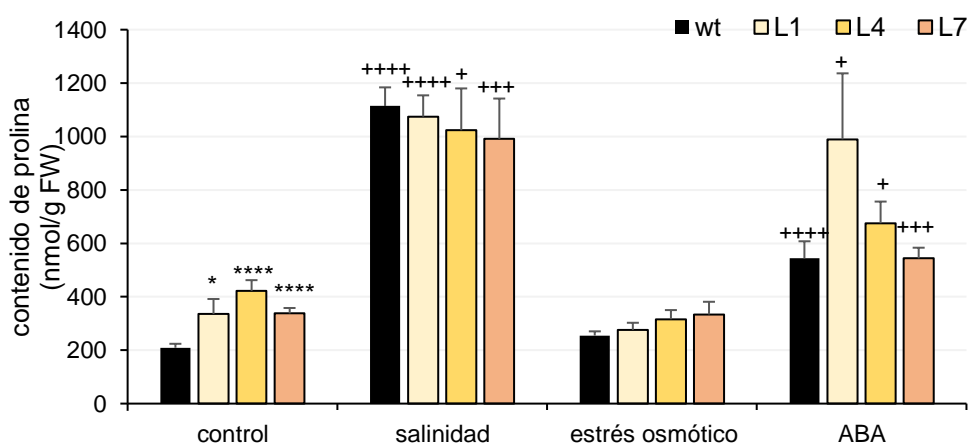


Figura 8. Contenido de prolina. Contenido de prolina determinado a partir de plantas enteras de las líneas StPP2Ac2b-OE (L1, 4 y 7) y plantas WT, tratadas con 150 mM de NaCl (estrés salino), 260 μ M de manitol (estrés osmótico) o 50 μ M de ABA durante 24 horas, como se describe en Materiales y Métodos. Se indica la media \pm error estándar de 6 experimentos independiente. Los asteriscos “*” y cruces “+” indican diferencias significativas. + = $p < 0.05$, +++ = $p < 0.005$, ++++ = $p < 0.001$ comparando con el control (sin tratamiento) de la línea; * = $p < 0.5$, **** = $p < 0.001$ comparando con el mismo tratamiento en la línea WT.

2. Contenido de clorofila

El estrés hídrico afecta negativamente el desarrollo de las plantas, afectando entre otros parámetros la eficiencia fotosintética y el contenido de clorofila. En este sentido, se evaluó el efecto de la alta salinidad, estrés osmótico y ABA en el contenido de clorofila y carotenoides. Al evaluar la respuesta de las plantas WT, podemos observar que la alta salinidad y el estrés osmótico, producen una disminución de los niveles de clorofila (Figura 9, barras negras). El tratamiento con ABA no produce efectos en el contenido de clorofila de estas plantas. En condiciones de crecimiento normal, las plantas StPP2Ac2b-OE tienen un menor contenido de clorofila a, b y total (la línea 4 muestra la misma tendencia aunque no son significativas las diferencias). En las plantas WT, las condiciones de estrés que reducen los niveles de clorofila reducen las diferencias con las líneas StPP2Ac2b-OE (Figura 9).

Estos resultados muestran que si bien los tratamientos de alta salinidad y estrés osmótico afectan negativamente el contenido de clorofila en plantas WT, en las StPP2Ac2b-OE los niveles de clorofila no se ven prácticamente afectados, lo que termina haciendo desaparecer las diferencias entre los genotipos. El tratamiento con ABA sin embargo, no afecta el contenido de clorofila para ninguna de las plantas analizadas, observándose el mismo perfil de baja clorofila en las plantas StPP2Ac2b-OE respecto de las WT. Estos resultados también muestran una respuesta basal activa al estrés hídrico en las plantas StPP2Ac2b-OE acompañada de una menor amplitud de respuesta frente a los tratamientos, como observamos en el caso del contenido de prolina.

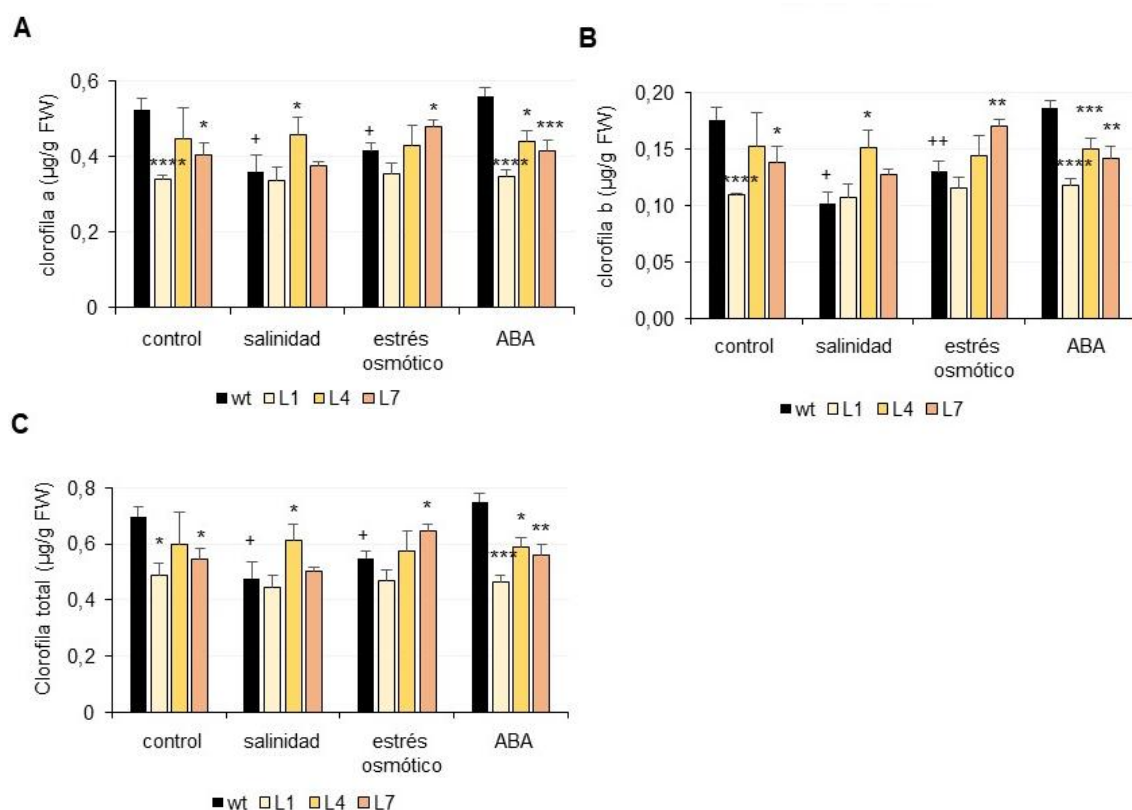


Figura 9. Contenido de clorofila. Se determinó el contenido de clorofila a (A), clorofila b (B), y clorofila total (C) en plantas enteras StPP2Ac2b-OE (L1, 4 y 7) y WT, tratadas con 150 mM de NaCl (salinidad), 260 μM de manitol (estrés osmótico) o 50 μM de ABA durante 24 horas, como se describe en Materiales y Métodos. Se indica la media \pm error estándar de 4 experimentos independiente. Los asteriscos "*" y cruces "+" indican diferencias significativas. + = p < 0.05, ++ = p < 0.01 comparando con el control (sin tratamiento) de la línea; * = p < 0.05, ** = p < 0.01, *** = p < 0.005, **** = p < 0.001 comparando con el mismo tratamiento en la línea WT.

Resultados similares se obtuvieron al evaluar el contenido de carotenoides en estas plantas (Figura 10). Las líneas StPP2Ac2b-OE presentan niveles reducidos frente a las WT en condiciones control y tratamiento con ABA. En este caso sólo la disminución en el contenido de carotenoides en plantas WT en respuesta a estrés osmótico resultó significativa, aunque la alta salinidad induce un perfil de respuesta similar. Las plantas StPP2Ac2b-OE presentan una menor respuesta en las condiciones de estrés evaluadas

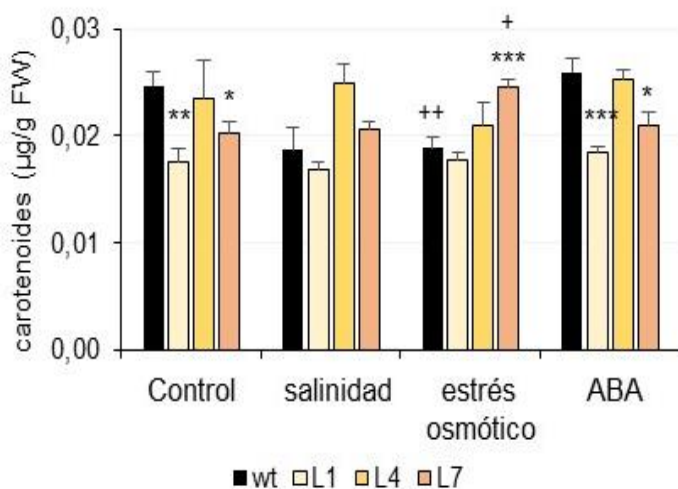


Figura 10. Contenido de carotenoides. Se determinó el contenido de en plantas enteras StPP2Ac2b-OE (L1, L4 y L7) y WT sometidas a tratamientos de estrés: 150 mM de NaCl (salinidad), 260 µM de manitol (estrés osmótico) o 50 µM de ABA durante 24 horas, como se describe en Materiales y Métodos. Se indica la media ± error estándar de 4 experimentos independiente. Los asteriscos “*” y cruces “+” indican diferencias significativas. + = p<0.05, ++ = p<0.01 comparando con el control (sin tratamiento) de la línea; * = p<0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.005, **** = p<0.001 comparando con el mismo tratamiento en la línea WT.

3. Azúcares solubles y almidón.

Los azúcares solubles juegan un rol importante en el mantenimiento de la homeostasis osmótica, y como molécula señal en la señalización del estrés, entre otros. Se estudió la respuesta metabólica al estrés a nivel de glucosa, sacarosa y almidón.

En condiciones control, no se encontraron diferencias significativas entre las plantas StPP2Ac2b-OE y WT, para ninguno de los hidratos de carbono analizados (Figura 11). El tratamiento de salinidad aumenta el contenido de sacarosa y almidón de las plantas WT (Figura 11). Las líneas StPP2Ac2b-OE presentan alteraciones en la respuesta, aunque estas no están del todo conservadas. L1 y L4 responden de manera similar a las plantas WT, aumentando los niveles de sacarosa (el aumento en L4 no es significativo). Sin embargo L7 no responde al tratamiento, presentando un contenido reducido de sacarosa en condiciones de alta salinidad (Figura 11). La respuesta alterada a salinidad es más clara al analizar el contenido de almidón, el cual no se ve modificado en las líneas PP2Ac2b-OE, y por tanto resulta disminuido respecto de las plantas WT en este tratamiento. De manera que también se observa una respuesta a salinidad reducida en las plantas transgénica con respecto a este parámetro.

El tratamiento con manitol, no afecta de manera significativa los niveles de los hidratos de carbono analizados en ninguna de las plantas.

La aplicación de ABA, aumenta el contenido de glucosa, sacarosa y almidón en las plantas WT. Las líneas StPP2Ac2b-OE presentan en líneas generales una menor respuesta que las plantas WT. Los niveles de glucosa si bien aumentan, las diferencias no son significativas con respecto a la condición control. Lo mismo sucede en el caso del almidón, donde solo la L7 presenta un aumento estadísticamente significativo con respecto al tratamiento control. La sacarosa sin embargo aumenta en L1 (de manera similar a las plantas WT) y en L7, pero los niveles de L4 y L7 se mantienen algo bajos respecto de los alcanzados por las plantas WT.

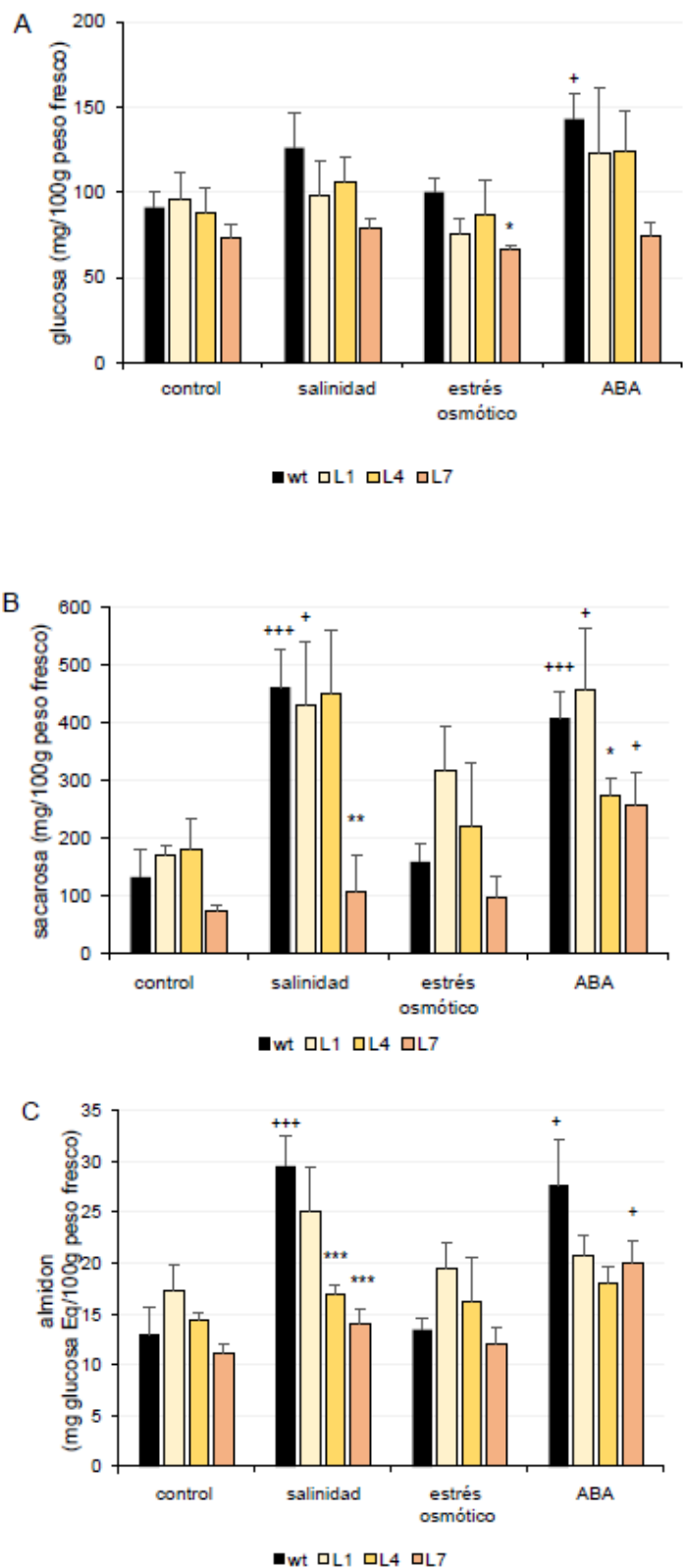


Figura 11: Contenido de **A)** Glucosa, **B)** Sacarosa y **C)** Almidón determinado a partir de la parte aérea de plantas StPP2Ac2b-OE (L1, L4 and L7) y WT. Las plantas de tipo WT y StPP2Ac2b-OE (L1, L4 y L7) cultivadas in vitro fueron tratadas con 150 mM de NaCl (estrés salino), 260 μ M de manitol (estrés osmótico) o 50 μ M de ABA durante 24 horas, como se describe en Materiales y Métodos. Barras de error correspondientes al error estándar (ES). Los asteriscos "*" y cruces "+" indican diferencias significativas. + = $p < 0.05$, ++ = $p < 0.01$, +++ = $p < 0.005$ comparando con el control (sin tratamiento) de la línea; * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.005$, **** = $p < 0.001$ comparando con el mismo tratamiento en la línea WT.

4. Actividad de las enzimas detoxificadoras de ROS Catalasa (CAT) y Ascorbato Peroxidasa (APX).

Como se menciona en la introducción, un componente esencial de la respuesta a estrés son las ROS. Se evaluó la actividad CAT y APX, como indicador de la activación de la respuesta de detoxificación inducida por estrés. No se encontraron diferencias significativas entre las plantas StPP2Ac2b-OE y las WT, en ninguna de las condiciones estudiadas, salvo en el caso de CAT en condiciones de salinidad, donde las líneas L1 y L4 presentaron niveles disminuidos de la enzima detoxificadora respecto de las plantas WT (Figura 12).

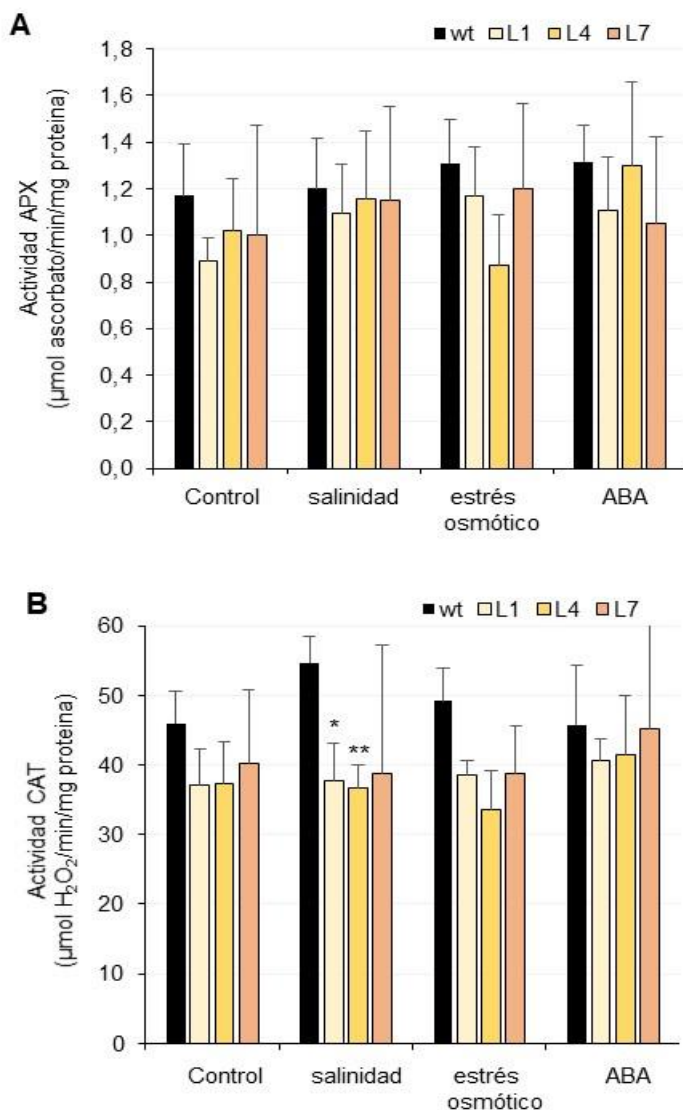


Figura 12. Efectos del estrés por déficit hídrico sobre la actividad de APX y CAT en plantas StPP2Ac2b-OE. Se determinó la actividad de **A)** APX y **B)** CAT en plantas enteras. Las plantas de tipo WT y StPP2Ac2b-OE (L1, L4 y L7) cultivadas *in vitro* fueron tratadas con 150 mM de NaCl (salinidad), 260 µM de manitol (estrés osmótico) o 50 µM de ABA durante 24 horas, como se describe en Materiales y Métodos. Barras de error correspondientes al error estándar (ES). Los asteriscos “*” indican diferencias significativas. * = p<0.05, ** = p<0.01, comparando con el mismo tratamiento en la línea WT.

5. Niveles de expresión de los genes StLEA27 y StTAS14

Los genes *StLEA27* (del grupo de las proteínas LEA) y *StTas14* (del grupo de las dehidrasas) exhiben inducción en las hojas de papa después de la exposición a la sequía y al estrés salino, lo que los establece como marcadores moleculares para la respuesta al estrés abiótico (Charfeddine et al. 2017) y han sido anteriormente utilizados en el laboratorio (Muñiz García et al. 2012; Muñiz García et al. 2011; Pais et al. 2009a). Se seleccionó StPP2Ac2b-OE L7 como línea representativa para determinar la expresión de ambos genes en respuesta al estrés por déficit hídrico por RT-qPCR. Ambos marcadores (*StLEA27* y *StTas14*) se encontraron

aumentados en condiciones normales de cultivo, en la línea L7 respecto de las plantas WT (Figura 13). Este hallazgo es concordante con lo observado en el contenido de prolina, clorofila y carotenoides, donde se observa una respuesta activa aún en condiciones de no-estrés, indicando un rol positivo de PP2Ac2b en la señalización de la respuesta a estrés.

En el caso de las plantas WT, la expresión de *StLEA27* aumenta en respuesta los tres tratamientos aplicados (Figura 13.A), mientras que L7 responde de manera muy similar en condiciones de alta salinidad y estrés osmótico, no encontrándose diferencias significativas entre las plantas. Sin embargo, en el caso de la respuesta a ABA de *StLEA27*, si bien se encontró un aumento significativo de los niveles de expresión del gen en las plantas WT, en la L7 no se observaron cambios, demostrando una vez más una respuesta más limitada a este tratamiento.

Con respecto a *StTas14*, las variaciones en la tasa de expresión de este gen no fueron muy amplias en las plantas WT, obteniéndose diferencias no significativas entre la condición control y los tratamientos. De manera similar la línea L7 tampoco presentó grandes variaciones, manteniendo niveles aumentados de expresión respecto a la planta WT en el mismo tratamiento de salinidad o ABA, como se observó en condiciones control (Figura 13B).

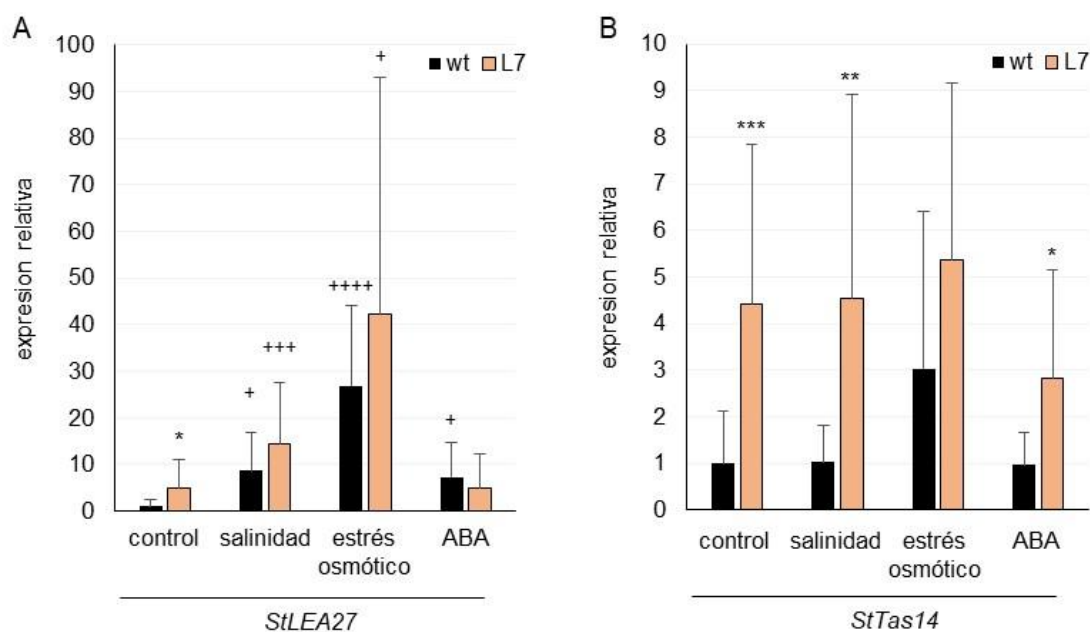


Figura 13. Efectos del estrés por déficit hídrico en la expresión de *StLEA27* y *StTas14*. Se determinaron los niveles de expresión (RT-qPCR) de los genes *StLEA27* y *StTas14* frente a condiciones control, alta salinidad, estrés osmótico y ABA. Se evaluaron plantas de tipo WT y la línea L7 StPP2Ac2b-OE. Se realizaron los tratamientos ya descritos (150 mM de NaCl, 260 μM de manitol o 50 μM de ABA durante 24 horas) utilizando plantas en cultivo *in vitro*. Barras de error correspondientes al error estándar (ES). Los asteriscos “**” y cruces “+” indican diferencias significativas. + = p<0.05, +++ = p<0.005, ++++ = p<0.001 comparando con el control (sin tratamiento) de la línea; * = p<0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.005, comparando con el mismo tratamiento en la línea WT.

DISCUSION Y CONCLUSION

A fin de entender el rol de StPP2A en la respuesta metabólica, bioquímica y molecular de la planta de papa frente al estrés hídrico, elegimos aplicar tratamientos que emulan diversas condiciones y componentes del déficit hídrico:

- **Salinidad:** La adición de NaCl (sal) aumenta la cantidad de osmolitos en el medio, incrementando el componente osmótico del potencial hídrico del medio. Este cambio dificulta la absorción de agua por las raíces. Además, la alta presencia de iones añade un componente tóxico al estrés, la concentración interna de estos iones en la planta se incrementa al ser absorbidos junto con el agua. Mayor concentración de estos iones altera el gradiente electroquímico de las células, puede afectar la estructura y función de las proteínas y afecta la integridad de las membranas (Buchanan *et al.* 2015).
- **Estrés osmótico:** El manitol, un polialcohol con seis grupos hidroxilo, puede formar interacciones de puente de hidrógeno con las moléculas de agua, lo que reduce la energía libre del medio. Esta reducción de la energía libre se refleja en una disminución del potencial osmótico, permiten la reducción del potencial hídrico en el medio de cultivo, que restringen la disponibilidad de agua a los explantos, emulando el estrés hídrico (Machado *et al.*, 2004).
- **ABA:** El ABA, siendo la principal hormona mediadora de respuestas al estrés hídrico, puede inducir una respuesta al ser absorbida por las raíces (Vishwakarma *et al.*, 2017).

Existen diferentes indicadores bioquímicos relacionados con la tolerancia al estrés por déficit hídrico, entre ellos la prolina juega un papel adaptativo en la mediación del ajuste osmótico y la protección de los tejidos bajo estrés. El ajuste osmótico es un mecanismo involucrado en la tolerancia al estrés osmótico el cual es disminuido por la acumulación neta de solutos. Los principales solutos que se acumulan son iones potasio (K^+) (Premachandra *et al.*, 1995), azúcares (Yakushiji *et al.*, 1996) y aminoácidos como la prolina (Verslues y Sharp, 1999). Estos solutos son conocidos como "solutos compatibles" al no interferir con la función metabólica normal de las plantas aún a altas concentraciones. La prolina es un aminoácidos que también desempeña un rol osmoprotector, cuya acumulación en respuesta al estrés hídrico está ampliamente documentada (Liang *et al.*, 2013) y se considera que está involucrado en el mecanismo de resistencia al estrés (Lutts *et al.* 1999), lo que lo convierte en un excelente indicador de esta condición. La cantidad neta de prolina en la planta aumenta en condiciones de estrés por la inducción y/o activación de enzimas implicadas en su biosíntesis, así como disminución de la actividad de enzimas responsables de su degradación (Delauney y Verma 1993). Si bien se encontró una respuesta conservada caracterizada por el aumento del contenido de prolina en todas las plantas analizadas sometidas a condiciones de alta salinidad y ABA, las líneas StPP2Ac2b-OE mostraron contenidos de prolina mayores a las plantas WT en condiciones normales (Figura 8). Esto estaría indicando una activación basal del sistema de respuesta al estrés en estas plantas. Es claro que tanto el componente iónico del estrés en alta salinidad como la activación de la vía de señalización por ABA, activan el sistema de respuesta, aumentando la síntesis de prolina y por tanto el contenido de este osmoprotector. La ausencia de cambios significativos en los niveles de prolina en respuesta al tratamiento con manitol, implicaría que el componente osmótico comprendido en este tratamiento no es suficiente per sé para activar la respuesta a estrés, como ya se ha descrito anteriormente (Larher *et al.* 1993).

El estrés hídrico desestabiliza el balance hídrico de la planta (Hartmann *et al.* 2013), por ende, la primera respuesta es la disminución de la transpiración a través del cierre de estomas mediado por ABA. Es a través de los estomas que se regula la entrada y salida no sólo de agua, sino que también de gases, el cierre estomático limita también la absorción de CO_2 y por lo tanto la fotosíntesis (Sharma *et al.* 2020). Sin embargo, esta no es la única forma en que el estrés hídrico reduce la eficiencia fotosintética, también se observa un impacto negativo en el contenido de

clorofila debido principalmente a una reducción en su tasa de biosíntesis (Hamani *et al.* 2020). En nuestros resultados podemos observar que la alta salinidad y el estrés osmótico, producen una disminución de los niveles de clorofila, como se ha descrito (Figura 9). El tratamiento con ABA no produce efectos en el contenido de clorofila de las plantas. Resultados similares se obtuvieron al evaluar el contenido de carotenoides en estas plantas (Figura 10). Nuevamente, observamos que en condiciones de crecimiento normal, las plantas StPP2Ac2b-OE tienen un menor contenido de clorofila a, b y total, poniendo en evidencia una vez más, una respuesta basal activa al estrés hídrico en las plantas StPP2Ac2b-OE acompañada de una menor amplitud de respuesta frente a los tratamientos, como observamos en el caso del contenido de prolina.

Se ha reportado un aumento en la concentración de glucosa, sacarosa y fructosa en alta salinidad que juega un rol importante en el almacenamiento de carbono, osmoprotección, homeostasis osmótica y barrido de radicales libres (Rosa *et al.* 2009). La glucosa, juegan un rol importante como metabolito señal, mientras que la sacarosa, principalmente juega un rol en la respuesta al estrés y puede interactuar con las vías de señalización de ROS. Sin embargo también tienen un rol en la señalización del estrés hídrico. Existe a su vez un crosstalk entre las vías de señalización por azúcares y ABA. (Sami *et al.* 2016), que permite el sensado del estado metabólico de la célula y la regulación del metabolismo que acompaña la respuesta al estrés. Se encontró una respuesta alterada a salinidad principalmente en relación al contenido de almidón (Figura 11), el cual no se ve modificado en las líneas PP2Ac2b-OE pero sí en las plantas WT, y por tanto resulta disminuido respecto de estas en este tratamiento. De manera que también se observa una respuesta a salinidad reducida en las plantas transgénica con respecto a este parámetro.

Como se menciona en la introducción, la exposición a diferentes fuentes de estrés aumenta la tasa de producción de ROS. El desbalance entre la producción de ROS y el sistema de defensa antioxidante ocasiona una ruptura de la función celular y daño (Hasanuzzaman *et al.* 2020). Este desbalance ocurre tanto por un aumento en la producción de ROS, como por una reducción del mecanismo de defensa antioxidante. Las acciones protectoras contra los ROS son llevadas a cabo por varias enzimas (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y también por compuestos no enzimáticos (vitamina E, ascorbato, glutatión, transferrina, ceruloplasmina, etc.) (Hasanuzzaman *et al.* 2020). No encontramos diferencias en la respuesta de las enzimas detoxificadoras CAT y APX respecto de las plantas WT en las condiciones analizadas (Figura 12), sugiriendo que esta no sería la vía más afectada por las PP2A.

Las proteínas LEA (por sus siglas en inglés, *late-embryogenesis abundant*) fueron descubiertas en plantas terrestres y deben su nombre a que se identificaron durante las últimas etapas del desarrollo de las semillas (Hand *et al.* 2010). Sus principales funciones son la tolerancia a la deshidratación, así como la resistencia al estrés por sequía, salinidad y frío, gracias a la estabilización de otros compuestos y membranas celulares, además de prevenir la agregación proteica en los periodos de estrés (Close 1996; Hong-Bo *et al.* 2005). Los genes que codifican para la síntesis de proteínas LEA son una familia amplia que ha sido estudiada en forma extensa en angiospermas, principalmente de interés agrícola. Las dehidrininas son un grupo de la familia de las proteínas LEA, se acumulan de forma variable de acuerdo con el tipo e intensidad del estrés en semillas maduras o tejidos vegetativos en respuesta a la deshidratación, salinidad, frío y congelamiento (Close 1996). Los genes *StLEA27* y *StTas14* exhiben inducción en las hojas de papa después de la exposición a la sequía y al estrés salino, lo que los establece como marcadores moleculares para la respuesta al estrés abiótico (Charfeddine *et al.* 2017) y han anteriormente utilizados en el laboratorio (Muñiz García *et al.* 2012; Muñiz García *et al.* 2011; Pais *et al.* 2009a). El aumento en la expresión de ambos marcadores (*LEA27* y *Tas14*) en condiciones normales de cultivo en la línea L7 respecto de las plantas WT (Figura 13), va de la mano con los resultados obtenidos para los otros parámetros

En conclusión, los resultados obtenidos indican que las plantas StPP2Ac2b-OE presentan niveles aumentados de prolina, bajos niveles de clorofila a, b y total, así como carotenoides, y

aumentados los niveles de expresión de genes marcadores de la respuesta a estrés como *StTas14* y *StLEA27* en condiciones normales. Esto estaría indicando que la sobre-expresión de la subunidad StPP2Ac2b induciría la respuesta a estrés hídrico aún en estas condiciones, confirmando un rol positivo de esta proteína en la respuesta adaptativa al estrés por déficit hídrico. Esta activación basal de la maquinaria de respuesta trae aparejada una menor amplitud de respuesta al estrés en las plantas StPP2Ac2b-OE. Frente a ninguno de los tres tratamientos analizados las plantas StPP2Ac2b-OE presentan niveles aumentados de respuesta, siendo prácticamente indistinguibles de las plantas WT o manteniendo las diferencias observadas en condiciones control.

Las respuestas al estrés y a los tratamientos con ABA muestran disparidades entre las líneas StPP2Ac2b-OE y el tipo WT. Estos hallazgos no son inesperados, ya que se alinean con la intrincada regulación de la actividad de PP2A. Las diferencias observadas pueden atribuirse a un desequilibrio entre las subunidades C, A y B, causado por la sobreexpresión de C2b. En consecuencia, esta sobreexpresión podría alterar la composición de las holoenzimas que contienen C2b. Como resultado, C2b podría desencadenar respuestas distintas, que varían en intensidad debido a la modulación diferencial de la holoenzima determinada por sus subunidades constituyentes A o B.

Estos hallazgos demuestran que la sobreexpresión de StPP2A-C2b desencadena cambios sustanciales en las respuestas metabólicas, bioquímicas y moleculares a la salinidad, el estrés osmótico y el ácido abscísico en las plantas de papa, lo que destaca el papel de PP2A en la mediación de las vías de transducción de señales en condiciones de estrés por déficit hídrico en plantas de papa.

BIBLIOGRAFIA

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Annon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1-15. <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>
- Averkina, I. O., Paponov, I. A., Sánchez-Serrano, J. J., & Lillo, C. (2021). Specific PP2A catalytic subunits are a prerequisite for positive growth effects in *Arabidopsis* co-cultivated with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas simiae*. *Plants*, 10(1), 66. <https://doi.org/10.3390/plants10010066>
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Booker, M. A., & DeLong, A. (2017). Atypical protein phosphatase 2A gene families do not expand via paleopolyploidization. *Plant Physiology*, 173(2), 1283-1300. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01768>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- rautigan, D. L. (2013). Protein Ser/Thr phosphatases – the ugly ducklings of cell signalling. *The FEBS Journal*, 280(2), 324-325. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08609.x>
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants* (2nd ed.). American Society of Plant Biologists.
- Casamayor, A., Perez-Callejon, E., Pujol, G., Arino, J., & Ferrer, A. (1994). Molecular characterization of a fourth isoform of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A from *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis thaliana. Plant Molecular Biology*, 26(5), 523–528. <https://doi.org/10.1007/BF00039564>
- Charfeddine, S., Charfeddine, M., Saïdi, M. N., & Gargouri Bouzid, R. (2017). Potato dehydrins present high intrinsic disorder and are differentially expressed under ABA and abiotic stresses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128(1), 423-435. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1120-4>
- Cho, U. S., & Xu, W. (2007). Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. *Nature*, 445(7123), 53-57. <https://doi.org/10.1038/nature05351>
- Close, T. J. (1996). Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia plantarum*, 97(4), 795-803. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00546.x>
- Das, A. K., Helps, N. R., Cohen, P. T., & Barford, D. (1996). Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *The EMBO journal*, 15(24), 6798-6809. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb01071.x>
- Demidchik, V., & Shabala, S. (2017). Mechanisms of cytosolic calcium elevation in plants: The role of ion channels, calcium extrusion systems and NADPH oxidase-mediated 'ROS-Ca²⁺ Hub'. *Functional Plant Biology*, 45(2), 9-27. <https://doi.org/10.1071/FP16420>
- Denu, J. M., & Dixon, J. E. (1998). Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Current opinion in chemical biology*, 2(5), 633-641. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(98\)80095-1](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(98)80095-1)

- Dietz, K. J. (2016). Thiol-based peroxidases and ascorbate peroxidases: why plants rely on multiple peroxidase systems in the photosynthesizing chloroplast?. *Molecules and cells*, 39(1), 20-25. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2324>
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. (2023). *Producción de papa en Argentina. Evolución del cultivo hasta la temporada 2021/22*.
- Dodd, A. N., Kudla, J., & Sanders, D. (2010). The language of calcium signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 593-620. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070109-104628>
- Driesen, E., Van den Ende, W., De Proft, M., & Saeys, W. (2020). Influence of environmental factors light, CO₂, temperature, and relative humidity on stomatal opening and development: A review. *Agronomy*, 10(12), 1975. <https://doi.org/10.3390/agronomy10121975>
- Farkas, I., Dombrádi, V., Miskei, M., Szabados, L., & Koncz, C. (2007). Arabidopsis PPP family of serine/threonine phosphatases. *Trends in Plant Science*, 12(4), 169-176. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.02.009>
- Gorgues, L., Li, X., Maurel, C., Martinière, A., & Nacry, P. (2022). Root osmotic sensing from local perception to systemic responses. *Stress Biology*, 2(36). <https://doi.org/10.1007/s44154-022-00054-1>
- Groves, M. R., Hanlon, N., Turowski, P., Hemmings, B. A., & Barford, D. (1999). The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell*, 96(1), 99-110. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80963-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80963-0)
- Hamani, A. K. M., Wang, G., Soothar, M. K., Shen, X., Gao, Y., Qiu, R., & Mehmood, F. (2020). Responses of leaf gas exchange attributes, photosynthetic pigments and antioxidant enzymes in NaCl-stressed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings to exogenous glycine betaine and salicylic acid. *BMC Plant Biology*, 20(434). <https://doi.org/10.1186/S12870-020-02624-9>
- Hand, S. C., Menze, M. A., Toner, M., Boswell, L., & Moore, D. (2010). LEA proteins during water stress: Not just for plants anymore. *Annual Review of Physiology*, 73(1), 115-134. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142203>
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., Fujita, M., & Fotopoulos, V. (2020). Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, 9(8), 681. <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>
- He, X., Anderson, J. C., Pozo, O. D., Gu, Y. Q., Tang, X., & Martin, G. B. (2004). Silencing of subfamily I of protein phosphatase 2A catalytic subunits results in activation of plant defense responses and localized cell death. *The Plant Journal*, 38(4), 563-577. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02073.x>
- Hong-Bo, S., Zong-Suo, L., & Ming-An, S. (2005). LEA proteins in higher plants: Structure, function, gene expression, and regulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45(3-4), 131-135. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.07.017>
- Huarte, M. A., & Capezio, S. B. (2013). El cultivo de la papa. *Agricultura y ganadería pampeanas* (1.a ed.). EUDEM.
- Jalmi, S. K., & Sinha, A. K. (2015). ROS mediated MAPK signaling in abiotic and biotic stress-striking similarities and differences. *Frontiers in plant science*, 6, 769. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00769>

- Janssens, V., & Goris, J. (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochemical Journal*, 353(3), 417–439. <https://doi.org/10.1042/bj3530417>
- Kudla, J., Batistič, O., & Hashimoto, K. (2010). Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *The Plant Cell*, 22(3), 541-563. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072686>
- Kuromori, T., Fujita, M., Takahashi, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2022). Inter-tissue and inter-organ signaling in drought stress response and phenotyping of drought tolerance. *The Plant Journal*, 109(2), 342-358. <https://doi.org/10.1111/tpj.15619>
- Larher, F., Lepoint, L., Petrivalsky, M., & Cappart, M. (1993). Effectors for the osmoinduced proline response in higher plants. *Plant Physiology Biochemistry*, 31(6), 911–922. <https://doi.org/10.5555/19940703095>
- Lee, K. H., Piao, H. L., Kim, H. Y., Choi, S. M., Jiang, F., Hartung, W., Hwang, I., Kwak, J. M., Lee, I. J., Hwang, I. (2006). Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell*, 126(6), 1109–1120. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.034>
- Leivar, P., Antolín-Llovera, M., Ferrero, S., Closa, M., Arro, M., Ferrer, A., & Campos, N. (2011). Multilevel control of Arabidopsis 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by protein phosphatase 2A. *The Plant Cell*, 23(4), 1494-1511. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.074278>
- Li, X., & Virshup, D. M. (2002). Two conserved domains in regulatory B subunits mediate binding to the A subunit of protein phosphatase 2A. *European journal of biochemistry*, 269(2), 546-552. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02680.x>
- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S. K., & Becker, D. F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxid & Redox Signal*, 19(9), 998-1011. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074>
- Liu, D., Li, A., Mao, X., & Jing, R. (2014). Cloning and characterization of TaPP2AbB"-α, a member of the PP2A regulatory subunit in wheat. *PLoS One*, 9(4), e94430.
- Luan, S. (2003). *Protein phosphatases in plants*. Annual Review of Plant Biology. 54, 63-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134743>
- Lutts, S., Majerus, V., & Kinet, J. M. (1999). NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum*, 105(3), 450-458. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.105309.x>
- Lyons, S. P., Greiner, E. C., Cressey, L. E., Adamo, M. E., & Kettenbach, A. N. (2021). Regulation of PP2A, PP4, and PP6 holoenzyme assembly by carboxyl-terminal methylation. *Scientific Reports*, 11(1), 23031. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02456-z>
- Machado Neto, N. B., Saturnino, S. M., Bomfim, D. C., & Custódio, C. C. (2004). Water stress induced by mannitol and sodium chloride in soybean cultivars. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(4), 521-529. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132004000400004>
- Máthé, C., Freytag, C., Kelemen, A., M-Hamvas, M., & Garda, T. (2023). "B" regulatory subunits of PP2A: their roles in plant development and stress reactions. *International journal of molecular sciences*, 24(6), 5147. <https://doi.org/10.3390/ijms24065147>
- McAdam, S. A. M. & Brodribb, T. J. (2018). Mesophyll cells are the main site of abscisic acid biosynthesis in water-stressed leaves. *Plant Physiology*, 177(3), 911–917. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01829>
- Mott, K. A., & Parkhurst, D. F. (1991). Stomatal responses to humidity in air and helox. *Plant, Cell & Environment*, 14(5), 509-515. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1991.tb01521.x>

- Muñiz García, M. N., Baroli, I., Cortelezzi, J. I., Zubillaga, M., & Capiati, D. A. (2023). Genetic manipulation of protein phosphatase 2A affects multiple agronomic traits and physiological parameters in potato (*Solanum tuberosum*). *Functional Plant Biology*, 50(12), 1117-1129. <https://doi.org/10.1071/FP23163>
- Muñiz García, M. N., Cortelezzi, J. I., & Capiati, D. A. (2022a). The protein phosphatase 2A catalytic subunit StPP2Ac2b is involved in the control of potato tuber sprouting and source-sink balance in tubers and sprouts. *Journal of Experimental Botany*, 73(19), 6784-6799. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac326>
- Muñiz García, M. N., Giammaria, V., Grandellis, C., Tellez-Iñón, M. T., Ulloa, R. M., & Capiati, D. A. (2012). Characterization of StABF1, a stress-responsive bZIP transcription factor from *Solanum tuberosum* L. that is phosphorylated by StCDPK2 in vitro. *Planta*, 235(4), 761-778. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1540-7>
- Muñiz García, M. N., Grossi, C., Ulloa, R. M., & Capiati, D. A. (2022b). The protein phosphatase 2A catalytic subunit StPP2Ac2b enhances susceptibility to *Phytophthora infestans* and senescence in potato. *PLoS One* 17(10), e0275844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275844>
- Muñiz García, M. N., Muro, M. C., Mazzocchi, L. C., País, S. M., Stritzler, M., Schlesinger, M., & Capiati, D. A. (2017). The protein phosphatase 2A catalytic subunit StPP2Ac2b acts as a positive regulator of tuberization induction in *Solanum tuberosum* L. *Plant Molecular Biology*, 93(1-2), 227-245. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0555-7>
- Muñiz García, M. N., País, S. M., Téllez-Iñón, M. T., & Capiati, D. A. (2011). Characterization of StPPI1, a proton pump interactor from *Solanum tuberosum* L. that is up-regulated during tuber development and by abiotic stress. *Planta*, 233(4), 661-74. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1329-0>
- Obidiegwu, J. E., Bryan, G. J., Jones, H. G., & Prashar, A. (2015). Coping with drought: stress and adaptive responses in potato and perspectives for improvement. *Frontiers in plant science*, 6, 542. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00542>
- País, S. M., González, M. A., Téllez-Iñón, M. T., & Capiati, D. A. (2009a). Characterization of potato (*Solanum tuberosum*) and tomato (*Solanum lycopersicum*) protein phosphatases type 2A catalytic subunits and their involvement in stress responses. *Planta*, 230(1), 13-25. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-0923-5>
- País, S. M., Muñiz García, M. N., Téllez-Iñón, M. T., & Capiati, D. A. (2010). Protein phosphatases type 2A mediate tuberization signaling in *Solanum tuberosum* L. leaves. *Planta*, 232(1), 37-49. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1150-9>
- País, S. M., Téllez-Iñón, M. T., & Capiati, D. A. (2009b). Serine/threonine protein phosphatases type 2A and their roles in stress signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 4(11), 1013-1015. <https://doi.org/10.4161/psb.4.11.9783>
- Pernas, M., García-Casado, G., Rojo, E., Solano, R., & Sánchez-Serrano, J. J. (2007). A protein phosphatase 2A catalytic subunit is a negative regulator of abscisic acid signalling. *The Plant Journal*, 51(5), 763-778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03179.x>
- Pham, G. M., Hamilton, J. P., Wood, J. C., Burke, J. T., Zhao, H., Vaillancourt, B., Ou, S., Jiang, J., & Buell, C. R. (2020). Construction of a chromosome-scale long-read reference genome assembly for potato. *Gigascience*, 9(9), giaa100. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa100>
- Pospíšil, P. (2012). Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(1), 218-231. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.05.017>

- Premachandra, G. S., Hahn, D. T., Rhodes, D., & Joly, R. J. (1995). Leaf water relations and solute accumulation in two grain sorghum lines exhibiting contrasting drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*, *46*(12), 1833-1841. <https://doi.org/10.1093/jxb/46.12.1833>
- Rasool, B., Karpinska, B., Konert, G., Durian, G., Denessiouk, K., Kangasjärvi, S., & Foyer, C. H. (2014). Effects of light and the regulatory B-subunit composition of protein phosphatase 2A on the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to aphid (*Myzus persicae*) infestation. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 405. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00405>
- Rosa, M., Hilal, M., Gonzalez, J. A., & Prado, F. E. (2009). Low-temperature effect on enzyme activities involved in sucrose–starch partitioning in salt-stressed and salt-acclimated cotyledons of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seedlings. *Plant physiology and biochemistry*, *47*(4), 300-307. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.12.001>
- Rodríguez-Falcón, M., Bou, J., & Prat, S. (2006). Seasonal control of tuberization in potato: conserved elements with the flowering response. *Annual Review of Plant Biology*, *57*, 151-180. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105224>
- Sami, F., Yusuf, M., Faizan, M., Faraz, A., & Hayat, S. (2016). Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, *109*, 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.005>
- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Ramakrishnan, M., Sidhu, G. P. S., Bali, A. S., Handa, N., Kapoor, D., Yadav, P., Khanna, K., Bakshi, P., Rehman, A., Kohli, S. K., Khan, E. A., Parihar, R. D., Yuan, H., Thukral, A. K., Bhardwaj, R., & Zheng, B. (2020). Photosynthetic Response of Plants Under Different Abiotic Stresses: A Review. *Journal of Plant Growth Regulation*, *39*(3), 509-531. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-10018-x>
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., & Yoshimura, K. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of experimental botany*, *53*(372), 1305-1319. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1305>
- Singh, M., Kumar, J., Singh, S., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Reviews in environmental science and bio/technology*, *14*(3), 407-426. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9372-8>
- Spinner, L., Gadeyne, A., Belcram, K., Goussot, M., Moison, M., Duroc, Y., Eeckhout, D., De Winne, N., Schaefer, E., Van De Slijke, E., Persiau, G., Witters, E., Gevaert, K., De Jaeger, G., Bouchez, D., Van Damme, D., & Pastuglia, M. (2013). A protein phosphatase 2A complex spatially controls plant cell division. *Nature Communications*, *4*, 1863. <https://doi.org/10.1038/ncomms2831>
- Stritzler, M., Muñoz García, M. N., Schlesinger, M., Cortelezzi, J. I., & Capiati, D. A. (2017). The plasma membrane H⁺-ATPase gene family in *Solanum tuberosum* L. Role of PHA1 in tuberization. *Journal of Experimental Botany*, *68*(17), 4821-4837. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx284>
- Tang, W., Yuan, M., Wang, R., Yang, Y., Wang, C., Osés-Prieto, J. A., Kim, T. W., Zhou, H. W., Deng, Z., Gampala, S. S., Gendron, J. M., Jonassen, E. M., Lillo, C., DeLong, A., Burlingame, A. L., Sun, Y., Wang, Z. Y. (2011). PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nature Cell Biology*, *13*, 124-131. <https://doi.org/10.1038/ncb2151>
- Teixeira, A. I., Ribeiro, L. F., Rezende, S. T., Barros, E. G., & Moreira, M. A. (2012). Development of a method to quantify sucrose in soybean grains. *Food Chemistry*, *130*(4), 1134–1136. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.128>

- Thomas, H. R., & Frank, M. H. (2019). Connecting the pieces: uncovering the molecular basis for long-distance communication through plant grafting. *New Phytologist*, 223(2), 582-589. <https://doi.org/10.1111/nph.15772>
- Thompson, A. J., Andrews, J., Mulholland, B. J., McKee, J. M., Hilton, H. W., Horridge, J. S., Farquhar, G. D., Smeeton, R. C., Smillie, I. R. A., Black, C. R., & Taylor, I. B. (2007). Overproduction of abscisic acid in tomato increases transpiration efficiency and root hydraulic conductivity and influences leaf expansion. *Plant physiology*, 143(4), 1905-1917. <https://doi.org/10.1104/pp.106.093559>
- Timlin, D., Lutfur Rahman, S.M., Baker, J., Reddy, V. R., Fleisher, D., & Quebedeaux, B. (2006). Whole plant photosynthesis development and carbon partitioning in potato as a function of temperature. *Agronomy Journal*, 98(5): 1195–1203. <https://doi.org/10.2134/agronj2005.0260>
- Trewavas, A. J., & Malhó, R. (1997). Signal perception and transduction: the origin of the phenotype. *The Plant Cell*, 9(7), 1181. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1181>
- Verslues, P. E., & Sharp, R. E. (1999). Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. II. Metabolic source of increased proline deposition in the elongation zone. *Plant physiology*, 119(4), 1349-1360. <https://doi.org/10.1104/pp.119.4.1349>
- Virshup, D. M. (2000). Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes. *Current opinion in cell biology*, 12(2), 180-185. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)00074-5](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)00074-5)
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R. G., Pandey, M., & Sharma, S. (2017). Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Frontiers in plant science*, 8, 161. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00161>
- Wang, H., Wang, H., Shao, H., Tang, X. (2016). Recent Advances in Utilizing Transcription Factors to Improve Plant Abiotic Stress Tolerance by Transgenic Technology. *Frontiers in Plant Science*, 7, 67. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00067>
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M. & Van Camp, W. (1997). Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *The EMBO journal*, 16(16), 4806-4816. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.16.4806>
- Wu, J., Wang, J., Hui, W., Zhao, F., Wang, P., Su, C., & Gong, W. (2022). Physiology of Plant Responses to Water Stress and Related Genes: A Review. *Forests*, 13(2), 324. <https://doi.org/10.3390/f13020324>
- Wu, C. G., Zheng, A., Jiang, L., Rowse, M., Stanevich, V., Chen, H., Li, Y., Satyshur, K. A., Johnson, B., Gu, T. J., Liu, Z., & Xing, Y. (2017). Methylation-regulated decommissioning of multimeric PP2A complexes. *Nature Communications*, 8(1), 2272. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02405-3>
- Xu, X., van Lammeren, A. A. M., Vermeer, E., & Vreugdenhil, D. (1998a). The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation in vitro. *Plant Physiology*, 117(2), 575-584. <https://doi.org/10.1104/pp.117.2.575>
- Xu, X., Vreugdenhil, D., & van Lammeren, A. A. M. (1998b). Cell division and cell enlargement during potato tuber formation. *Journal of Experimental Botany*. 49(320), 573–582. <https://doi.org/10.1093/jxb/49.320.573>

Xu, Y., Xing, Y., Chen, Y., Chao, Y., Lin, Z., Fan, E., Yu, J. W., Strack, S., Jeffrey, P. D., & Shi, Y. (2006). Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme. *Cell*, 127(6), 1239-1251. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.033>

Yakushiji, H., Nonami, H., Fukuyama, T., Ono, S., Takagi, N., & Hashimoto, Y. (1996). Sugar accumulation enhanced by osmoregulation in Satsuma mandarin fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(3), 466-472. <https://doi.org/10.21273/JASHS.121.3.466>

Yoon J. T., Ahn H. K., Pai. H. S. (2018). The subfamily II catalytic subunits of protein phosphatase 2A (PP2A) are involved in cortical microtubule organization. *Planta*, 248(6), 1551-1567. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3000-0>

Zhu, X., Shen, G., Wijewardene, I., Cai, Y., Esmaili, N., Sun, L., & Zhang, H. (2021). The B'ζ subunit of protein phosphatase 2A negatively regulates ethylene signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 169, 81-91. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.10.037>