

Tesis Doctoral

Aproximación a la evolución y función de la familia génica Asr

Frankel, Nicolás

2006

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Frankel, Nicolás. (2006). Aproximación a la evolución y función de la familia génica Asr. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Frankel, Nicolás. "Aproximación a la evolución y función de la familia génica Asr". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2006.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

**APROXIMACIÓN A LA EVOLUCIÓN Y FUNCIÓN
DE LA FAMILIA GÉNICA *Asr***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad
de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Autor: Lic. Nicolás Frankel

Director de tesis: Dr. Norberto Daniel Iusem

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, FCEyN-UBA
IFIByNE-CONICET

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA, 2006

Índice

Página

PÁGINA DEL JURADO	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
AGRADECIMIENTOS	4
INTRODUCCIÓN	5
Primera parte.....	6
Las Solanáceas y el género <i>Lycopersicon</i>	6
Distribución geográfica y diversidad de <i>Lycopersicon</i>	7
Relaciones filogenéticas de las especies del género <i>Lycopersicon</i>	11
El origen del tomate cultivado.....	16
El genoma de los miembros del género <i>Lycopersicon</i> y las relaciones con otras Solanáceas.....	17
Segunda parte.....	18
Las plantas y el estrés hídrico.....	18
Mecanismos moleculares de resistencia a la deshidratación.....	18
La familia génica <i>Asr</i>	21
Mecanismos de transporte de azúcares en plantas superiores.....	24
Tercera parte.....	28
La duplicación de genes y la evolución de familias génicas.....	28
Factores que influyen las tasas y patrones de sustitución génica.....	31
OBJETIVOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS	36
Semillas de tomates salvajes.....	37
Extracción de ADN genómico de tomates silvestres, amplificación por PCR de los genes <i>Asr</i> y posterior secuenciación.....	37
Análisis de secuencias y filogenias.....	38
Expresión de los genes <i>Asr</i> en tomates silvestres.....	40
Preparación de las plantas transgénicas que sobreexpresan o silencian el gen <i>Asr1</i>	41
Condiciones de crecimiento de las plantas transgénicas y <i>wild type</i>	41
Extracción de ARN de tubérculos, RT y PCR en tiempo real.....	41
Incubación de discos de tubérculo con ¹⁴ C-glucosa.....	42
Análisis de metabolitos por GC-MS.....	43
Cuantificación de glucosa, fructosa, sacarosa y almidón en papas y tabacos.....	44
Parámetros fotosintéticos.....	44
Purificación de la proteína ASR1 y microscopia de fuerza atómica.....	44
RESULTADOS	46
Capítulo I.....	47
Los genes <i>Asr</i> en arroz, tomate y demás plantas con semilla.....	47
Evolución de la familia génica <i>Asr</i> en el género <i>Lycopersicon</i>	56

Análisis de la expresión de los genes <i>Asr</i> en los miembros del género <i>Lycopersicon</i> en condiciones de estrés hídrico.....	60
Capítulo II.....	63
Análisis fenotípico y bioquímico de plantas de papa (<i>Solanum tuberosum</i>) que sobreexpresan o tienen silenciado el gen <i>Asr1</i>	64
Análisis fenotípico y bioquímico de plantas de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>) que sobreexpresan o tienen silenciado el gen <i>Asr1</i>	75
Capítulo III.....	79
DISCUSIÓN	84
Discusión del capítulo I de resultados.....	85
Discusión del capítulo II de resultados.....	89
Discusión del capítulo III de resultados.....	93
BIBLIOGRAFÍA	95

Jurados

Resumen

Aproximación a la evolución y función de la familia génica *Asr*.

Los genes *Asr* están presentes en plantas con semilla formando, en general, familias génicas de pocos miembros. Su función precisa es desconocida hasta el momento, pero estudios recientes llevan a pensar que estos genes son factores de transcripción involucrados en la regulación del transporte de azúcares en la planta.

En esta tesis hemos analizado la evolución de la familia génica *Asr* en plantas con semilla con un especial énfasis en el género *Lycopersicon* (tomates). Encontramos que las relaciones de ortología de las proteínas ASR pueden definirse sólo entre especies cercanas evolutivamente. En un árbol filogenético, las proteínas ASR de tomate y papa forman un *cluster* consistente, separado de las ASR de otras dicotiledóneas, monocotiledóneas y gimnospermas. Las dos observaciones anteriores pueden explicarse por eventos de evolución concertada y “nacimiento y muerte” de genes. Asimismo, investigamos la evolución de los cuatro *Asr* en especies silvestres de tomate y pudimos comprobar que *Asr1* tiene una evolución más lenta que los otros tres genes, tanto a nivel sinónimo como de reemplazo. Creemos que este patrón se debe a sus altos niveles de expresión y a sus diversas funciones en distintos tejidos de la planta.

Además, hemos generado plantas transgénicas de papa (*Solanum tuberosum*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*) que sobreexpresan o tienen silenciado el gen *Asr1*. Del análisis de estas plantas podemos concluir que este gen regula los niveles de hexosas en la célula, pero no de otros azúcares. En este sentido, tenemos evidencias que indican que *Asr1* estaría directa o indirectamente controlando los niveles de algunos transportadores de hexosas en tejidos “destino”, por lo tanto actuando como regulador de la importación de estos azúcares.

Por último, por medio de microscopia de fuerza atómica, observamos el pegado de la proteína ASR1 al ADN. Confirmando evidencia previa, vimos dímeros de ASR1 interaccionando con un ADN doble cadena.

Palabras clave: genes *Asr*, *Lycopersicon*, tasas de evolución, uso de codones, conversión génica, “nacimiento y muerte” de genes, *Asr1*, *Solanum tuberosum*, tubérculo, transportadores de hexosas, pegado al ADN, homodimerización.

Abstract

Insights into the evolution and function of the *Asr* gene family.

Asr genes are present in the genomes of seed plants, in general forming small gene families. Their precise function is currently unknown, but recent reports have suggested that *Asr* genes encode transcription factors involved in the regulation of sugar mobilization *in planta*.

In this thesis we have analyzed the evolution of the *Asr* gene family in seed plants and particularly focused in the genus *Lycopersicon* (tomatoes). We have found that the orthology relations among the members can only be inferred between closely related species. In a phylogenetic tree, ASR proteins from tomato and potato form a consistent cluster, separated from ASRs from other dicots, monocots and gymnosperms. These observations can be explained by events of concerted evolution and “birth and death of genes”. At the same time, we investigated the evolution of the four *Asrs* in tomato wild species. We could see that *Asr1* has a slower evolutionary rate both at synonymous and replacement sites when compared to the other three genes. We think that this pattern is caused by its high expression level and multiple functions in different tissues of the plant.

In addition, we generated potato (*Solanum tuberosum*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*) transgenic plants that overexpress or silence *Asr1* gene. From the analysis of these plants we can conclude that this gene is regulating the quantities of hexoses (but not other sugars) in the cells. In this direction, we have evidence supporting that *Asr1* would be directly or indirectly involved in controlling the levels of hexose transporters in “sink” tissues, thereby acting as a regulator of hexose uptake.

Finally, by means of atomic force microscopy, we observed ASR1 protein bound to DNA. Corroborating previous evidence, we saw ASR1 dimers interacting with double-stranded DNA.

Keywords: *Asr* genes, *Lycopersicon*, evolutionary rates, codon usage, gene conversion, “birth and death” of genes, *Asr1*, *Solanum tuberosum*, tubers, hexose transporters, DNA binding activity, homodimerisation.

Agradecimientos

A la UBA, porque todavía brinda educación pública y gratuita de calidad.

Al CONICET por la beca doctoral. A EMBO y DAAD por las becas que me permitieron viajar a Alemania.

A los directores del LFBM, por el empeño que ponen diariamente en hacer que el laboratorio funcione perfectamente.

A Norberto Iusem, por brindarme un lugar en su laboratorio y darme libertad para investigar.

A Fer Carrari....por pipetear y discutir junto a mí tanto tiempo y recibirme en Alemania. Parte de esta tesis es tuya.

A Esteban Hasson por sus importantes aportes a este trabajo; por su capacidad para escuchar, discutir y construir.

A los ex-miembros del grupo Iusem. A Laura Maskin, Gustavo Gudesblat, Vero Rodriguez y Chombis.

A la gente del Max Planck de Fisiología Molecular de Plantas en Golm, Alemania. A Alisdair Fernie, Ilse Balbo, Nicolas Schauer y Ana Lytovchenko. A Adriano Nunes-Nesi y Claudia Studart, que me brindaron un poco de alegría brasilera en el trabajo.

A Silvio Ludueña, Maria Julia Demergasso y Lia Pietrasanta del Centro de Microscopias Avanzadas.

A la gente linda del laboratorio: Mario, Rela, Manuk de la Mata, Mariano “Andy Roddick” Alló, Refojo, Itatí.

A la gente de Biotecnología del INTA, en donde estuve trabajando estos últimos meses.

A mis amigos: Diego, Diana, Lupe, Ure, Tris, Ali, Fer, Trixi, Mayer, Carla, Rodri, Juan, Marina, Pagano y Gaperva.

A mis viejos, Clara y Fernando, que intentan infructuosamente entender lo que hago, pero me apoyan incondicionalmente.

A mi hermano Ale.

A Luis, Susana, Flora y Miguel

A Ana, mi mujer, que me acompañó maravillosamente estos años.

Introducción

Primera parte

Las Solanáceas y el género *Lycopersicon*

La familia *Solanaceae* está compuesta por más de 3000 especies, muchas de las cuales surgieron en la región andina o la Amazonia en Sudamérica. Las Solanáceas habitan regiones con climas muy distintos y presentan una gran diversidad fenotípica (Knapp et al., 2004). Este clado es muy importante a nivel económico porque agrupa especies de interés agronómico (papa, tomate, berengena, pimiento y tabaco), especies ornamentales (géneros *Petunia* y *Schizanthus*) y plantas que tienen compuestos de uso medicinal (géneros *Capsicum* y *Datura*). Todas estas plantas comerciales se han originado a partir de variedades silvestres que han sido “mejoradas” para ciertas características particulares. Por ejemplo, el tabaco ha sido seleccionado artificialmente para tener hojas más grandes.

Algunas solanáceas son importantes organismos modelo para estudiar distintos procesos biológicos; el tomate para estudiar maduración de fruto, *Nicotiana benthamiana* (una especie cercana al tabaco) para la defensa contra patógenos y las petunias para la biosíntesis de antocianinas. Durante el desarrollo experimental de esta tesis se han utilizado tres solanáceas: tomates (género *Lycopersicon*), papa cultivada (*Solanum tuberosum*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*). Tanto la papa, como el tabaco presentan la ventaja (sobre el tomate) de ser fácilmente transformables y allanan, por lo tanto, los estudios genéticos.

Lycopersicon es un género con pocas especies dentro de la extensa y diversa familia *Solanaceae*. Esta familia cuenta con alrededor de 90 géneros que están divididos en dos subfamilias, *Solanoideae* y *Cestroideae*. Esta división se basa principalmente en los diferentes patrones de desarrollo embrionario: *Solanoideae* posee embriones enrollados de diámetro más o menos uniforme, mientras que *Cestroideae* tiene embriones típicamente derechos o apenas curvados. *Solanoideae* muestra uniformidad citogenética ya que todos sus miembros tienen un número básico de $n=12$; en cambio *Cestroideae* tiene números cromosómicos variables, raramente 12. El género *Lycopersicon* es un típico integrante de la subfamilia *Solanoideae*, todos sus miembros presentan $2n=24$. La subfamilia *Solanoideae* está subdividida en tribus; *Lycopersicon* pertenece a la tribu *Solaneae* que contiene 18 géneros. *Lycopersicon* es el género con

menor número de especies y el más próximo al género *Solanum* (al que pertenece la papa), el cual es el más extenso dentro de la familia. *Solanum* incluye 1500 especies y es el género más diverso y complejo dentro de las plantas vasculares, lo cual genera problemas a los taxónomos y a la vez pone en duda el estado de género independiente de *Lycopersicon*. Linneo (1753) ubicó a todas las especies de tomate dentro del género *Solanum*. Miller (1754) les dio a las especies de tomate un reconocimiento como género. La postura de Miller sigue siendo utilizada por la mayoría de los científicos abocados a la botánica y también por los “mejoradores” de plantas.

Algunos autores (entre ellos Bohs y Olmstead, 1999 y Peralta y Spooner, 2001) han pretendido reincorporar al género *Lycopersicon* dentro de *Solanum*. En este trabajo se mantendrá la taxonomía tradicional (*Lycopersicon* separado de *Solanum*). Esta elección está basada en cuestiones meramente operativas; manteniendo la nomenclatura tradicional se pueden diferenciar por el género las especies de papa (que forman tubérculos, género *Solanum*) y las de tomate (que no forman tubérculos y tienen frutos conspicuos, género *Lycopersicon*).

En esta tesis se utilizó el género *Lycopersicon* como modelo experimental, por lo tanto, en las páginas siguientes se incluye una descripción biogeográfica y filogenética del mismo.

Distribución geográfica y diversidad de *Lycopersicon*

El género *Lycopersicon* está compuesto por nueve especies salvajes (Rick 1979) que crecen en el oeste de América del sur, desde Ecuador hasta el norte de Chile (figura 1).



Figura 1. Algunas localidades en las que se han encontrado poblaciones de especies salvajes de tomate. El mapa no muestra a las islas del Archipiélago Galápagos (Ecuador), en las cuales también habitan especies silvestres de tomate .

Todas las especies son diploides ($2n = 24$) (Rick 1979). Los sistemas de apareamiento varían desde auto-incompatible, auto-incompatible facultativo a totalmente auto-compatible. Los tomates tienen un tipo de autoincompatibilidad gametofítica controlada por el “locus” S, que permite al pistilo de la planta reconocer al polen con el mismo haplotipo (Kondo et al. 2002).

Muller (1940) dividió al género *Lycopersicon* en 2 subgéneros:

características morfológicas

1) Eulycopersicon	frutos de color naranja a rojo semillas planas inflorescencias sin bracteas hojas sin pseudoestípulas
2) Eriopersicon	frutos verdes principalmente. semillas gruesas inflorescencias bracteadas hojas con pseudoestípulas

Posteriormente, Luckwill (1943) sumó más especies al género *Lycopersicon*, pero mantuvo los grupos propuestos por Muller. Más tarde Rick (1979), al aumentar el número de especies del género propone un nuevo agrupamiento de los tomates en función de la posibilidad de cruzarlos (y obtener progenie) con los distintos cultivares de *Lycopersicon esculentum* (tomates cultivados comercialmente, obtenidos por selección artificial). De esta manera dividió al género *Lycopersicon* en dos complejos, el complejo “*peruvianum*” y el complejo “*esculentum*”. El complejo “*esculentum*” incluye siete especies, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon pimpinellifolium*, *Lycopersicon cheesmanii*, *Lycopersicon parviflorum*, *Lycopersicon chmielewskii*, *Lycopersicon pennellii*, *Lycopersicon hirsutum* y el complejo “*peruvianum*” cuenta con dos especies: *Lycopersicon chilense* y *Lycopersicon peruvianum*. La figura 2 resume los cambios temporales en la clasificación intragenerica de *Lycopersicon* así como los cambios de nombre para cada especie. La propuesta de Child (1990) introduce algunos cambios e incluye a las especies de tomate en el género *Solanum*.

Como ya hemos dicho, las especies pertenecientes al complejo “*peruvianum*” no pueden ser cruzadas fácilmente con los cultivares de tomate comercial, en cambio las del complejo “*esculentum*” dan híbridos que son totalmente fértiles. Se han creado líneas de introgresión tanto de *Lycopersicon hirsutum* (creadas por el grupo de Steven Tanksley en la Universidad de Cornell, USA; Monforte y Tanksley, 2000) como de *Lycopersicon pennellii* (creadas por el grupo de Dani Zamir de la Universidad Hebrea de Jerusalén, Israel; Eshed et al., 1992) en el genoma de *Lycopersicon esculentum*. A pesar de los grandes impedimentos que hay para obtener híbridos entre el complejo

“*peruvianum*” y los cultivares de *Lycopersicon esculentum*, ha habido algunos intentos exitosos que han producido descendencia. Smith (1944) fue el primero en usar la técnica de “rescate de embriones” en cultivo para obtener plantas cruza de *Lycopersicon peruvianum* y un cultivar de tomate. Un notable logro de mejoramiento vegetal vinculado con el complejo “*peruvianum*” es la introducción, por métodos de genética clásica, de un gen de resistencia (Tm²) al virus de mosaico del tomate (TMV) en cultivares de tomate europeos. La resistencia deriva originalmente de híbridos obtenidos por Alexander (1963). Alexander y Hoover (1953) encontraron resistencia a TMV en 27 líneas del complejo “*peruvianum*”.

En general todas las especies de tomate presentan una gran importancia para el mejoramiento vegetal, ya que posiblemente contengan genes de resistencia tanto a estreses abióticos como bióticos. Las técnicas de transgénesis con las que se cuenta en la actualidad permitirían obtener con celeridad plantas de tomate u otras especies resistentes a virus, bacterias, nematodos, hongos, etc.. La dificultad radica en la identificación y clonado del gen de resistencia en cuestión, cosa que no es necesaria si se usan estrategias de mejoramiento tradicionales. La obtención de plantas resistentes al estrés hídrico, al frío o a una alta intensidad de rayos UV implica seguramente un mayor trabajo debido a que los caracteres mencionados son multigénicos. Las bases moleculares de resistencia a estos estreses son pobremente conocidas, pero es posible que la obtención de una planta resistente implique la introducción de varios genes de una planta salvaje que habita en ambientes extremos.

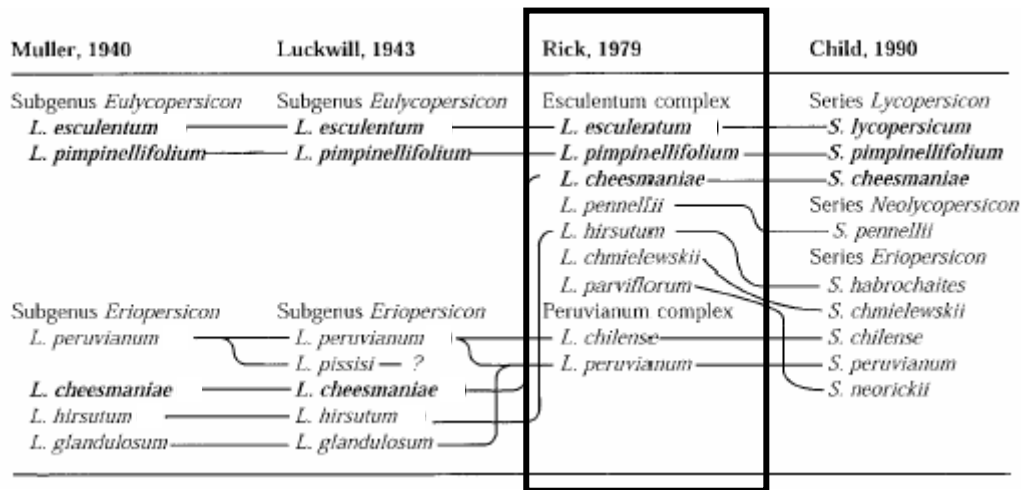


Figura 2. La clasificación intragenérica en *Lycopersicon* a través del tiempo. Se encuadra la clasificación de Rick (1979), la cual será utilizada en esta tesis.

Relaciones filogenéticas de las especies del género *Lycopersicon*

Dos trabajos pioneros en tratar de dilucidar las relaciones filogenéticas entre los miembros del género *Lycopersicon* son los de Palmer y Zamir (1982) y McClean y Hanson (1986). Ambos utilizan información de patrones de restricción de DNA de organelas para construir la respectiva filogenia. El primero de los trabajos utiliza DNA mitocondrial y muestra un árbol hecho con el método de distancia UPGMA. Los autores del segundo trabajo parten de DNA de cloroplastos y obtienen un árbol por el método de Máxima Parsimonia. Miller y Tanksley (1990) construyen un dendrograma (mediante el método de UPGMA) del género *Lycopersicon* con patrones de RFLP de 40 marcadores de DNA nuclear ya clonados, mapeados y secuenciados. Once años más tarde, Marshall et al. (2001) publican un trabajo en el que secuencian la parte del DNA genómico correspondiente al RNAr 5.8S y los *internal transcribed spacers* contiguos (ITS1 + ITS2). Los ITSs son secuencias que luego van a ser eliminadas del transcripto y no forman parte del RNAr 5.8S, por lo que posiblemente no estén sometidos a ninguna presión selectiva en su secuencia nucleotídica. Es factible que su largo sí esté sometido a ciertas restricciones evolutivas, como así ciertas posiciones nucleotídicas necesarias para el correcto procesamiento del RNA o para mantener una correcta estructura secundaria. Con estos datos, Marshall y colaboradores utilizan el método de Máxima Parsimonia para construir la filogenia de *Lycopersicon*. En el mismo año, Peralta y

Spooner (2001) reportan una filogenia de los tomates realizada con la secuencia del gen nuclear de una sintetasa de almidón unida al gránulo (GBBSI). El árbol está construido con el método de Máxima Parsimonia. Frankel y colaboradores (2003) reanalizan las secuencias obtenidas por Marshall (2001) y obtienen un árbol distinto al que habían publicado los autores de las secuencias. Hasta el momento estos son los trabajos que abordan la problemática de las relaciones entre los miembros del género. Nos abocaremos a analizar los tres últimos trabajos publicados sobre la filogenia del género. Los tres trabajos dan filogenias bastante congruentes entre sí. Sin embargo quedan un punto conflictivo, que es la monofilia de las variedades de *L. peruvianum*.

En las figuras 3, 4 y 5 se muestran los árboles de Peralta y Spooner (2001), Marshall et al. (2001) y Frankel et al. (2003), respectivamente. Del análisis de los mismos se puede concluir que la aparición de una coloración que no sea verde en el fruto fue un evento único en la evolución. Este evento ocurrió en el ancestro de *L. esculentum*, *L. cheesmanii* y *L. pimpinellifolium*. Por otro lado, el árbol de Marshall et al (2001) parece mostrar que la adquisición de autocompatibilidad ocurrió una única vez en la evolución. Sin embargo, dentro de las especies que se marcan como incompatibles hay bastantes casos de poblaciones que han adquirido autocompatibilidad, como es el caso de *L. hirsutum* (Kondo et al., 2002)

Tanto el árbol de Peralta y Spooner como el de Frankel y colaboradores sustentan la hipótesis de que la especie *L. peruvianum* es parafilética. Si así fuese, las similitudes fenotípicas entre las distintas variedades de *L. peruvianum* podrían deberse a una convergencia evolutiva. La retención de una morfología ancestral en las variedades de *peruvianum* asociado a cambios en la morfología de las otras especies también podría explicar el parecido morfológico de linajes evolutivamente separados.

En este trabajo de tesis utilizaremos la filogenia de Frankel et al. (2003), que describe en forma confiable las relaciones de las especies que utilizamos para el trabajo experimental.

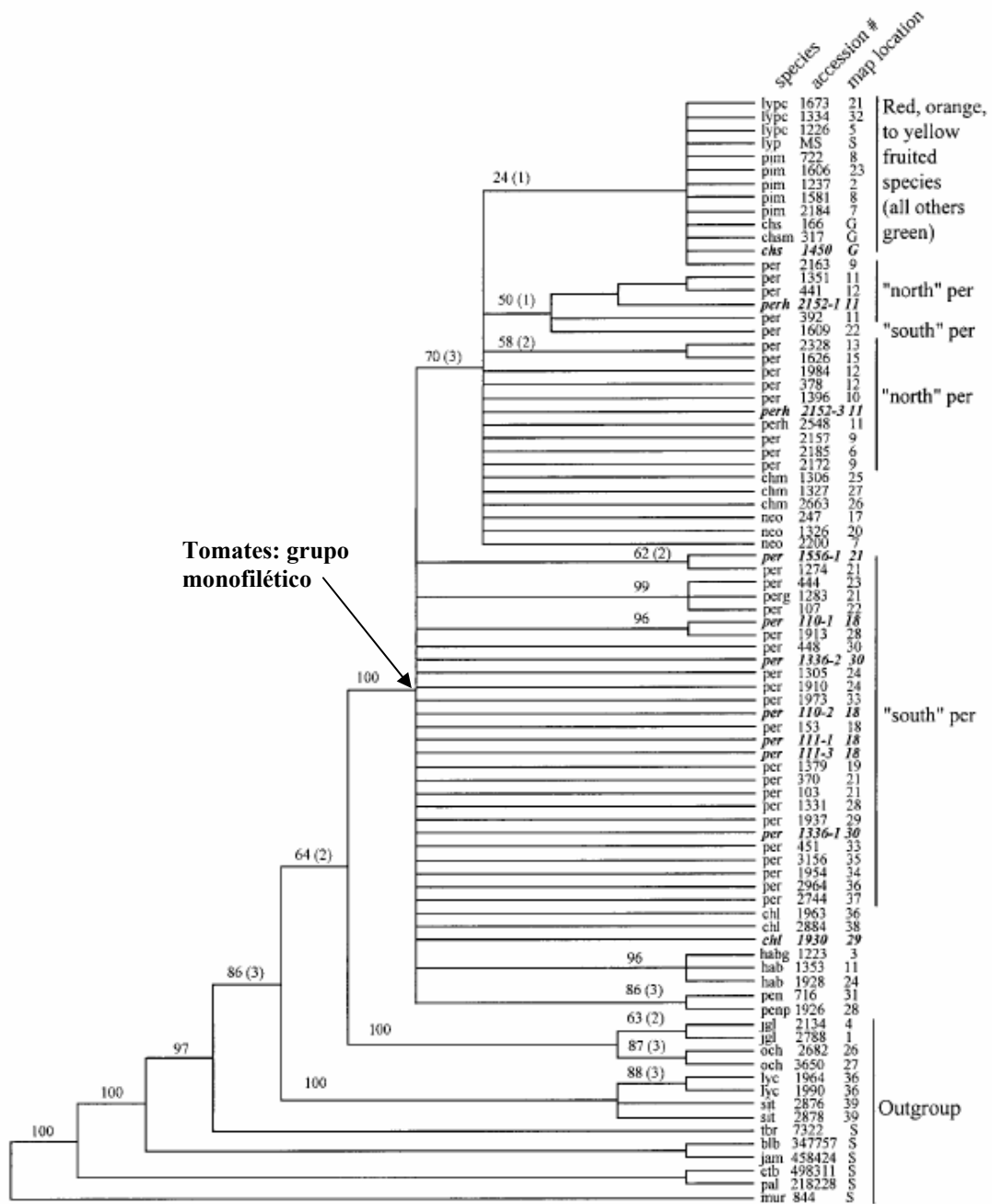


Figura 3. Árbol de Peralta y Spooner (2001). El árbol (consenso estricto de 15.000 árboles igualmente parsimoniosos) se caracteriza por una politomía basal importante dentro del grupo monofilético de los tomates. Sobre cada rama están los valores de bootstrap de 1000 réplicas. Además muestra una clara posición parafilética para las variedades de *Lycopersicon peruvianum* del norte y del sur. chm = *L. chmielewskii*. chs = *L. cheesmanii*. hab = *L. hirsutum*. lyp = *L. esculentum*. lypc = *Lycopersicon esculentum*. var. *cerasiforme*. neo = *L. paviflorum*. pen = *L. pennellii*. per = *L. peruvianum*. perg = *L. peruvianum* f. *glandulosum*. perh = *L. peruvianum* var. *humifusum*. chl = *L. chilense*.

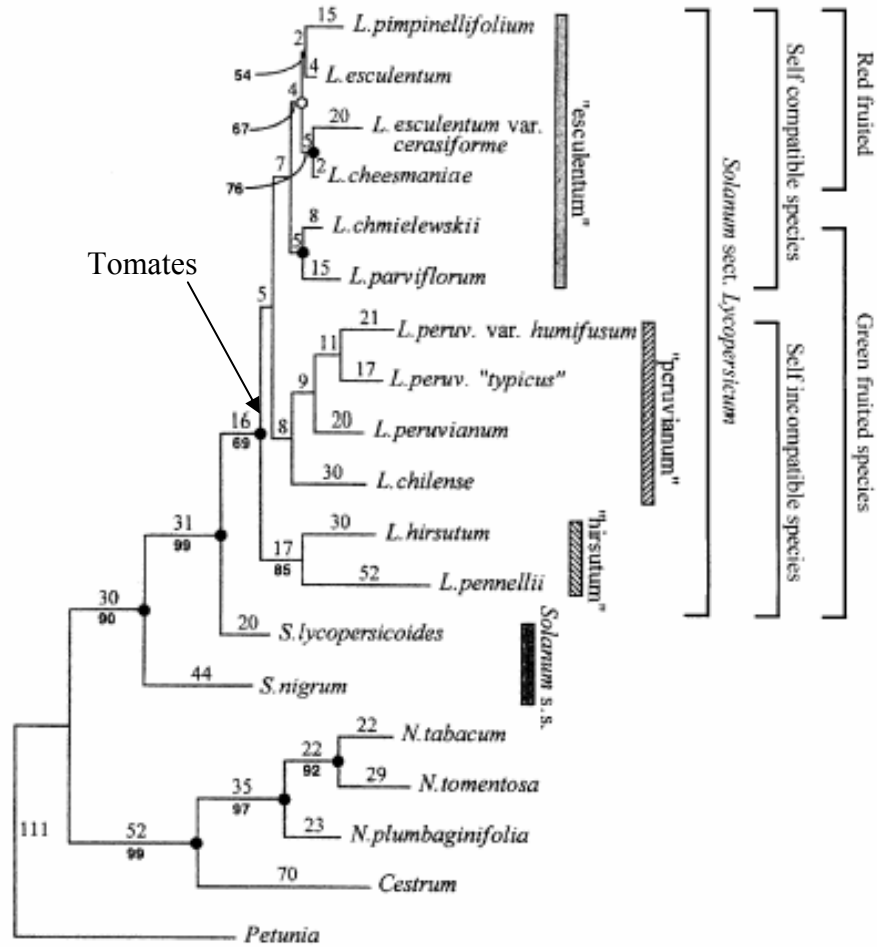


Figura 4. Árbol de Marshall et al. (2001). Se obtuvo un solo árbol más parsimonioso. Los números arriba y debajo de las ramas indican número de cambios y valores de bootstrap respectivamente. Los círculos negros y blancos indican nodos con soporte de jackknife > 50 %. La especie *L. peruvianum* se muestra como monofilética. Las especies dentro de "hirsutum" forman parte del complejo "esculentum" propuesto por Rick. Esta denominación no parece tener valor cladístico. El nodo que separa a "peruvianum" de "esculentum" no tiene soporte estadístico.

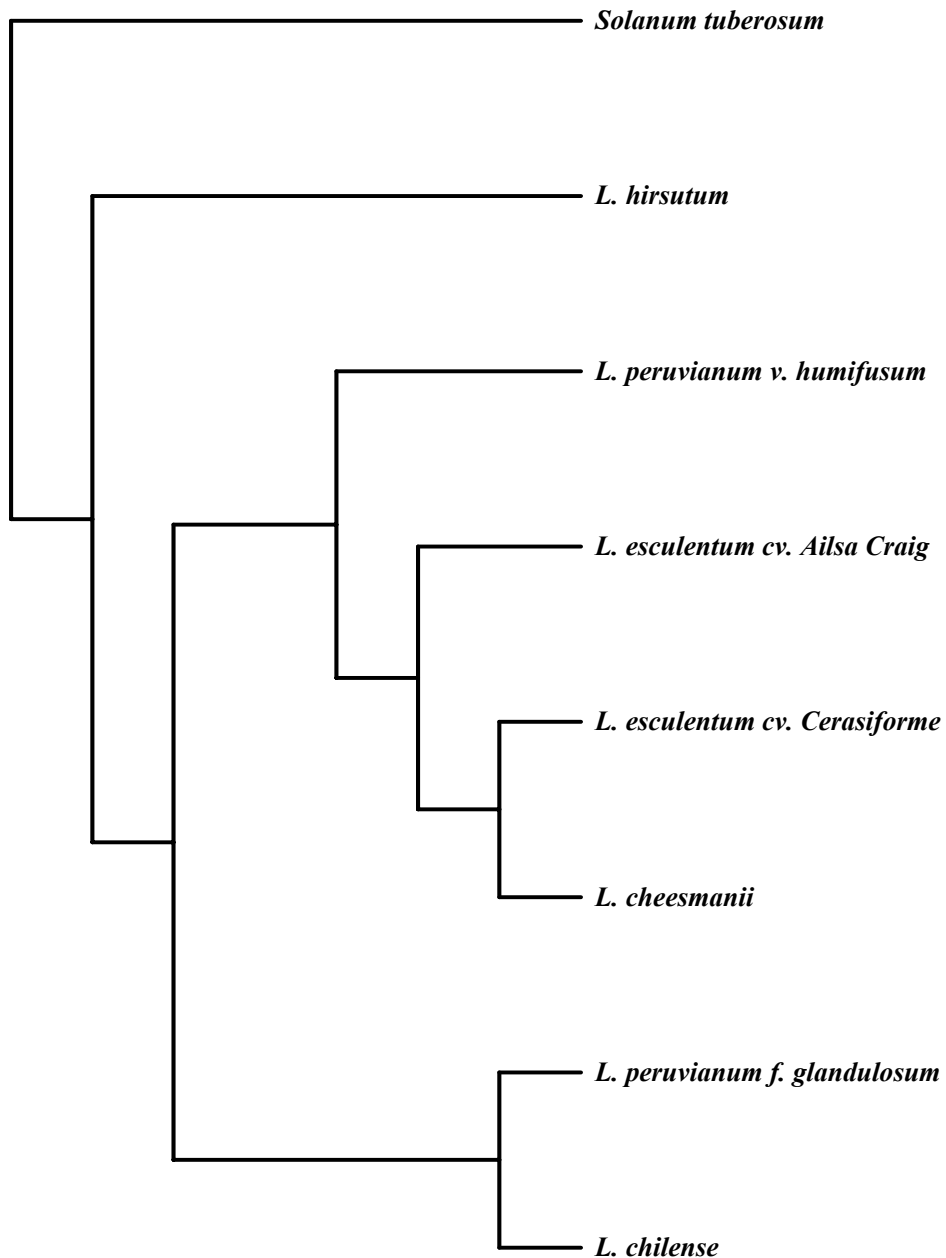


Figura 5. Árbol de Frankel et al. (2003). Las secuencias obtenidas por Marshall et al. (2001) fueron realineadas y se eliminaron las posiciones del alineamiento resultante que tuvieran *gaps*. Neighbor-Joining, Minimum evolution y Máxima Pársimonia dieron el mismo árbol resultante. Todos los grupos tuvieron soporte de *bootstrap* mayor a 50%. Este árbol, al igual que el de Peralta et al. (2001) apoya la idea de que las variedades de *L. peruvianum* no son monofiléticas.

El origen del tomate cultivado

Las primeras referencias escritas sobre el tomate aparecen en libros europeos del siglo XVI. Mencionan a esta hierba como recientemente introducida en el viejo continente. El lugar de dónde provino, quién la llevó y cuando llegó exactamente a Europa son cuestiones que no tienen una respuesta unívoca hasta la actualidad. Dos lugares se mencionan en cuanto al origen: Perú o México. Los nombres europeos que tiene el tomate en la actualidad pueden decir mucho del origen y características del primer tomate que llegó al viejo continente. En Italia al tomate se lo llama *pommodoro*, palabra que puede transformarse fácilmente en “pommo d`oro” y luego en “fruto de oro”. Parece ser que el primer tomate llegado a Italia tenía coloración amarilla. Existen cultivares actuales de tomate que presentan ese color. El otro nombre es tomate, que deriva de la voz nahua *tomatl*. Esto lleva a pensar que el tomate llegó a Europa vía México. En este país la variedad que se supone dio lugar al tomate cultivado (*Lycopersicon esculentum* v. cerasiforme) se encuentra muy dispersa, siempre asociada a poblaciones humanas. Además se encuentran casi todas las variedades cultivadas en la actualidad. La pregunta que persiste es cómo llegó la variedad cerasiforme a México y qué pueblo se ocupó de hacer los cruzamientos necesarios para lograr el tamaño de fruto que vemos en la actualidad en los distintos cultivares (Jenkins 1948).

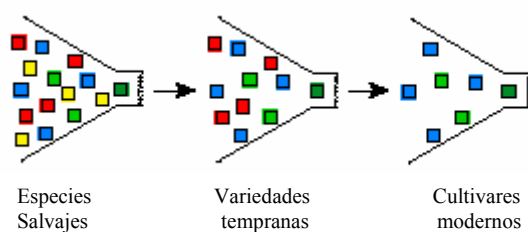


Figura 6. Eventos temporales en la domesticación de un cultivo. Cada etapa implica un cuello de botella que reduce la variedad de alelos presentes en la población.

El tomate cultivado ocupa en los EEUU el primer puesto entre los frutos frescos y procesados con aproximadamente 200.000 hectáreas para producción comercial. La producción mundial, que en 1994 fue de aproximadamente 80 millones de toneladas, ocupa 2.85 millones de hectáreas.

El genoma de los miembros del género *Lycopersicon* y las relaciones con otras Solanáceas

Un trabajo del grupo de Steven Tanksley (Van der Hoeven et al. 2002) muestra distintas características del genoma de *Lycopersicon esculentum*. El estudio está basado en el análisis de 120.892 ESTs provenientes de distintas bibliotecas de ADNc. Luego de trabajos de ensamblado de las distintas secuencias quedan 27.274 unigenes, de los cuales el 70% presenta secuencias con alta identidad (probablemente genes homólogos) en el genoma de *Arabidopsis thaliana*. Otro interesante enfoque del análisis nos da una estimación cruda de los grupos de genes que “evolucionan más rápido o mas lento”, es decir cuya secuencia es más divergente o conservada entre dos especies. La comparación entre *Arabidopsis thaliana* y *Lycopersicon esculentum* (que divergieron hace aproximadamente 150 millones de años) indica que los factores de transcripción son los genes que evolucionaron más rápido en el linaje que lleva a *Arabidopsis* o en el que lleva al *Lycopersicon*, o en ambos a la vez. En cambio los genes involucrados en procesos metabólicos son los que se encuentran más conservados entre estas dos especies.

Los autores del trabajo estiman (con criterios creíbles) en 35.000 el número de genes en el genoma del tomate, bastante más que los 25.500 genes con los que cuenta *Arabidopsis thaliana*. Se cree que la gran mayoría de estos genes están concentrados en zonas eucromatínicas, que constituyen aproximadamente el 23% del genoma del tomate. Se supone que como mínimo el 50% de los genes del tomate pertenecen a familias génicas.

La complejidad del genoma puede extrapolarse a los otros miembros del género dadas las similitudes encontradas en análisis citogenéticos y el corto tiempo evolutivo que separa a los representantes del género. Esta extrapolación puede llegar también hasta el pariente más cercano, que es *Solanum tuberosum*. La papa y el tomate son especies muy cercanas, se estima que divergieron hace sólo 10 millones de años (Alba et al., 2000). Esto se evidencia al comparar las secuencias de los genes, que presentan muy pocas diferencias entre sí, y la posición relativa de los genes en el cromosoma, que muestra un alto grado de sintenia (Tanskley et al., 1992). Pero la conservación de las secuencias no se restringe a estas dos especies cercanas; un estudio reciente (Rensink et al., 2005) que utilizó las bases de datos de ESTs de seis Solanáceas (tomate, tabaco,

papa, petunia, pimiento y *Nicotiana benthamiana*), demostró que existe un alto grado de conservación entre las secuencias codificantes de estas especies.

Segunda parte

Las plantas y el estrés hídrico

La presencia de agua en el ambiente es un factor crítico para el crecimiento de las plantas que afecta directamente la productividad de muchos cultivos de importancia agronómica. Se estima que un 35 % de la superficie del planeta es árida o semiárida, con precipitaciones que son inadecuadas para la agricultura tradicional. En este contexto, la dilucidación de los mecanismos fisiológicos y moleculares de respuesta a la falta de agua constituye una herramienta vital para disminuir pérdidas en cultivos y aumentar la superficie cultivada. El desarrollo de plantas tolerantes al estrés hídrico permitiría aumentar la producción de semillas o la biomasa vegetal en condiciones que actualmente son consideradas adversas.

El estado hídrico de la planta es dinámico y depende de una combinación de factores del suelo, atmósfera y de la planta misma. La disponibilidad de agua no sólo depende de la retención en el suelo sino también del sistema radicular de la planta (el tamaño, la densidad y su actividad). Asimismo, la pérdida de agua depende de la humedad ambiente, el área y morfología foliar y la densidad y apertura estomática. Fluctuaciones en la radiación, humedad y temperatura producen alteraciones en el estado hídrico de la planta.

Mecanismos moleculares de resistencia a la deshidratación

Se han identificado numerosas plantas que pueden soportar una desecación severa. Entre ellas se encuentran *Craterostigma plantagineum* (planta de la resurrección, angiosperma), *Tortura ruralis* (musgo) y algunos helechos. Pero poco se sabe de estas plantas, que recién están comenzando a ser estudiadas.

Los estadios finales de maduración de la semilla se caracterizan por una pérdida de agua de hasta el 90% para que la semilla adquiera un estado de dormición en el cual el metabolismo es casi nulo. Este estado de la semilla permite la supervivencia en

condiciones extremas y favorece la dispersión. Sin embargo, el embrión no puede soportar la desecación en cualquier momento del desarrollo; adquiere la tolerancia a la desecación justo antes de la pérdida del agua de la semilla y la pierde luego de la germinación. De esta manera los distintos estadios de la semilla pueden aprovecharse para detectar RNAs mensajeros y proteínas vinculados a la tolerancia a la desecación. Con este enfoque experimental se han identificado y caracterizado un grupo de proteínas llamadas LEA (*late embryogenesis abundant*). Los RNA mensajeros de estas proteínas aparecen cuando comienza la desecación de la semilla y dominan la población de mensajeros en tejidos deshidratados.

En tejidos vegetativos hay numerosos genes cuya expresión aumenta por condiciones de estrés hídrico. Enzimas vinculadas con el metabolismo de azúcares son probablemente críticas en la tolerancia a la desecación. Se ha demostrado que ciertos azúcares son centrales en la protección de numerosos organismos contra la deshidratación (Hare et al. 1998). El potencial agua puede ser mantenido en la célula por ajuste osmótico, es decir ingresando solutos compatibles a la célula que atraigan moléculas de agua con ellos. Canales iónicos y de agua serían también importantes en la regulación del flujo de agua (Ingram and Bartels 1996).

En un trabajo en el que se utilizan microarreglos de ADN, Kreps y colaboradores (2002) han demostrado que los patrones de expresión de genes bajo estrés hídrico y frío se solapan en gran medida. Estas observaciones pueden ser explicadas por las similares condiciones fisiológicas que imponen la falta de agua y la baja temperatura. Ambas producen falta de agua intracelular. De hecho, las bajas temperaturas producen el congelamiento del agua en el espacio extracelular, lo que hace disminuir el potencial agua en el mismo, con el consiguiente movimiento de agua desde el citoplasma hacia el espacio extracelular.

Hace algunos años florecieron los trabajos que utilizan microarreglos de DNA para detectar genes que se expresan en condiciones de estrés (Shinozaki et al., 2003 y Rabbani et al., 2003, entre otros). Estos datos han sumado un volumen de información importantísimo y, junto a los datos que existían previamente sobre genes específicos, permitieron proponer jerarquías de activación génica y procesos celulares que permiten a las plantas superar las condiciones de estrés (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2006).

Se ha visto que la mayoría de los genes inducidos por estrés son también activados por la fitohormona ácido abscísico (ABA). El ABA fue descubierto en la

década del cincuenta, siendo “abscisina II” el primer nombre que se le dio, ya que se lo relacionó al control de la abscisión de los capullos de algodón. Casi simultáneamente, otro grupo lo llamó “dormina” por estar involucrado en la dormición de las yemas. Poco tiempo después, fue caracterizado como un sesquiterpeno que es sintetizado a partir del ácido mevalónico en raíz y hojas (Li y Walton, 1987; Zeevaart y Creelman, 1988; Parry y Horgan, 1991). Tal e Imber (1970) demostraron que la pérdida de agua causaba una rápida acumulación de ABA en toda la planta y especialmente en hojas jóvenes y que aparentemente existiría un potencial de agua umbral por debajo del cual se produciría dicha acumulación. Esta fitohormona participa en el control de importantes aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas (Leung y Giraudat, 1998) modificando los patrones de expresión de genes a nivel transcripcional (Bray, 1988; Skriver y Mundy, 1990; Bray, 1993). Estudios moleculares con plantas deficientes en la producción de ABA (como son los mutantes *notabilis* y *flacca* de tomate) han demostrado que numerosos genes tienen una expresión anómala ante situaciones de estrés hídrico, frío o estrés osmótico (Giraudat et al. 1992; Ingram y Bartels, 1996; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 1997). En las semillas, el ABA regula procesos esenciales para la viabilidad y la germinación. Estos procesos incluyen la morfogénesis del embrión (Quatrano, 1987), acumulación de proteínas y lípidos de reserva (Finkelstein et al., 1985), la inducción de la dormición (Koorneef et al., 1989) y la adquisición de la tolerancia a la desecación (Kermode y Bewley, 1987). En tejidos vegetativos, el ABA parece ser la única fitohormona necesaria para disparar respuestas de adaptación de la planta frente a condiciones ambientales adversas, como por ejemplo estrés hídrico (Schmelz et al., 2003). Los altos niveles de ABA limitan la pérdida de agua por transpiración al inducir el cierre de los estomas (Finkelstein et al. 2002)

En los últimos años se ha ganado conocimiento acerca de las vías de señalización intracelular que se activan bajo estrés hídrico (figura 7). Es importante aclarar que las respuestas a nivel génico están moduladas por vías ABA-dependientes y ABA-independientes (Zhu, 2002; Shinozaki et al., 2003). Por genética directa se han clonado varios genes involucrados en la señalización del ABA. Las plantas que llevan estos genes mutados tienen una producción normal de la hormona pero son insensibles o hipersensibles a ella. Entre ellas está la serie *abi* (por ABA *insensitive*) de *Arabidopsis thaliana*. Por otro lado, dos receptores de ABA se conocen hasta el momento. Ambos fueron descubiertos este año (2006): una proteína que se une al RNA llamada FCA actúa como receptor de ABA y regula la floración en *Arabidopsis* (Razem et al., 2006) y

la proteína ABAR/CHLH, que es quelante de Magnesio y también une ABA, regula la germinación y la apertura de estomas (Shen et al., 2006). Se sospecha que existirían otras moléculas receptoras a nivel intra y extra-celular.

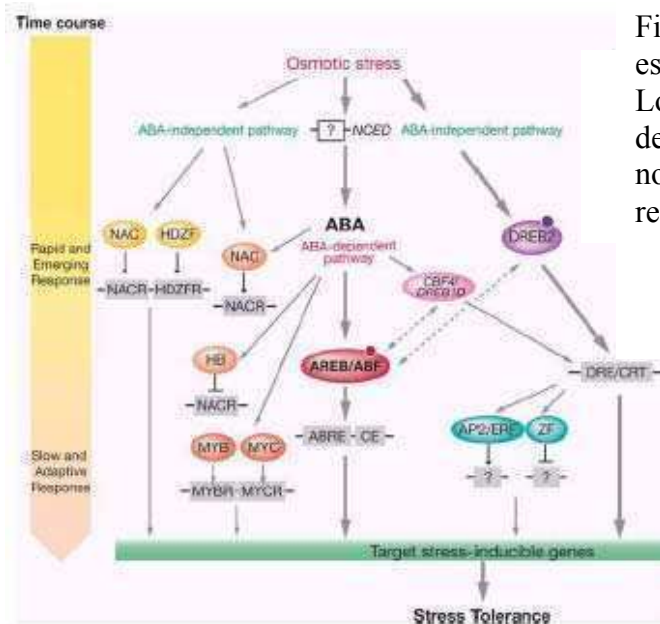


Figura 7. Vías de señalización por estrés osmótico o hídrico. Los círculos muestran distintos factores de transcripción y los cuadrados los nombres de las secuencias consenso reguladas por los mismos.

La familia génica *Asr*

El primer gen *Asr* fue clonado en tomate cultivado (Iusem et al., 1993). *Asr* deriva de *absisic/stress/ripening*; la acumulación de su RNAm se observa en condiciones de estrés hídrico, al aplicar ABA exógeno y durante la maduración del fruto. Más tarde, se clonaron otros dos genes *Asr* en tomate (Rossi y Iusem, 1994; Amitai-Zeigerson et al., 1994; Gilad et al., 1997). *Asr1*, *Asr2* y *Asr3* presentan un alto grado de similitud en su secuencia nucleotídica (alrededor del 80%) y mapean en el cromosoma 4 (Rossi et al. 1996). Al mismo tiempo que se secuenciaban los *Asr* fueron apareciendo genes homólogos en otras especies. En papa cultivada (*Solanum tuberosum*) se clonaron *ci21A* y *ci21B*, que resultaron ser ortólogos a *Asr1* y *Asr2*, respectivamente. Los transcritos de estos genes se encontraban en altos niveles en tubérculos mantenidos a 4°C (Schneider et al., 1997). En una especie salvaje de papa (*Solanum chacoense*) se clonó otro gen homólogo a los *Asr*, que fue denominado *Ds2* (Silhavy et al., 1995). *DS2* presentaba una secuencia de 268 aminoácidos, con una

region de unos 160 aminoácidos formada por repeticiones de un motivo de 13 residuos, inexistente en los otros *Asr* (que tienen 100 aminoácidos aproximadamente). Posteriormente, *Ds2* fue identificado en papa cultivada (Doczi et al., 2002). Ninguno de los genes *Asr* de papa mencionado anteriormente es activado por ABA (Doczi et al., 2005), lo que lleva a pensar que han habido cambios recientes en los mecanismos de regulación de estos genes. Asimismo, se observó que el gen *Ds2* está ausente en el genoma de tabaco (Doczi et al., 2005). En una especie de pino (*Pinus taeda*) se aislaron cuatro genes (*Lp3-0*, *Lp3-1*, *Lp3-2* y *Lp3-3*) expresados en condiciones de estrés hídrico que mostraban alta identidad con los demás *Asr* (Chang et al., 1996). Se observó que *Lp3-0* se expresa en raíz en condiciones de estrés hídrico y esta inducción está mediada por ABA (Padmanabhan et al., 1997). Más tarde, se vio que *LP3-0*, tiene localización nuclear (Wang et al., 2005). En otra gymnosperma (*Ginkgo biloba*), un gen *Asr* se activa en la hoja ante la aplicación de ABA exógeno y por *Southern Blot* se corrobora que este gen pertenece a una familia multigénica pequeña (Shen et al., 2005). En amapola (*Lilium longiflorum*) se detectó otro gen *Asr*, que fue denominado *Lla-23* (Wang et al., 1998). La proteína LLA-23 está presente en los últimos estadios de maduración del polen, cuando las gametas pierden agua en forma programada. Este gen es también inducido en polen por la aplicación de ABA exógeno. Estudios posteriores permitieron determinar que esta proteína está mayormente localizada en citoplasma (Huang et al., 2000). En un trabajo reciente (Yang et al., 2005) sobreexpresan esta proteína de amapola con el promotor 35S en *Arabidopsis thaliana* (una especie que carece de *Asrs*). Observan que las plantas transgénicas tienen menor pérdida de agua en condiciones de estrés hídrico que las plantas control. Además observan que hay cuatro genes que responden al ABA cuya expresión está modificada. Los autores proponen una doble función para esta proteína: a) factor de transcripción en la señalización del ABA y b) molécula que retiene agua ante la desecación. En el mismo rumbo Kalifa et al. (2004) sobreexpresan *Asr1* de tomate en tabaco y encuentran que las plantas tienen mayor tolerancia al estrés salino y menor pérdida de agua. De cualquier manera, los resultados de este trabajo deben ser tomados con cautela ya que se analizó sólo una línea transgénica. Más genes *Asr* fueron reportados en otras especies. En un pomelo asiático (*Citrus maxima*) el gen *Asr1* podría estar vinculado a los ácidos que contiene el jugo del fruto (Canel et al., 1995). En melón (*Cucumis melo*) se encontró un gen *Asr* expresado en fruto cuyo promotor tiene un ABRE, una secuencia en cis de respuesta a ABA (Hong et al., 2002). En durazno, se clonó un gen *Asr* cuyo ARNm es abundante en fruto verde

y maduro (Mbeguie et al., 1997). En maíz y arroz, ambas monocotiledóneas, se describieron también genes *Asr*. En arroz, se clonó un gen (con identidad a los genes *Asr*) que responde al ABA y al estrés salino en el tallo (Vaidyanathan et al., 1999). En maíz, por medio de un búsqueda usando geles de dos dimensiones y comprando hojas sin y con estrés hídrico, se detectó una proteína ASR que aumentaba al escasear el agua (Riccardi et al., 1998). Este gen fue sobreexpresado en maíz, obteniendo plantas con una senescencia de hojas aumentada (Janneau et al., 2002). En caña de azúcar un gen *Asr* denominado *SoDip22*, es inducido por ABA y estrés hídrico en hojas y su expresión es alta en células de la vaina del haz conductor (Sugiharto et al., 2002).

Hasta aquí, muchas secuencias, pero pocos datos realmente relevantes. En resumen se puede decir que los genes *Asr* están en plantas con semilla formando familias génicas de pocos miembros, que se expresan en condiciones de estrés hídrico (ambientales o programadas fisiológicamente) bajo la influencia del ABA o en la maduración del fruto. Además, su composición aminoacídica está altamente sesgada hacia ciertos residuos; glutamato, histidina, lisina, alanina y glicina pueden conformar hasta el 80% de la proteína.

Kalifa et al. (2004) han descubierto que ASR1 de tomate se une a DNA en presencia de zinc -preferentemente a la secuencia C₂₋₃(C/G)A- y se localiza tanto en núcleo como en citoplasma. La parte de esta proteína que interactúa con el ADN es la central/carboxi-terminal y la zona de pegado a zinc está en la región central/amino-terminal (Rom et al., 2006). Estudios hechos por un grupo francés en la planta *Vitis vinifera* (vid) han sumado datos para dilucidar la función de los genes *Asr* (Cakir et al., 2003). Los autores de este trabajo no tenían como objetivo investigar la función de los genes *Asr*, sino que buscaban proteínas que se uniesen al promotor de un transportador de hexosas. La metodología utilizada para identificar las proteínas fue la de “simple híbrido”, utilizando como señuelo 160 pares de bases del promotor del transportador de hexosas *VvHT1*. Este transportador se expresa durante la maduración de la uva y es inducido tanto por glucosa como por sacarosa (Atanassova et al., 2003) y se ubica en la membrana plasmática del floema en la interfase entre células acompañantes y elementos conductores (Vignault et al., 2005). Cakir y colaboradores (2003) encuentran una proteína ASR que se une a el promotor del mencionado transportador de hexosas. Tanto el gen que codifica el transportador como el que codifica la proteína ASR son inducibles por sacarosa en células de vid en suspensión. Ambos presentan un patrón de expresión similar durante la maduración de la uva. Es importante destacar que la inducción del

gen ASR de vid por sacarosa es aumentada aún más por el agregado de ABA. A partir de estos datos se postula que las vías de señalización por ABA y azúcares podrían estar vinculadas (Carrari et al., 2004). El ASR de vid tiene localización nuclear. Ensayos de agroinfiltración muestran que ASR de vid estaría activando la transcripción del transportador *VvHT1* en un sistema heterólogo (Cakir et al., 2003).

En esta tesis, se intentó confirmar la vinculación entre los genes *Asr* y los transportadores de hexosa. Por lo tanto se incluye a continuación una descripción de las funciones de las hexosas en las plantas (metabolismo, transporte, señalización) y de las proteínas involucradas en estos procesos.

Mecanismos de transporte de azúcares en plantas superiores

En plantas superiores la fijación de CO₂ ocurre principalmente en las células del mesófilo de hojas desarrolladas. Estas son exportadoras de azúcares y se las conoce como “fuentes” de carbono. En sus cloroplastos se fija el CO₂ (ciclo de Calvin) produciendo 3-fosfoglicerato. Este compuesto puede ser convertido en almidón y acumulado en el cloroplasto, pero también puede ser movilizado al citosol y transformado en sacarosa, que es pasible de ser movilizada fuera de la célula. Las células heterotróficas en raíces, estructuras reproductivas, órganos de reserva y estructuras en desarrollo cuentan con la provisión de azúcares por parte de las “fuentes” para su nutrición. A estos importadores de azúcares se los conoce como “destinos” de carbono. Esto lleva a pensar que deben existir mecanismos que regulen el movimiento de azúcares a través de la planta, asegurando que los “destinos” obtengan una adecuada cantidad de azúcares. Los transportadores de azúcares juegan un importante rol en la distribución de azúcares en las distintas partes de la planta (Williams et al., 2000). El transporte entre “fuentes” y “destinos” ocurre por medio de una estructura denominada floema. El floema está compuesto por células del tubo criboso, células acompañantes y células parenquimáticas. Las células del tubo criboso pierden sus núcleos, vacuolas, ribosomas y citoesqueleto durante el desarrollo, pero conservan mitocondrias y plástidos modificados, así como el retículo endoplásmico. Son largas longitudinalmente y desarrollan poros en sus membranas que las conectan con otras células de su mismo tipo. En cambio, en las células acompañantes hay una gran densidad de organelas que permiten aportar a las células del tubo criboso las moléculas necesarias para sus funciones vitales. Las células del tubo criboso están conectadas con las acompañantes

por medio de numerosos plasmodesmos, lo que evidencian una íntima conexión funcional. A la unión de estos dos tipos celulares se la llama “complejo célula del tubo criboso-célula acompañante” (CCC-SA).

En el CCC-CA del tejido “fuente” se acumula azúcar que es llevada por el tubo criboso hacia los órganos destino (para una descripción física de este fenómeno ver Thompson, 2006). La sacarosa (disacárido fructosa-glucosa) es el principal azúcar que se trasloca al tubo criboso, pero algunas plantas también movilizan rafinosa (trisacárido fructosa-glucosa-galactosa), stachyosa (tetrasacárido fructosa-galactosa(2)-glucosa) y otros polioles. Se cree que ni glucosa ni fructosa son trasladadas al floema porque contienen un grupo aldehído o cetona expuesto (azúcares reductores) que es altamente reactivo con otros compuestos. Pero no sólo azúcares se transportan por el floema, proteínas, aminoácidos, y hormonas también se movilizan por el tubo criboso.

Luego de ser sintetizada, la sacarosa puede pasar desde el mesófilo hasta el CCC-CA por vía simplástica, es decir, a través de los plasmodesmos que unen a las células. Otro vía de movimiento hacia el CCC-CA es la apoplástica, en la cual la sacarosa que está en el apoplasta es activamente incorporada al CCC-CA por medio de symporters sacarosa/H⁺ presentes en la membrana plasmática de la célula acompañante (figura 8). Este transporte dentro de la hoja en el que se llevan los azúcares hacia floema se denomina de “corta distancia”. El viaje de los azúcares que entran al floema hacia el tejido destino es llamado de “larga distancia”. La descarga de sacarosa en los tejidos “destino” puede ir también por vía apoplástica o simplástica (figura 8). En la vía apoplástica, las células importan la sacarosa del apoplasta por medio symporters sacarosa/H⁺ o, alternativamente, la sacarosa puede ser hidrolizada por invertasas de la pared celular y luego los monosacáridos son incorporados a la célula por medio de transportadores de hexosas (llamados HTs o MSTs).

Las plantas tienen numerosos transportadores de hexosas y sacarosa que se expresan en distintos tejidos, en diferentes estadios del desarrollo y ante diversos estímulos ambientales. Los transportadores de sacarosa están codificados por pocos genes (<10) en los genomas de arroz y *Arabidopsis*. Los transportadores de hexosas parecen ser más (fueron identificados por identidad de secuencia únicamente y no hay pruebas de su función); 14 y 13 en *Arabidopsis* y arroz respectivamente (Lalonde et al., 2004). La regulación del transporte de hexosas es de gran interés, ya que las mismas

son intermediarios y precursores en caminos metabólicos centrales y además tienen funciones de señalización (Roitsch et al., 2004). En cuanto a las funciones de señalización, las hexosas parecen influir en la expresión de una gran cantidad de genes (Koch, 1996; Price et al., 2004). Se sabe relativamente poco de los mecanismos de detección de los

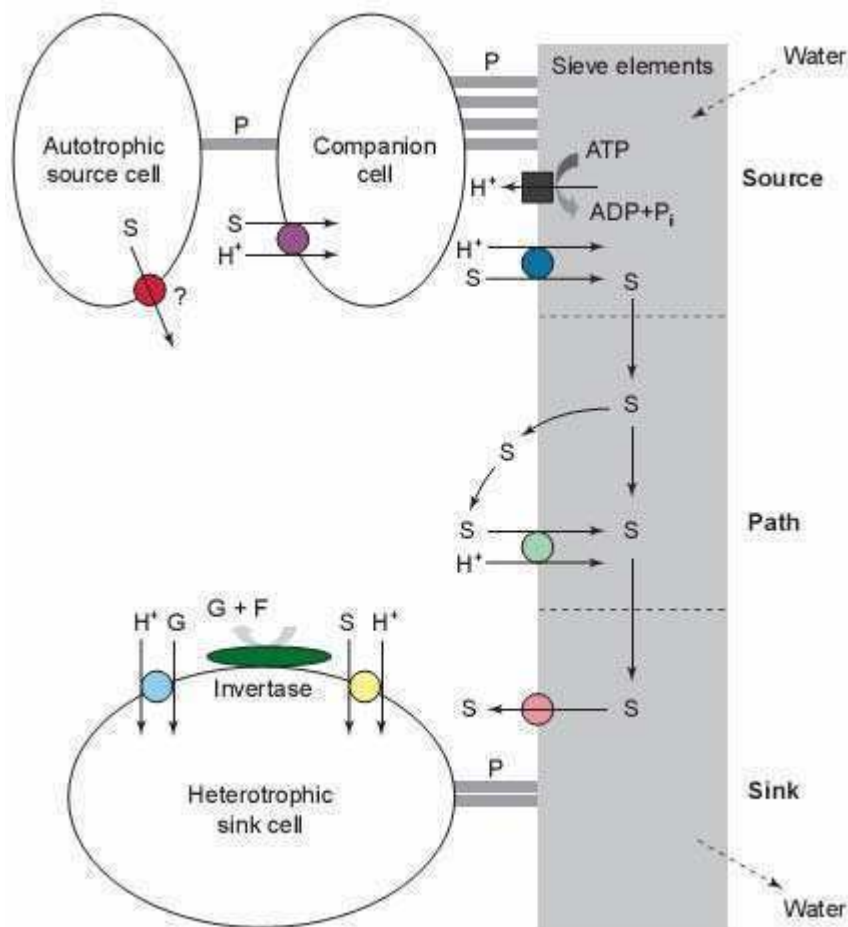


Figura 8. Movimiento de la sacarosa desde la “fuente” hacia el “destino”. Los azúcares mencionados en la figura son sacarosa (S), glucosa (G) y fructosa (F). Los plasmodesmos se indican con la letra “P”. H⁺ = protón. Los círculos esquematizan a las proteínas transportadoras de azúcares en la membrana plasmática. Tomado de Williams et al. (2000).

niveles de azúcares y las vías de señalización asociadas, pero se ha acumulado suficiente evidencia que demuestra que las hexoquinas juegan un rol importante en la detección de los niveles de azúcares, función que sería independiente de su actividad de quinasas. (Moore et al., 2003). Los transportadores de hexosas están presentes en las membranas de los plástidos y participan en la movilización intracelular de las hexosas (Weber et al., 2000) o se ubican en la membrana plasmática. Estos últimos son *symporters* hexosa/H⁺ (usan el gradiente de protones al igual que los transportadores de sacarosa) involucrados en la importación de glucosa a la célula (Sauer et al., 1994; Kühn et al., 2003; Baxter et al., 2005; Fridman et al., 2004). Estos transportadores están pobremente caracterizados (en comparación con los de sacarosa) y poco se conoce de su regulación (Sauer et al., 1994; Lalonde et al., 2003; Delrot et al., 2000). Igualmente, se conoce que los genes de transportadores de hexosas son regulados por estreses abióticos, infección de patógenos y daño (Büttner y Sauer, 2000). Su expresión se restringe generalmente a tejidos “destino”, pero se ha reportado su detección en hojas ya desarrolladas (Büttner y Sauer, 2000). Estas hojas son activas en fotosíntesis y en principio no necesitarían la importación de hexosas, lo que hace difícil la interpretación de estas observaciones. En cambio, está aceptado que la entrada de hexosas por vía apoplástica en tejidos “destino” es un proceso importante en las plantas. En frutos de tomate (Patrick and Offler, 1996), vid (Patrick, 1997) y manzano (Zhang et al., 2004) se cree que predomina la importación apoplástica de azúcares. En el caso de vid hay evidencias fuertes en el mismo sentido, ya que se ha probado la funcionalidad del ya mencionado transportador *VvHT1* (Vignault et al., 2005) cuya expresión se restringe a hojas jóvenes y bayas (Fillion et al., 1999).

En tubérculos de papa, la transición de iniciación del tubérculo al crecimiento del órgano involucra un cambio de importación predominantemente apoplástica a principalmente simplástica (Viola et al., 2001; Fernie y Willmitzer 2002). Pero ambas vías están presentes en el tubérculo en desarrollo. Tanto la fructosa como la glucosa pueden ser fosforiladas en la célula del tubérculo. En este estado pueden entrar en la glucólisis o, en el caso de la glucosa-6P, ingresar al amiloplasto y ser transformada en almidón (Geigenberger 2003).

Tercera parte

La duplicación de genes y la evolución de familias génicas

La duplicación de genes provee materia prima para la evolución de los genomas (Ohno, 1970). Los genes duplicados conforman entre un 8 y un 20 % de los genomas eucariotas (Moore y Purugganan, 2003). Los mismos pueden mutar libremente en su “infancia”, dada la ausencia de restricciones selectivas, lo que facilita la aparición de nuevas funciones (neofuncionalización). La deriva génica y/o selección natural pueden ocuparse de llevar estos genes con nueva función a la fijación dentro de una población (Lynch y Conery, 2000). Otros destinos para los genes duplicados pueden ser: a) la pérdida de función, que genera un pseudogen, b) la subfuncionalización, por la cual la totalidad de la función del gen ancestral es ahora llevada a cabo por los dos genes “hijos” que se han repartido las tareas y c) la persistencia en ambos genes de la misma función, ahora redundante (Moore y Purugganan, 2003). Las duplicaciones génicas dan lugar a la formación de *clusters* de genes homólogos en un cromosoma. Ejemplos clásicos de este fenómeno son las globinas, las histonas, los genes de RNAr y los genes *Hox* (Hancock, 2005) Alternativamente, los miembros de una familia génica, pueden estar lejos en el mismo cromosoma o dispersos en distintos cromosomas (como la familia de genes *Myb* en *Drosophila*, Davidson et al., 2005)

Numerosos estudios han documentado casos de aparición de genes con nuevas funciones (algunos se comentan en Swanson, 2003), como la división de la función de un gen ancestral en sus “hijos” (ver Massingham et al., 2001 para ejemplos). En particular, algunos laboratorios se han ocupado de analizar la divergencia a nivel de expresión de los genes duplicados. En este sentido, se puede pensar que la divergencia a nivel funcional puede traer aparejada una diferenciación a nivel de patrón expresión. Gu et al. (2004) observaron que los genes duplicados (comparados con los de copia única) presentan mayor divergencia a nivel de expresión tanto inter como intra-específicamente.

Es indiscutible que las duplicaciones génicas han jugado un rol importantísimo en la evolución de las especies. La aparición de nuevas copias, sumado a procesos de transposición, recombinación y mutación ha brindado flexibilidad a los genomas. Las familias génicas originadas por eventos de duplicación génica pueden tener desde unos pocos hasta cientos de miembros. El aumento exponencial de las secuencias en bases de

datos (provenientes principalmente de proyectos genoma o análisis de ESTs) ha permitido tener un mayor panorama sobre el origen y la evolución de las familias génicas. A partir de esta información se han propuesto algunos modelos de evolución de familias génicas. Antes de los años '70 el paradigma de la evolución de las familias génicas estaba basado en las hemoglobinas α , β , γ , δ y la globina. Cada uno de estos loci ha divergido de sus homólogos y adquirido una nueva función. Entre especies, se puede diferenciar fácilmente los genes ortólogos. Años más tarde se observa que las copias de RNAr de humano son más parecidas entre sí, que con las de chimpancé (Nelkin et al., 1980). Estas observaciones eran difíciles de encuadrar en el marco de una “evolución divergente” como en el caso de las hemoglobinas. Por lo tanto, se propuso un nuevo modelo llamado de “evolución concertada”, en la que los miembros de una familia multigénica no evolucionan independientemente, sino que una mutación que ocurre en alguna de las copias se termina fijando en todas las copias dentro de un genoma (Nei y Rooney, 2005)(figura 10). Se propusieron dos mecanismos para explicar los patrones de “evolución concertada”, el *crossing-over* desigual y la conversión génica. En el *crossing-over* desigual (ver figura 9), la repetida recombinación “ilegítima”, ocasionada por un alineamiento incorrecto de los cromosomas homólogos genera la homogeneización entre los miembros de la familia. En este caso el número de genes en la familia puede aumentar o disminuir. Es importante remarcar que por eventos de mutación que ocurren dentro de una de las copias y se terminan fijando dentro de una especie, la divergencia entre especies se hace más grande con el tiempo. Por otro lado, conversión génica ocurre cuando uno de los alelos de un gen es transformado en el otro alelo presente en el genoma (conversión génica intraalélica). Esto puede ocurrir también entre distintos loci que presenten identidad nucleotídica (conversión génica interlocus). Los mecanismos por los cuales puede ocurrir conversión génica no están totalmente claros; se ha sugerido como explicación la rotura del ADN seguida de una “reparación invasiva” con una secuencia similar (Paques y Haber, 1999). La conversión génica es direccional, es decir que hay una secuencia aceptora cuya secuencia es reemplazada por la de la dadora. A la vez, la conversión génica no produce cambios en el número de copias de una familia génica en el cromosoma, algo que sucede necesariamente en el *crossing-over* desigual.

Otro modelo llamado de “evolución por nacimiento y muerte” (Nei y Hughes, 1992) fue propuesto al ver que la evolución de ciertas familias génicas (entre ellas la del MHC) no se ajustaban a los patrones predichos por “evolución concertada”. En la

enunciación del modelo de “evolución por nacimiento y muerte” no es clara la predicción de los patrones que deberían ser observados (Nei y Hughes, 1989; Ota y Nei, 1994), pero pueden sacarse algunas conclusiones. En este modelo hay frecuentes eventos de duplicación génica que generan nuevos genes (nacimiento). Algunos de estos genes duplicados pueden ser retenidos en el genoma, mientras que otros serán eliminados o se transformarán en pseudogenes (muerte) (Figura 10). Bajo este modelo algunas de las copias dentro de una misma especie serán más parecidas entre sí, que al comparar entre distintas especies. Pero en este caso, y a diferencia del modelo de “evolución concertada”, esto es ocasionado por eventos de duplicación en ciertos linajes que hacen que dos copias tengan una divergencia reciente. Igualmente, se podrán identificar genes ortólogos entre distintas especies (más fácilmente entre taxa cercanos) que se agruparán en un árbol filogenético. Además, deberían encontrarse pseudogenes en los genomas, producto de la inactivación de genes duplicados.

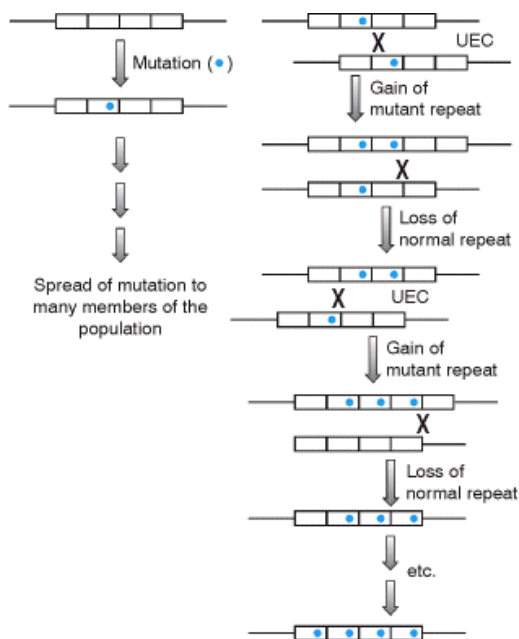


Figura 9. El *crossing over* desigual produce la homogeneización de las copias de una familia multigénica. UEC son las iniciales de *unequal crossing over*. Tomado de Strachan y Read (2003)

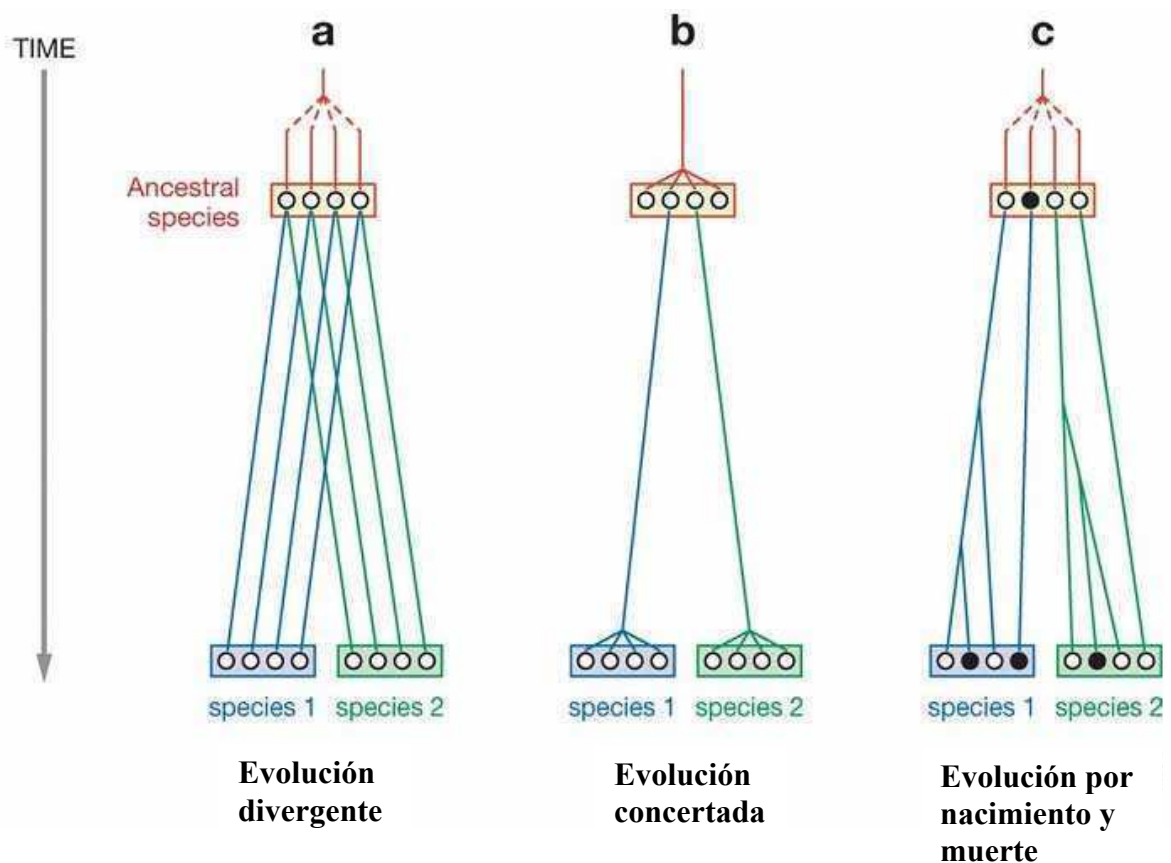


Figura 10. Modelos de evolución de las familias génicas. Los círculos negros representan pseudogenes, es decir genes que han sufrido mutaciones inactivantes. Tomado de Nei y Rooney (2005).

Factores que influyen las tasas y patrones de sustitución génica

De acuerdo a la Teoría Neutralista, si la tasa de mutación es constante en el genoma, la tasa de sustitución sinónima debería ser idéntica entre genes (Kimura, 1983). Pero en numerosos casos se ha visto que esto no es así. Dada la degeneración del código genético, la mayoría de los aminoácidos está codificado por más de un codón. Teóricamente, los codones de un mismo aminoácido deberían ser selectivamente equivalentes, dado que no modifican el residuo en cuestión. Por lo tanto, las posiciones sinónimas de un gen evolucionarían de una manera neutra.

En general, los diferentes codones de un mismo aminoácido tienen cada uno un ARNt con el anticodón correspondiente. En algunos casos no existe el anticodón exacto

para cada codón y en la traducción se produce el fenómeno de *wobbling*; la primera posición del anticodón se aparea con más de base en la tercera posición del codón (G se aparea tanto con C como con T). En organismos unicelulares hay una correlación muy grande entre los codones “usados” y la disponibilidad de los ARNt para esos codones. Los codones más usados son los que tienen mayor cantidad de ARNt. Esto se da sólo en los genes de alta expresión en los que se “necesita” eficiencia (= rapidez) en la síntesis de proteínas (Graur y Li, 2000). Restricciones selectivas en el uso de los codones generan selección purificadora sobre las mutaciones sinónimas, lo que resulta en una disminución en la tasa de sustitución sinónima (Ikemura, 1981). Estas evidencias no deben ser tomadas como contradictorias con los postulados de la Teoría Neutralista, ya que pueden ser explicadas por medio de restricciones selectivas; no es necesario invocar otras fuerzas actuantes.

En *C.elegans*, un animal multicelular, se observó la misma correlación en genes de alta expresión (Duret, 2000). Los codones de estos genes están “adaptados” a la abundancia de los ARNt correspondientes. Otros organismos multicelulares, muestran el mismo patrón (Akashi, 2001). Asimismo, se cree que la composición de codones de estos genes podría disminuir la cantidad de errores en la traducción (que terminan con proteínas no funcionales). Es decir, el uso de codones sinónimos también afectaría la cantidad de errores en la síntesis de proteínas (Akashi y Eyre-Walker, 1998).

En el trabajo de Duret (2000) se encontró otra correlación interesante: en genes de alta expresión, la cantidad de un aminoácido en las proteínas está positivamente correlacionada con la cantidad de ARNt que lleva ese aminoácido (sumando todos los isoaceptores). Esto llevaría a pensar que las proteínas también están adaptadas para un mayor nivel de expresión por la composición aminoacídica.

La tasa de sustitución no sinónima (también llamada “de reemplazo”) es la que contabiliza los cambios en la secuencia de un gen que produjeron modificaciones en los aminoácidos de la proteína codificada por ese gen. Según la Teoría Neutralista (Kimura, 1983), las diferencias en las tasas de reemplazo entre genes están dadas por una diferencia en la fracción de mutaciones neutras. Es decir, las proteínas tienen distintas restricciones funcionales que les permiten aceptar más o menos mutaciones que conserven su actividad (sean neutras). La selección purificadora se ocupa de eliminar la fracción de mutaciones deletéreas, que son distintas para cada gen. Alternativamente,

tasas de mutación diferentes en distintas regiones del genoma podrían explicar en parte la variabilidad en las tasas de sustitución entre genes.

¿Pero qué factores determinan que algunas proteínas sean más conservadas (= tengan menor proporción de mutaciones neutras) evolutivamente que otras? En un estudio reciente realizado con el proteoma completo de levaduras (Drummond et al., 2005) los autores concluyen que el nivel de expresión de un gen es el principal determinante en la tasa de reemplazo. Se esbozaron tres hipótesis (Rocha, 2006) para explicar esta observación, dos de ellas son creíbles:

1) *La hipótesis de la eficiencia traduccional.* Sabemos que algunos ARNt son más abundantes que otros y además la eficiencia de la unión codon-anticodón varía. Esto afecta la tasa de sustitución sinónima en genes de alta expresión. Si algunos de los aminoácidos tienen codones con mayor ARNt disponible, esto puede ser adaptativo y se seleccionaría en contra la sustitución aminoacídica (con la concomitante disminución de la tasa de reemplazo).

2) *La hipótesis de la robustez traduccional.* Los errores en la traducción son comunes en levaduras. Si hay ciertos aminoácidos que hacen a las proteínas más robustas (menos proclives a perder la función si tienen aminoácidos incorrectos) estos deberían estar bajo mayor presión de selección en proteínas abundantes. Esto sería así dado que las proteínas más abundantes podrían generar más cantidad (en valores absolutos) de proteínas mutadas que podrían ser tóxicas. Por lo tanto podría haber selección sobre las proteínas abundantes para que “toleren” más mutaciones en la traducción. Pero se conoce realmente poco del impacto de la incorporación de un aminoácido incorrecto en el plegamiento de una proteína, por lo tanto faltan elementos para validar esta hipótesis. Esta misma explicación vale para la tasa sinónima y el sesgo en el uso de codones sinónimos (ver más arriba). El gen tendría los codones sinónimos cuya traducción genera menos errores.

Se ha vinculado la tasa de sustitución no sinónima con otras variables (Pàl et al., 2006). Entre estas variables, las más factibles de estar vinculadas son:

1) *Número de interacciones proteína-proteína del gen.* Cuanto mayor sea el número de interacciones de la proteína, más proporción de sus aminoácidos estará sujeta a selección purificadora y por lo tanto menor será su tasa de reemplazo.

2) *Expresión del gen en distintos tejidos*. Las proteínas que se expresan en muchos tejidos tienen que “trabajar” en distintas condiciones celulares e interaccionan con numerosas proteínas. Esto haría que sus aminoácidos estén muy conservados. Esta variable está altamente correlacionada con el nivel de expresión y por lo tanto es complicado determinar cuál de las dos está afectando la tasa de reemplazo.

3) *Diferencias en el fitness si el gen es anulado (denominado “dispensability” en inglés)*. Las mutaciones en proteínas que tienen un menor aporte al fitness tienen mayor probabilidad de ser neutras y por lo tanto de fijarse por deriva génica. En cambio, las mutaciones en proteínas que aportan más al fitness, serán seguramente deletéreas y eliminadas por selección.

En contraste con la visión neutralista, algunos estudios muestran que una gran proporción de las sustituciones aminoacídicas son causadas por selección positiva (Fay et al., 2002; Bierne y Eyre-Walker, 2004). En este escenario las diferencias entre las tasas de reemplazo se deberían a que unos genes están sujetos a presiones selectivas positivas más grandes que otros.

Objetivos

- 1) Entender la evolución de la familia génica *Asr* en plantas con semilla y en el género *Lycopersicon*.
- 2) Avanzar en la comprensión de la función de la familia *Asr* a través de uno de sus miembros: el gen *Asr1*.

Materiales y Métodos

Semillas de tomates salvajes

El centro de germoplasma de tomate TGRC (Tomato Genetics Resource Center, Universidad de California, Davis, Estados Unidos) nos proveyó las semillas de las especies de tomate silvestres. Utilizamos las siguientes poblaciones: *Lycopersicon chilense* (LA 2884), *Lycopersicon esculentum* v.cerasiforme (LA1228), *Lycopersicon hirsutum* (LA1223), *Lycopersicon peruvianum* v.humifusum (LA0385), *Lycopersicon peruvianum* f.glandulosum (LA1292), *Lycopersicon cheesmanii* (LA0521) y *Lycopersicon esculentum* cv. M-82.

Extracción de ADN genómico de tomates silvestres, amplificación por PCR de los genes *Asr* y posterior secuenciación

La purificación de ADN se hizo siguiendo el protocolo de Peralta y Spooner (2001). El único cambio que se hizo a este protocolo fue repetir la extracción con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). El DNA resuspendido en agua fue limpiado con sales de acetato (acetato de amonio 7,5 M y acetato de sodio 2,5 M).

Los 35 ciclos de PCR consistieron en una etapa de desnaturalización (1 minuto, 95°C), una de pegado de los *primers* (1 minuto, 55°C para todos los *primers*) y otra de polimerización (1 minuto, 72°C). Se utilizó Taq polimerasa (Invitrogen). Los productos de amplificación fueron corridos en agarosa *low melting point* 1 %, luego cortados del gel y purificados usando el kit Concert (Gibco). Los fragmentos de PCR fueron secuenciados en el Biotechnology Resource Center (Universidad de Cornell, Estados Unidos) con un aparato ABI 3700.

Los primers utilizados para amplificar los genes fueron los siguientes:

Para *Asr1*:

primer FW: 5'-GATAGATTTATTGTTTCAGATGGAG-3'

primer RV: 5'-CCATATTTGGTATAAGTGTTGTGTC-3'.

Asr1 de *L. chilense* y *L. peruvianum* f.glandulosum fue amplificado desde ADNc de hoja estresada hídricamente con otros *primers* (que también se usaron para secuenciar el gen): *primer* FW: 5'-CAGATGGAGGAGGAG-3',

primer RV: 5'-TAGAAGAGATGGTGGTGTCCC-3'

Para *Asr3*:

primer FW: 5'-CAAAGCATAAATTGTCTATCGACGT-3',

primer RV: 5'-GTCCATAGATGGGTGAC-3'.

Para *Asr4*:

primer FW: 5'-GTCACCAAAAAACATCATGGC-3',

primer RV: 5'-AGGATAGATTGATCAGCACAC-3'.

Los *primers* usados para secuenciar fueron los siguientes

Asr1: 5'-CCTCTTTTGTGGTGATAAT-3' y 5'-AACAACTTATTTTGAAACG-3'.

Los *primers* usados para secuenciar *Asr3* fueron los mismos que se usaron para amplificar por PCR.

Asr4 : 5'-CGGAGGAGATAATACATATGG-3'.

Análisis de secuencias y filogenias

Las secuencias de los genes *Asr* fueron editadas con BioEdit (Hall, 1999) y posteriormente alineadas con CLUSTALX. Los alineamientos de proteínas también fueron hechos con CLUSTALX, luego se analizaron y editaron visualmente. La identidad de las proteínas ASR de tomate fue calculada con BioEdit (Hall, 1999)

Las secuencias de proteínas ASR fueron seleccionadas del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) y los Plant Unigene Indices (<http://www.tigr.org/tdb/tgi/plant.shtml>) usando BLASTP y tBLASTn con la secuencia de ASR1 de tomate como *query*. Para la construcción del árbol seleccionamos las especies con más de un gen *Asr* y representantes de grupos diversos de plantas. Los números de acceso al GenBank y *tentative consensus* (TC) de Plant Unigene Indices son los siguientes: ASR1, 2282019 y TC162125; ASR2, 584787 y TC165353; ASR3, 400471 (incompleta) y TC158596 (completa); ASR4, DQ058762 y TC124842; CI21A, 4098248; CI21B, 4098250; DS2, 23095773; ASR1 arroz, 50252229; ASR2 arroz, 15289937; ASR3 arroz, 20146221; ASR4 arroz, 20146222; ASR5 arroz, 2773154; ASR6 arroz, 38605916; ASR1 maíz, TC262475; ASR3 maíz, TC253974; ASR5 maíz, TC258649; ASR6 maíz, TC258651; ASR2 maíz, TC250893; ASR4 maíz, TC258618; LP3-0, 1519370; LP3-1, 1297089; LP3-2, 1401226; LP3-3, 1401234; Pummello, 624672; Amapola, 6525055; Planta de hielo, 7484607; Damasco, 2677824; Vid, 14582465; Ginkgo, 38532363; Banana, 47575681 y Pimiento ASR1, AY496130. Las

secuencias de *Asr1*, *Asr3* and *Asr4* obtenidas en esta tesis fueron depositadas en el GenBank con los números: DQ058744 a DQ058762. Las secuencias de *Asr2* son AY217009 a AY217014 y L20756.

El árbol de proteínas ASR fue construido con MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004) utilizando el algoritmo de Neighbor-joining. Se usó la opción *pairwise deletion*, que elimina del análisis todos los sitios que presentan *gaps* en al menos una secuencia. Las distancias se calcularon como proporción de sitios distintos entre dos secuencias (*p-distance*). Las pruebas de *bootstrap* se hicieron con 500 pseudoreplicas. Una corrección de las distancias por Poisson dio un árbol idéntico con soporte de *bootstrap* (> 70%) a los mismos nodos. La información del genoma de arroz fue tomada del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/PLANTS/PlantList.html>).

El programa PAML (Yang, 1997) fue usado para estimar el número sustituciones sinónimas y no sinónimas por rama y el número total de sitios sinónimos y de reemplazo bajo un modelo que permite al Ka/Ks (ω) tomar cualquier valor en las distintas ramas de un árbol filogenético (*free-ratio model*, Yang, 1998). Las frecuencias de equilibrio de los codones fueron calculadas con las frecuencias nucleotídicas observadas en cada posición del triplete. La tasa de transición/transversión (κ) fue estimada de los datos. Para sacar las tasas de evolución para cada gen, el número de sustituciones sinónimas y no sinónimas (sumadas sólo para las ramas de *Lycopersicon* o el árbol entero, que incluye *Solanum*) fue normalizado por el número total de sitios sinónimos y de reemplazo en cada gen. El número total de sitios sinónimos/sitios reemplazo es: *Asr1*, 67.5/256.5; *Asr2*, 68/247; *Asr3*, 42.8/281.2; *Asr4*, 84.8/368.2. Las diferencias entre genes en las tasas de sustitución fueron analizadas estadísticamente con una tabla de contingencia 2×2 y la prueba exacta de Fisher. La filogenia usada para “mapear” los cambios se comenta en la introducción de esta tesis y en Frankel et al. (2003).

Expresión de los genes *Asr* en tomates silvestres

Las plantas de tomate fueron germinadas en medio MS y 15 días después transferidas a macetas con tierra en una cámara con luz, humedad, temperatura y riego controlados. A los 45 días de sembradas las plantas fueron sacadas de la tierra y se limpiaron las raíces con agua de la canilla. La planta entera se dejó secar por 0, 6 ó 24 horas en la mesada del laboratorio. En el momento correspondiente las hojas y raíces fueron cortadas e inmediatamente sumergidas en nitrógeno líquido hasta la extracción de ARN. El control es de plantas no estresadas. Los valores de contenido relativo de agua fueron similares entre las especies.

El ARN se extrajo de hojas y raíces con Trizol, siguiendo el protocolo del fabricante (Gibco BRL). El ARN de tres plantas distintas fue mezclado en un solo tubo y luego fue usado para el *Northern Blot*. La preparación del gel desnaturalizante, la transferencia e hibridación se hicieron siguiendo el protocolo clásico (Sambrook y Russell, 2001). Las sondas utilizadas son mayormente de zonas no codificantes. La hibridación y los lavados se realizaron con alta rigurosidad (65°C, 0.1× SSC, 0.1% SDS). La idea fue evitar la hibridación cruzada entre miembros de la familia con alta identidad nucleotídica. Las sondas se sintetizaron a partir de producto de PCR de ADNc de tomate cultivado y fueron marcadas por *random priming* (Prime-a-Gene Labeling System, Promega) con ATP-³²P alfa. Los productos de PCR se amplificaron con los siguientes *primers*:

Para *Asr1*,

FW: 5'-TCGATAGATTTATTGTTTCAGATGGAG-3',

RV: 5'-GACACAACACTTATAACCAAATATGG-3'.

Para *Asr4*,

FW: 5'-GCATTCCATGAACATCATCAG-3',

RV: 5'-AGGATAGATTGATCAGCACAC-3'.

Preparación de las plantas transgénicas que sobreexpresan o silencian el gen *Asr1*

La secuencia codificante completa de *Asr1* fue liberada del plásmido p444 cortando con Asp718 (5') y XbaI (3'). Este fragmento de 348 pb. fue rellenado con la enzima Klenow para generar extremos romos y subclonado en el sitio SmaI del vector pBINAR (Liu et al., 1990) entre promotor 35S del CaMV y el terminador OCS. Luego se seleccionaron dos clones: uno con la inserción en orientación sentido y otro con la inserción en orientación antisentido. Estos plásmidos fueron chequeados por secuenciación y luego introducidos por electroporación en *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C58C1). Discos de hoja de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) y papa (*Solanum tuberosum* cv. Desiree) fueron transformados por *Agrobacterium tumefaciens* y luego cultivados en medio inductor de tallo (Rocha-Sosa et al., 1989). Los tallos emergentes fueron cortados y seleccionados en medio MS (Murashige y Skoog 1962) con kanamicina.

Condiciones de crecimiento de las plantas transgénicas y *wild type*

Las plantas de papa y tabaco fueron mantenidas en cultivo de tejidos con un régimen de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad en medio MS (Murashige y Skoog 1962) conteniendo sacarosa 2%. En el invernadero las plantas de papa se crecieron régimen de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad bajo luz de 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 22 °C. Las plantas de tabaco se crecieron con el mismo régimen de luz/oscuridad y la misma intensidad de luz pero a una temperatura de 25°C durante el día y de 20°C durante la noche.

Extracción de ARN de tubérculos, RT y PCR en tiempo real

El ARN total de tubérculos fue extraído con el protocolo de Logemann et al. (1987). Este protocolo está diseñado para eliminar los polisacáridos del tejido e involucra una extracción con fenol(ácido)-cloroformo-isoamílico 25:24:1 y una posterior precipitación con cloruro de litio. Las reacciones de retrotranscripción fueron hechas con 2 μg de RNA total (previamente tratado con DNasa RQ1 –Promega-) siguiendo las instrucciones del manual de la enzima SuperScript II Reverse Transcriptase

(Invitrogen). Los 20 µl de las reacciones de RT fueron diluidas ½ y 1 µl de esta solución fue usado para la PCR en tiempo real, para la cual se usó *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Se hicieron tres réplicas técnicas (de cada ADNc) que dieron muy poca variación entre sí y por lo tanto trabajamos con el promedio de las tres mediciones. Las reacciones fueron corridas en un aparato ABI HT7300 (Applied Biosystems). Una curva de diluciones con producto de PCR fue hecha para cada gen. Las cantidades de transcripto fueron extrapoladas de estas curvas y normalizadas con el gen *housekeeping* EF-1α. La expresión de este gen housekeeping mostró diferencias menores a 1 Ct entre las distintas muestras. No se observaron dímeros de *primers*.

Los primers usados para cada gen son:

TC96617 (HT cebada)

FW: 5'ACAGAGTTCTTTGCCGTTGGAG 3'

RV: 5'GCATGAATCGCCTCGAGTCAC 3'

TC97054 (HT2 tomate)

FW 5'CAGACAACCTTAACCACGGTTGG 3'

RV 5'GTCCGGCTGAACGAGTTTCC 3'

EF-1α (GenBank # 29892962)

FW 5' TGGTGTGATCAAGCCTGGTA 3'

RV 5' AAGAGCTTCGTGGTGCATCT 3'

ci21B (GenBank #4098249)

FW 5' AGTAGCTGCAGTTGGTGCTG 3'

RV: 5'ACAACATGGAGTCCATGGGTG 3'

Las secuencias de los *Tentative consensus* (TC) fueron tomadas del TIGR (<http://www.tigr.org/tdb/tgi/plant.shtml>)

Incubación de discos de tubérculo con ¹⁴C-glucosa

Los tubérculos en desarrollo de plantas de 10 semanas fueron sacados de las macetas y limpiados rápidamente con agua de la canilla. De estos tubérculos se extrajo un cilindro de 10 mm de diámetro con un sacabocado. La parte interna de este cilindro se usó para obtener discos de 2 mm (alto) que fueron lavados exhaustivamente en medio de incubación (10 mM MES-KOH pH 6.5). Los discos de tubérculo fueron incubados en 8 ml de MES (en Erlenmeyers de 100 ml) que contenían glucosa 20 mM no marcada

y 2 μCi de $\text{U-}^{14}\text{C}$ -glucosa (3 mCi/mmol). Dos discos por planta fueron tomados para la incubación y luego de 2 horas congelados en nitrógeno líquido. Este tejido se extrajo sucesivamente con 2 ml de etanol 80%, 2 ml etanol 50%, 2 ml etanol 20%, 2 ml H_2O , y 2 ml de etanol 80% nuevamente. El pellet se resuspendió rápidamente en agua para medir su radiactividad en un contador de centelleo. Los 10 ml de líquido fueron secados en un speedvac *overnight* y resuspendidos en 2 ml de agua para medir su radiactividad en un contador de centelleo. Esta fracción soluble fue luego separada en 3 subfracciones: neutral, aniónica y básica por medio de resinas de intercambio iónico. La resina catiónica (Dowex 50W) tuvo un pH 7 y la resina aniónica (Dowex 1) pH 3. Más detalles de este fraccionamiento se pueden encontrar en Fernie et al. (2001). El $^{14}\text{CO}_2$ liberado fue capturado en KOH y la radiactividad de la solución fue evaluada en un contador de centelleo.

Análisis de metabolitos por GC-MS

100 mg de tubérculo de papa fueron extraídos con 1,4 mL de metanol (una descripción detallada del protocolo se encuentra en Roessner et al. (2000). Durante la extracción se agregan 50 μl de un standard interno (ribitol 2 mg/ml agua) que posteriormente se usa para normalizar las cantidades de metabolitos. Los productos de la extracción son derivatizados (para poder volatilizar ciertos compuestos y proteger algunos grupos) por 90 minutos a 30°C (con 80 μl de 20 mg metoxiamino hidrocloreuro/ml de piridina) y posteriormente tratados por 30 minutos a 37°C con 80 μl de N-metil-N-[trimetilsilil]trifluoroacetamida). Se agregaron los siguientes standards (antes de la trimetilsililación) para controlar el tiempo de retención en la columna: 3.7% ácido hepatónico, 3.7% ácido nonanoico, 3.7% ácido undecanoico, 3.7% ácido tridecanoico, 3.7% ácido pentadecanoico, 7.4% ácido nonadecanoico, 7.4% ácido tricosanoico, 22.2% ácido heptanoico y 55.5% ácido hentriacontanoico.

El cromatógrafo gaseoso acoplado al espectrómetro de masa (GC-MS) utilizado en esta tesis se detalla en Roessner et al. (2000). Los cromatogramas se analizaron con el programa MASSLAB (ThermoQuest). Los metabolitos se identificaron con “bibliotecas” de standards como se describe en Roessner et al. (2000). Las cantidades de los metabolitos están normalizadas por la cantidad de los mismos en plantas *wild type*.

Cuantificación de glucosa, fructosa, sacarosa y almidón en papas y tabacos.

Se realizó una extracción etanólica tanto de hojas como de tubérculos (descrita en Trethewey et al., 1998). El almidón (presente en el pellet de la extracción etanólica) se cuantificó con el método UV (kit de Boehringer Mannheim). Los azúcares solubles se cuantificaron espectrofotométricamente (340 nm) como se describe en Stitt et al., (1989).

Parámetros fotosintéticos

Los parámetros de intercambio gaseoso fueron medidos en seis plantas por línea (dos réplicas técnicas por planta) en una cámara especialmente diseñada (los detalles se pueden encontrar en Muschak et al., 1999). El software Diagas (Walz) fue usado para calcular la asimilación de CO₂, la tasa de transpiración y la conductancia estomática. En la cámara se introduce un folíolo de la hoja de papa cuyo contorno es luego copiado en papel milimetrado para normalizar por la superficie total.

Purificación de la proteína ASR1 y microscopía de fuerza atómica

La secuencia codificante completa de *Asr1* fue subclonada desde el plásmido p444 al plásmido de expresión pTZ18 (Pharmacia) con las enzimas de restricción ClaI (5') y BamHI (3'). En este vector, el gen de interés se ubica río abajo del promotor de la polimerasa viral T7. Al introducir este plásmido en la cepa BL21 de *Escherichia coli*, que tiene la polimerasa T7 en el cromosoma bajo el promotor del operón lac, se puede lograr la expresión de la proteína induciendo el cultivo con IPTG. Este cultivo fue tratado según las instrucciones del kit de purificación por columna de níquel (HisTrap Kit, Amersham). Es importante destacar que la proteína ASR1 tiene dos trectos de histidina propios que facilitan la purificación sin el agregado de un *tag*. La proteína fue eluída con imidazol 300 mM y la pureza fue evaluada sembrando 10 µg en un PAGE teñido con *Coomassie Blue*. Fue necesario cambiar el buffer de la proteína (de fosfato a HEPES pH 7.4) para la realizar la microscopía. Esto fue hecho con un filtro centricon-10 (Millipore).

Las muestras de ASR1 (20 pg/ μ l) fueron preincubadas por 20 minutos con pBluescript SK+ 60 pg/ μ l (purificado con CsCl según el protocolo de Sambrook y Russell, 2001) a una relación molar ASR1/DNA 10:1 en 4 mM HEPES pH 7.4 en presencia de ZnCl₂ 1 mM. La mezcla (10 μ l) fue depositada en una lámina de mica cortada en el momento. Luego, se incubó 5 minutos y posteriormente se lavó con 500 μ l de agua milliQ y secó con gas nitrógeno aplicado localmente. En el caso de la visualización de la proteína sola o el plásmido solo, se omitió el agregado del otro componente.

Se utilizó el modo *tapping* de AFM usando un microscopio “Nanoscope III Multimode-AFM” con un scanner “J-type piezoelectric” y cantilevers de 125 μ m de largo y una constante de fuerza de 40 N/m (NanoDevices, Veeco Metrology, Santa Barbara, CA, USA). Las imágenes fueron tomadas con un tamaño de 0.5-3 μ m a una frecuencia de 1-2 Hz y luego fueron procesadas con el software Nanoscope 4.2.

Resultados

Capítulo I

Los genes *Asr* en arroz, tomate y demás plantas con semilla.

Para poder tener una visión integral de la evolución de la familia génica en plantas superiores decidimos buscar en bases de datos las secuencias *Asr* disponibles. Estas secuencias se sumaron a las ya documentadas bibliográficamente (ver introducción). En esta sección comenzamos describiendo un nuevo miembro de la familia génica en tomate y hacemos la comparación pertinente con los miembros ya conocidos. Posteriormente, aprovechando la información genómica de arroz, comparamos las familias *Asr* de arroz y tomate. Para finalizar, construimos un árbol filogenético con una gran cantidad de genes *Asr* de diversas especies y observamos las relaciones de parentesco entre los genes.

Hasta este momento se conocían tres genes *Asr* en tomate (Rossi et al., 1996). Decidimos bucear la nutrida base de datos de ESTs de tomate (<http://www.tigr.org/tdb/tgi/plant.shtml>; contiene 162,621 ESTs) para ver si existían secuencias con identidad a los *Asr* ya conocidos. Encontramos el TC #124842 que mostraba identidad con el gen *Ds2* de papa (Genbank #CAC86102). Las siglas TC corresponden al término inglés *tentative consensus*, lo que hace referencia a que el mismo es producto de ensamblar ESTs que muestran identidad de secuencia formando un contig (que correspondería con un ARNm). Nos sorprendimos al ver que este TC tenía codones *stop* en la supuesta secuencia codificante. La hipotética secuencia codificante quedaría definida en este caso por dos zonas con identidad con *Ds2* (en dos marcos de lectura distintos) separadas por una región que presentaría codones *stop* (figura 11). Los supuestos codones *stop* presentes en la secuencia indicarían que este *Asr* es un pseudogen. También podrían deberse a un incorrecto ensamblado de los ESTs. Para poder definir esta cuestión decidimos investigar un poco más y diseñamos primers para amplificar esta secuencia tanto de ADNc de hoja estresada hídricamente (si fuera posible) como de ADN genómico de tomate. Pudimos amplificar el gen tanto de ADNc como de ADN genómico (figura 12) y obtuvimos bandas de alrededor de 900 y 1000 pares de bases respectivamente. Esto nos está indicando que el gen se expresa y se procesa cotranscripcionalmente eliminando

```

cggccgggggatcccaaagtatTTTTgttctactactactTTTTTTTcatacacaattgtca
R P G I P K Y F V L L L L F F H T Q L S
ccaaaaaacatcatggctgaagaaaagaacatcacttttgggtggtctctttaaccaccac
P K N I M A E E K K H H F G G L F N H H
aagaacaaagaggaagacacccccattgagaaaactacatatgaagaaacaacctatgaa
K N K E E D T P I E K T T Y E E T T Y E
gacagtgaaaaaactagcacttatggagacaacacatatggtgaaaaaactagttatggt
D S E K T S T Y G D N T Y G E K T S Y G
gatgatacatatggcaaaaaaactaccacatatggagatgacaacaaatatagtgagaaa
D D T Y G K K T T T Y G D D N K Y S E K
actagttatgggtgatgatacatatgacgaaaaaactaacacatatggagatgaaaacaaa
T S Y G D D T Y D E K T N T Y G D E N K
tatgggtgagaaaactagttacagtggaggatgacaacaaatatggtgagaaaactagt
Y G E K T S Y S E G D D N K Y G E K T S
tatgggtggtgatacatatggcgaaaaacctacctctacggaggagataatacatatggt
Y G G D T Y G E K P T S Y G G D N T Y G
gagaaaacaagttatgggtgggggagatgaaaacaagtatggtgagaaaactagttatgga
E K T S Y G G G D E N K Y G E K T S Y G
gagaaagctagttatgggtggaggagatgacaacaaatatggtgagaaaacaagttatggt
E K A S Y G G G D D N K Y G E K T S Y G
aatgaggaaggtggctatggtggaggagttggtgcctactcatctgagactactactaat
N E E G G Y G G G V G A Y S S E T T T N
tatgaagagaatgatgatagtggaaccaaacttctgaggattacaaggaagagaagaaa
Y E E N D D S G T K T S E D Y K E K K
catcacaagcatcttgaagaacttgggggacttggagctggtgctgctggtgcttcttgc
H H K H L E E L G G L G A V A A G A F A
ttggtaaatatctttaaattcacttccacgtgacaatgcatatgtatgagattacaa
L V N I L * F * L S T * Q C I C M R L Q
gattaaatgacatttttctacgttaattcttcgatatggtatatgaaaatttcagcatgag
D * M T F S Y V N L R Y G I * K F Q H E
aagcacaagggcagagaaagatccagagcatgcacacaagcacaagatagaggaagagata
K H K A E K D P E H A H K H K I E E E I
gccgcagtagctgcagttggtgctggtggatttgcattccatgaacatcatcagaagaaa
A A V A A V G A G G F A F H E H H Q K K
gaagcaaaagaagaagaggaggaagctgagggaaagaagaagcatcatttcttctaataga
E A K E E E E E A E G K K K H H F F * *
atttcttgtcataacatatagtatTTTgttgtgtgctgatcaatctatcctttaattaat
I L L S * H I V F V V C * S I Y P L I N
acgtactcagcatgcacctaataatttgtatgtgtgttacactactcttctcttttgatg
T Y S A C T * I I C M C V T L L F S L M
ttgtgcacctactttaatttgcagtgagtgtgaataatattacgtatattgTTTTcttaa
L C T Y F N L H E C E * Y Y V Y C F S *
aaaaaaaacctgtgg
K K N L W

```

Figura 11. Secuencia nucleotídica del TC# 124842 traducida en uno de sus marcos de lectura. En amarillo se muestran las regiones con identidad de secuencia con *Ds2* de papa. En rojo se marca la región que no tiene identidad con *Ds2*, que contiene codones *stop* (marcados con asteriscos). Esta región resultó ser el intrón de un ARNm inmaduro.

un intrón de aproximadamente 100 bases. Al comparar la secuencia genómica con el TC #124842 (no mostrado) pudimos corroborar que este último tiene la secuencia del intrón en el medio de la secuencia codificante. Seguramente el EST del que se obtuvo la secuencia provenía de un ARNm que todavía no se habían procesado y mantenía el intrón.

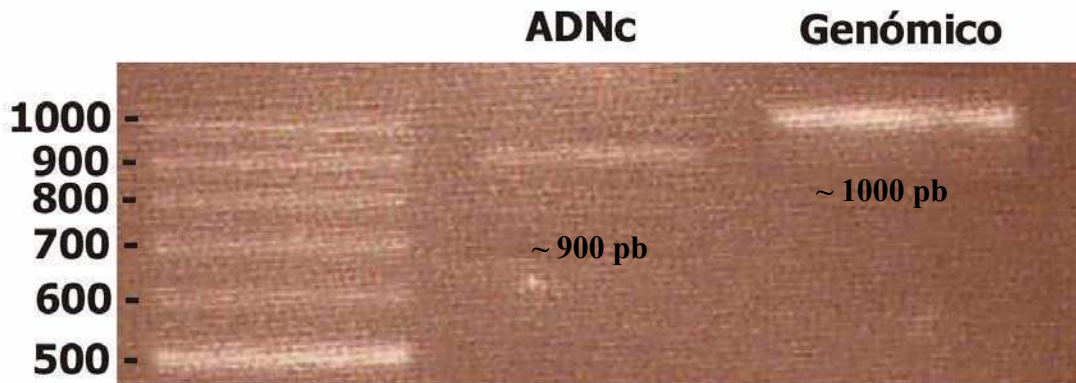
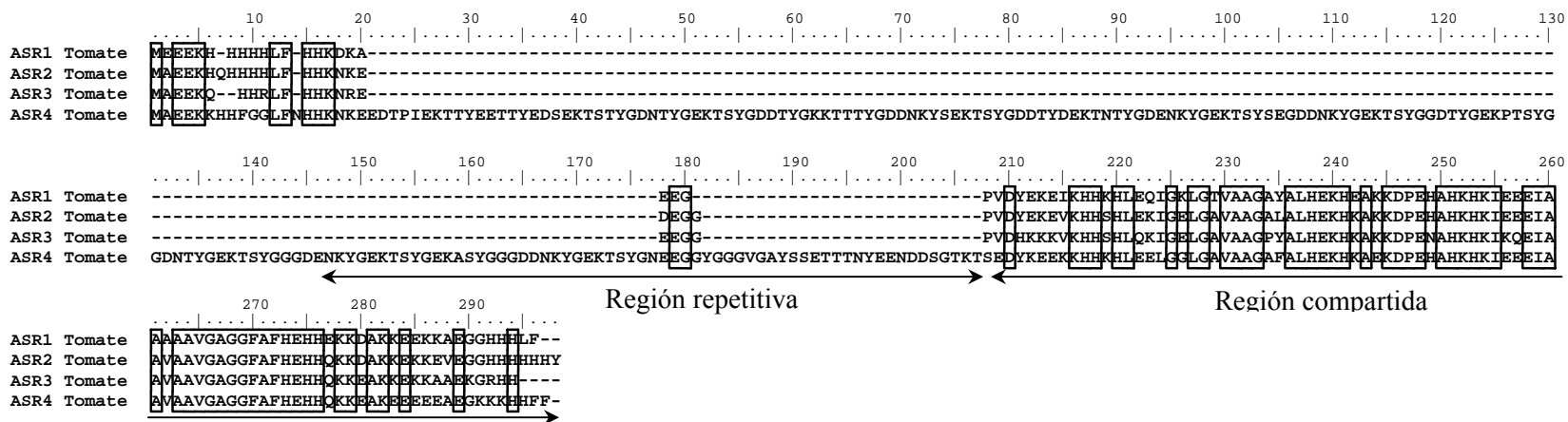


Figura 12. Gel de agarosa que muestra los productos de amplificación de *Asr4* provenientes de ADNc (de hoja estresada hídricamente) y ADN genómico. En la calle de la izquierda se puede observar un marcador de peso molecular cuyos tamaños están en pares de bases.

Hechos los análisis mencionados en párrafos anteriores, decidimos llamar al nuevo gen “*Asr4*” y enviar la secuencia ya curada al GenBank (#DQ058762). Luego hicimos un alineamiento de las cuatro proteínas ASR de tomate (figura 13). Con este alineamiento se puede ver que *Asr4* es más largo que los otros miembros debido a una inserción de 186 aminoácidos en el N-terminal. Esta región está formada por repeticiones imperfectas del motivo YGEKTSYGG(G/D)D(T/N)K. Nos llamó la atención la gran cantidad de posiciones conservadas entre los cuatro miembros de la familia y la alta identidad de secuencia (figura 13). Este hecho podría implicar una cercanía evolutiva de los eventos de duplicación, altos niveles de selección purificadora, eventos de evolución concertada o combinaciones de las opciones mencionadas anteriormente.

Quisimos analizar si *Asr4* estaba ubicado cerca físicamente de *Asr1-Asr2-Asr3*, que están íntimamente ligados (posiblemente en tándem) en el cromosoma IV de tomate (Rossi et al.,1996).



Proteína	ASR1	ASR2	ASR3	ASR4
ASR1	--	82%	72%	71%
ASR2		--	79%	75%
ASR3			--	67%
ASR4				--

Figura 13. Alineamiento de las cuatro ASR de tomate. Se enmarcan los aminoácidos conservados en las cuatro proteínas. Debajo del alineamiento se muestran las dos regiones (repetitiva y compartida) secuenciadas en *Asr4* de tomates silvestres. En la tabla se ven los valores de identidad en las comparaciones de las cuatro proteínas. Para ASR4 se excluyó el dominio extra.

Como ya teníamos una zona candidata en la que podía estar el gen *Asr4*, usamos las líneas ya existentes de introgresión de *L.pennellii* en *L.esculentum* para realizar un mapeo aproximado. En particular, utilizamos la línea 4-3-2, que tiene una introgresión de *pennelli* en *esculentum* en una región del cromosoma IV (figura 14). Esta región de 19 cM está flanqueada por los marcadores TG182 y CD55 e incluye a los genes *Asr1-Asr2-Asr3* (Rossi et al., 1996). La idea de utilizar las líneas de introgresión es la siguiente: si *Asr4* está ubicado cercano a los otros tres genes, la línea introgresada tendrá para este gen la misma secuencia nucleotídica que tiene el parental *L.pennellii*. Contrariamente, si *Asr4* no estuviese en la región introgresada, la secuencia de *Asr4* sería la misma que tiene el parental *L.esculentum*. Luego de secuenciar parte del gen *Asr4* en *L.pennellii* y la línea 4-3-2 (ya contábamos con la secuencia de *L.esculentum*), pudimos ver que la secuencia de *pennelli* y la línea 4-3-2 son idénticas (no mostrado). Por lo tanto, el gen *Asr4* está posicionado en el cromosoma IV de tomate, cercano a los otros tres genes. Esta estrategia de mapeo nos permite tener una ubicación estimativa de la ubicación del gen, pero no sabemos si está al lado de los otros genes o a unas cuantas kilobases.

Conociendo ya los cuatro *Asr* de tomate, buscamos *in silico* los genes *Asr* de arroz con la intención de comparar las familias en estas dos especies. Encontramos seis genes *Asr* en el genoma completo de arroz y los enumeramos arbitrariamente. En la figura 15 se ve una comparación de los genes entre las dos especies para la ubicación cromosómica, el tamaño de la proteína, el tamaño del intrón y la existencia de ESTs. A partir de esta comparación podemos concluir que los genes de arroz, a diferencia de los de tomate, se encuentran dispersos en distintos cromosomas. Sólo *Asr3* y *Asr4* de arroz están ubicados en tándem en el cromosoma I; dado que tienen el mismo largo de intrón, posiblemente sean producto de una duplicación reciente. El gen *Asr2* de arroz está también en el cromosoma I, pero a más de 200 Kb del par *Asr3-Asr4*. Pudimos observar que todos los genes tienen ESTs, lo que confirma que se transcriben y son funcionales.

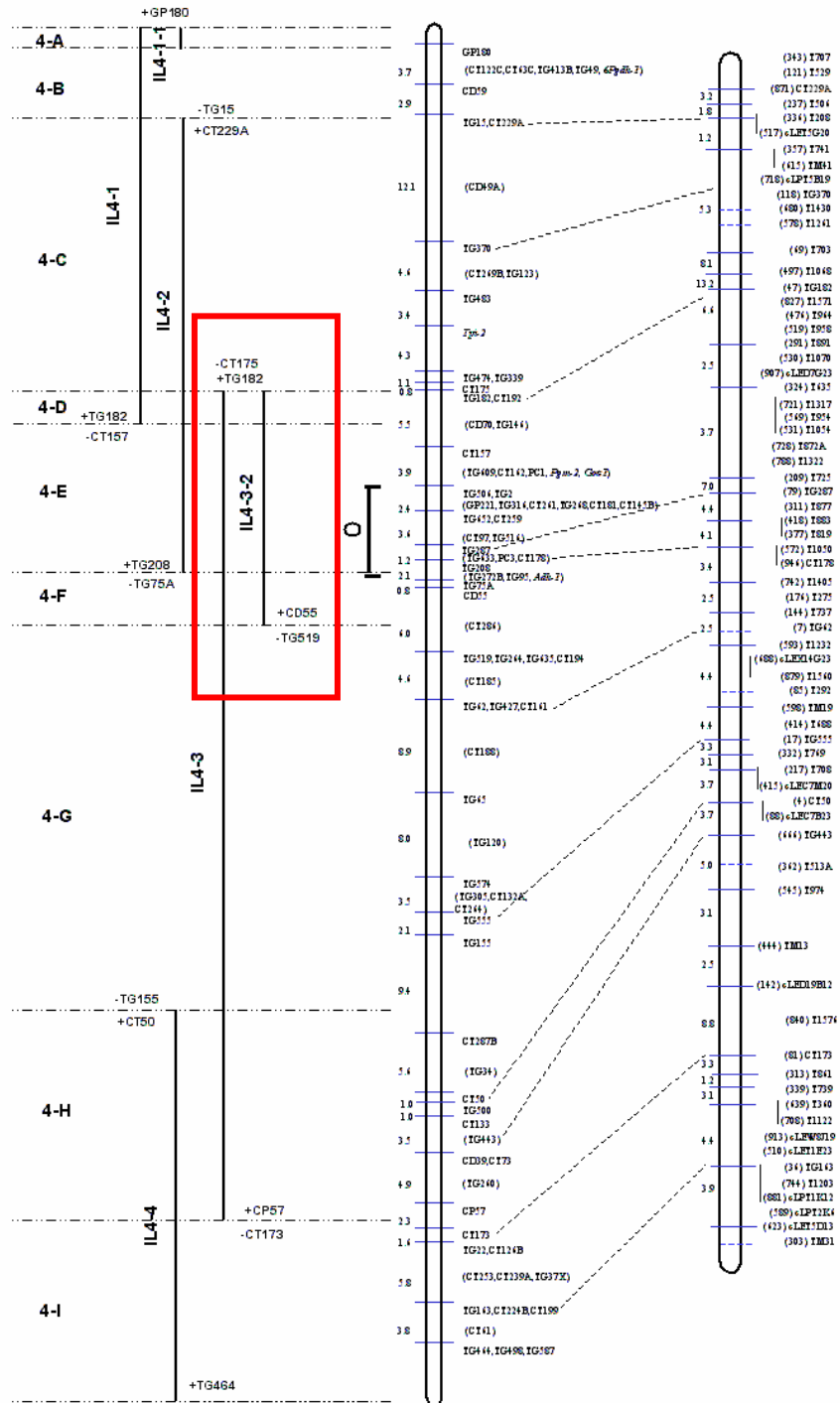


Figura 14. Se muestra el cromosoma IV de tomate y la zona introgresada de *pennellii* en *esculentum* en la línea 4-3-2 (encuadrada). Tomado de http://www.sgn.cornell.edu/maps/pennellii_il/chr4.pl

	Cromosoma	en tándem con	Tamaño intrón (pb)	Tamaño proteína (aa)	ESTs
Arroz					
<i>Asr1</i>	II	--	<i>Splicing</i> alternativo	63/71/91/105	Sí
<i>Asr2</i>	I	--	440	182	Sí
<i>Asr3</i>	I	4	131	105	Sí
<i>Asr4</i>	I	3	131	96	Sí
<i>Asr5</i>	XI	--	119	138	Sí
<i>Asr6</i>	IV	--	84	229	Sí
Tomate					
<i>Asr1</i>	IV	?	687	110	Sí
<i>Asr2</i>	IV	?	111	114	Sí
<i>Asr3</i>	IV	?	476	108	Sí
<i>Asr4</i>	IV	?	111	297	Sí

Figura 15. Comparación de las familias génicas de arroz y tomate. Los signos de interrogación indican que no se sabe si los genes de tomate están uno al lado del otro o simplemente cercanos en el cromosoma IV.

Más adelante, buscamos más genes *Asr* descritos en bibliografía o que estuvieran en las bases de datos (GenBank o TIGR) con el fin de construir un árbol filogenético que mostrase las relaciones entre los genes y permitiese elaborar una hipótesis sobre la evolución de la familia génica. No utilizamos absolutamente todas las secuencias encontradas para evitar un árbol excesivamente frondoso; eliminamos las secuencias de las especies en las que se conociese un solo *Asr* y que además tuviesen un taxón muy cercano cuyo(s) *Asr*(s) se incluyeran en el árbol. Por ejemplo, incluimos un *Asr* de *Prunus armeniaca*, pero excluimos un gen similar de *Prunus persica*. La figura 16 muestra el árbol obtenido utilizando el algoritmo de *neighbor-joining* con las secuencias proteicas, enraizado con las gymnospermas pino/gingkgo (ver materiales y métodos para más detalles). Se pueden observar las relaciones de ortología entre los miembros de papa y tomate, *Asr1* con *ci21A*, *Asr2* con *ci21B* y *Asr4* con *Ds2*. En papa parece no haber un ortólogo de *Asr3*, ya que no se encontraron secuencias similares en la base de datos de ESTs de papa (que tiene numerosas secuencias) y tampoco pudimos amplificar el gen con varios pares de *primers* diseñados para tomate. Entre maíz y arroz también se pueden determinar ciertas relaciones de ortología entre genes. Pero la característica más destacable del árbol es el patrón de agrupamiento de los genes por especie (o grupo cercano). Los genes *Asr* de tomate/papa forman un cluster soportado

por el análisis de *bootstrap*, lo mismo que ocurre con los genes de pino. Los genes de arroz aparecen más dispersos en el árbol.

Una posible causa del agrupamiento de genes de la misma especie es que haya eventos de conversión génica. Una parte de la secuencia de un miembro de la familia es reemplazada por la zona homóloga de otro miembro. Como vimos en la introducción, este tipo de evolución concertada puede llevar a la homogeneización de los miembros de una familia génica. Se han desarrollado diversos métodos para detectar conversión génica (Drouin et al., 1999); uno de los más utilizados es el de Sawyer (Sawyer, 1989). Este método busca si un par de secuencias tiene un número de sitios sinónimos idénticos contiguos que es mayor a lo que se espera por azar. Al realizar 10.000 permutaciones de los sitios sinónimos se determina si es significativo el tamaño del fragmento idéntico entre dos secuencias. Nosotros aplicamos la prueba de Sawyer a los genes de tomate. Encontramos un fragmento idéntico de 62 pares de bases entre *Asr3* y *Asr4* de tomate que arroja un resultado significativo ($P = 0.012$). Esto implica que entre estos dos genes hubo intercambio de secuencias. Por otro lado, no encontramos evidencias de conversión génica entre los otros miembros de la familia.

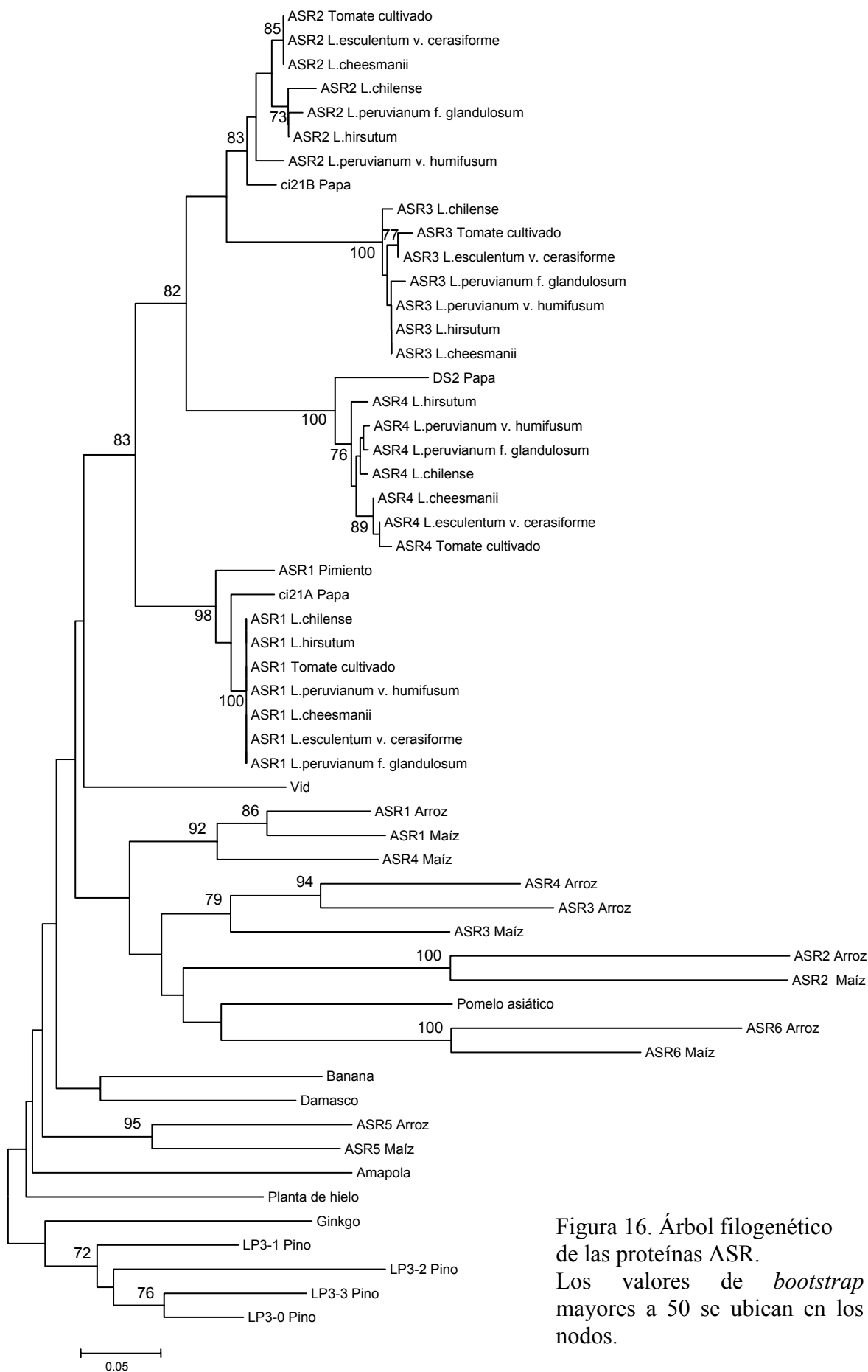


Figura 16. Árbol filogenético de las proteínas ASR. Los valores de *bootstrap* mayores a 50 se ubican en los nodos.

Evolución de la familia génica *Asr* en el género *Lycopersicon*

En mi trabajo de tesis de licenciatura (defendido en marzo de 2003 en la FCEN) examinamos la evolución del gen *Asr2* en siete especies de tomate que habitan regiones con distinta disponibilidad de agua. Llegamos a la conclusión de que este gen estuvo sometido a presiones selectivas positivas en dos especies que habitan lugares áridos (Frankel et al., 2003). Estas dos especies son *L.chilense*, que habita el desierto de Atacama en Chile, y *L.peruvianum* v.humifusum, que vive en una zona semiárida de Perú. Para esta tesis buscamos ampliar el estudio a toda la familia *Asr* de tomate con el objetivo de analizar las fuerzas actuantes sobre los otros miembros de la familia génica. Es decir, ¿Hubo selección positiva sobre algún otro miembro de la familia? ¿O fue *Asr2* el único miembro que evolucionó de tal manera? Nos preguntamos también si había algún miembro que estuviese más conservado que el resto. Para ello secuenciamos los genes *Asr1*, *Asr3* y *Asr4* en las mismas especies en las que habíamos obtenido la secuencia de *Asr2*. De *Asr4* no obtuvimos la secuencia completa, analizamos una parte de la región común y otra parte de la región repetitiva (ver figura 13)

Con las secuencias en mano, mapeamos las sustituciones nucleotídicas (sinónimas y no-sinónimas) en una filogenia del género *Lycopersicon* con papa como outgroup (figura 17). Lo hicimos para *Asr1*, *Asr3* y *Asr4* y comparamos con los datos de *Asr2* (Frankel et al., 2003). En la sección de Materiales y Métodos incluimos una descripción detallada de la metodología utilizada para el mapeo de las sustituciones. De este análisis pudimos concluir que el único miembro de la familia que muestra huellas de selección positiva es *Asr2*.

Luego, sumamos para cada gen las sustituciones sinónimas o no sinónimas en todas las ramas del árbol y las dividimos por el número de sitios totales sinónimos o no sinónimos. Este valor no es una tasa de evolución propiamente dicha (ya que es la suma de distintas ramas), pero permite comparar las velocidades de evolución de los distintos genes en el género *Lycopersicon* y *Solanum*. En la figura 18, se muestran los resultados de este análisis, tomando todas las ramas del árbol o solamente las ramas después de la cladogénesis de *Lycopersicon* (se excluye *Solanum*).

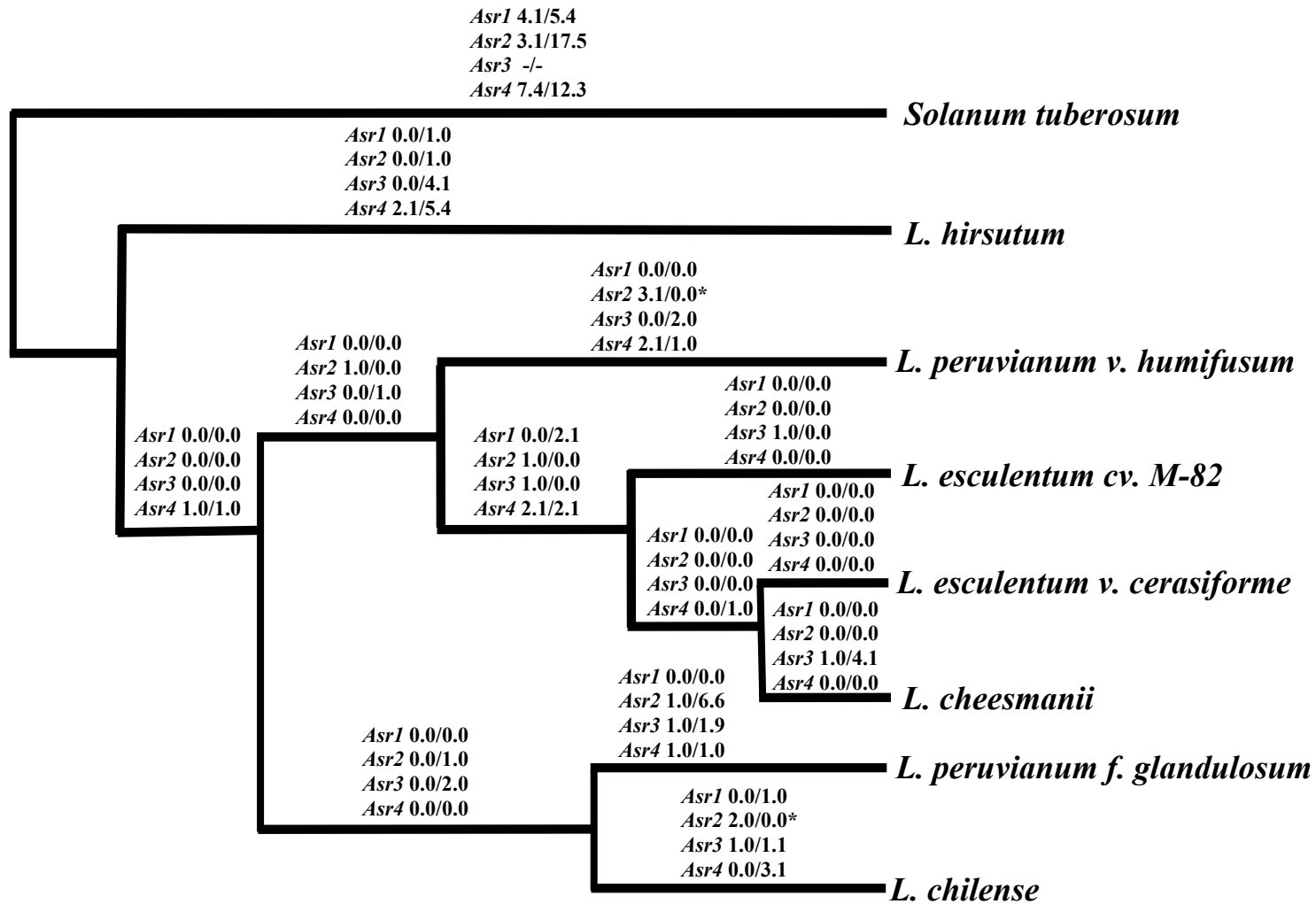


Figura 17. Filogenia del género *Lycopersicon* con el número de cambios sinónimos y no sinónimos (estimados por un método de Máxima Verosimilitud) en cada rama y para cada gen. Los asteriscos muestran las ramas con selección positiva (Frankel et al., 2003)

	<i>Asr1</i>	<i>Asr2</i>	<i>Asr3</i>	<i>Asr4</i>
S (<i>Lycopersicon</i> /árbol entero)	0.060/0.140	0.126/0.383	0.376/?	0.172/0.317
N (<i>Lycopersicon</i> /árbol entero)	0.000/0.016	0.033/0.045	0.018/?	0.023/0.043

Figura 18. Sustituciones sinónimas (s) y no sinónimas (n) en los genes *Asr* genes. En cada celda se muestran los cambios ocurridos luego de la cladogénesis de tomate (izquierda) y los cambios en el árbol entero (derecha). Las suma de las sustituciones fue normalizada por el número total de sitios de cada categoría

Algo destacable es la ausencia de sustituciones de reemplazo en *Asr1* luego de la cladogénesis de *Lycopersicon*. Esta tasa es significativamente menor ($P < 0.05$, prueba exacta de Fisher) comparada con la de los otros tres genes; que no son significativamente distintas, si se las compara por la misma prueba. A pesar de esta total conservación en *Lycopersicon*, hay cuatro diferencias con el gen de *Solanum tuberosum*. Para determinar si estos cambios se produjeron en el linaje de tomate antes de su cladogénesis o, por el contrario, en el linaje de papa, comparamos las secuencias de ASR1 de papa, tomate y pimiento (*Capsicum*). El pimiento es un pariente cercano dentro de las Solanáceas. Cuando se analizan los sitios en los que divergen papa y tomate, se ve que el tomate tiene los mismos residuos que el pimiento (figura 19). Esto sugiere fuertemente que los cambios de reemplazo ocurrieron en el linaje de papa y por lo tanto el gen ASR1 no ha sufrido cambios de reemplazo desde la separación de *Lycopersicon* de *Solanum* hace 10 millones de años.

Otro resultado destacable es el bajísimo número de sustituciones sinónimas en *Asr1* cuando se lo compara con los otros tres miembros (figura 18). La tasas sinónimas (considerando todas las ramas del árbol) son 0.140, 0.383 y 0.317 para *Asr1*, *Asr2* y *Asr4* respectivamente. Dado que no existiría *Asr3* de papa, este gen no se incluye en el análisis. La tasa de *Asr1* es significativamente menor que las de *Asr2* y *Asr4* ($P < 0.01$, prueba exacta de Fisher), mientras que las últimas dos no difieren entre sí. Dentro de *Lycopersicon* también es más baja la tasa de *Asr1* comparada con la de los otros genes. En un marco de neutralidad selectiva las tasas de sustitución sinónimas deberían ser similares entre genes (que tienen la misma tasa de mutación). Sin embargo, *Asr1* parecería tener una tasa de sustitución sinónima menor que los otros tres genes, lo que sugiere que sus sitios sinónimos podrían tener restricciones. Teniendo esto en cuenta, decidimos comparar el uso de codones entre los cuatro *Asrs* para ver si podíamos detectar diferencias de *Asr1* con el resto.

ASR1 Pimiento	MAEEEKHHHHLFHHKDKAE	E	E	E	G	P	V	D	Y	E	K	E	K	I	K	H	H	K	H	L	E	Q	I	G	K	L	G	T	A	A	A	G	A	L	H	E	K	H	E
ASR1 Tomate	MEEEKHHHHLFHHKDKAE	E	E	E	G	P	V	D	Y	E	K	E	K	I	K	H	H	K	H	L	E	Q	I	G	K	L	G	T	V	A	A	G	A	L	H	E	K	H	E
ci21 Papa	MEEEKHHHH-LFHHKDK	E	E	E	G	P	V	D	Y	E	K	E	K	I	K	H	H	K	H	L	E	Q	I	G	K	L	G	T	V	A	A	G	A	L	H	E	K	H	E
ASR1 Pimiento	AKKDPEHAHRHKIEEEEI	A	A	A	A	A	V	G	A	G	G	F	A	F	H	E	H	H	E	K	D	A	K	K	E	E	K	K	A	E	G	G	H	H	H	L	H	L	
ASR1 Tomate	AKKDPEHAHKHKIEEEEI	A	A	A	A	A	V	G	A	G	G	F	A	F	H	E	H	H	E	K	D	A	K	K	E	E	K	K	A	E	G	G	H	H	-L	F	-		
ci21 Papa	AKKDPEHAHKHKIEEEEI	A	A	A	A	A	V	G	A	G	G	F	A	F	H	E	H	H	E	K	D	A	K	K	E	E	K	K	A	E	G	G	H	H	-L	F	-		

Figura 19. Alineamiento de ASR1 de papa, tomate y pimiento. Se enmarcan las posiciones no conservadas entre los genes de papa y tomate; se puede ver que para estos sitios el residuo de tomate es igual al de pimiento.

El porcentaje de G+C ($= (G+C/G+C+A+U) \times 100$) en la tercera posición de los codones (GC_3) es un indicador del uso de codones. Dado el código genético, los aminoácidos codificados por dos codones tienen como posibles bases en su tercera posición a dos purinas (U y C) o a dos pirimidinas (A y G). Por lo tanto lo tanto, el código genético ofrece la misma cantidad de C+G que de A+U en las terceras posiciones (siempre y cuando se excluya los codones de metionina (ATG), triptofano (TGG) y uno de isoleucina (ATA); Sueoka y Kawanishi, 2000). Un uso no sesgado de los codones (sin sesgo mutacional hacia alguna base) debería arrojar un GC_3 de alrededor del 50%. De cualquier manera, dos genes con un uso similar de codones (sesgado o no) deberían tener el mismo GC_3 . Bajo neutralidad selectiva el GC_3 debería ajustarse el patrón mutacional de la región genómica en cuestión.

Calculamos el contenido de GC en las tres posiciones de la secuencia codificante de los genes *Asr* de tomate (figura 20). En efecto, *Asr1* resultó tener el contenido de GC_3 más divergente de los cuatro genes (50%). Los otros tres genes tienen un GC_3 menor que *Asr1* y su valor es cercano al promedio de 38 % para *L.esculentum*. Este último valor fue obtenido del *Codon Usage Database* (www.kazusa.or.jp/codon) y viene de promediar 1173 secuencias codificantes distintas (total de 500958 codones). Para *Arabidopsis thaliana* este promedio es similar: 42.3 % (70.492 secuencias codificantes, 27.825.665 codones).

Como mencionamos en la introducción, los aminoácidos glutámico, glicina, alanina, lisina e histidina son muy abundantes en las ASRs. Para los codones glutámico, glicina, alanina e histidina, *Asr1* tiene el mayor GC_3 (ver Figura 21). Lo contrario ocurre con la lisina, en donde *Asr1* tiene el menor GC_3 (ver Figura 21). Si se toman los

codones de glutámico, alanina, histidina y glicina y se recalcula el GC₃, la diferencia de *Asr1* con el resto de los genes se hace más pronunciada (figura 20). *Asr1* tiene un 55 %, contra el 34 % promedio de los otros tres genes. Esta diferencia

	1ra	2da	3ra	3ra E+A+H+G	Intrón
<i>Asr1</i>	71	25	50	56	26
<i>Asr2</i>	71	24	44	37	23
<i>Asr3</i>	67	29	38	35	28
<i>Asr4</i>	68	25	40	32	28

Figura 20. Porcentaje de GC en las distintas posiciones de la secuencia codificante y el intrón de los genes *Asr* de *L. esculentum*. “E+A+H+G” indica el subconjunto de codones que codifican para glutamato, alanina, histidina y glicina. En el caso de *Asr4* se analizó solamente la región que comparte con los otros genes

no se debe a distinta composición de bases en los sitios cromosómicos de los tres genes, ya que todos los intrones tienen el mismo contenido de GC y lo mismo ocurre con las primeras y segundas posiciones (figura 20). En resumen, el uso de codones en *Asr1* parece ser muy distinto al de los otros tres genes.

Análisis de la expresión de los genes *Asr* en los miembros del género *Lycopersicon* en condiciones de estrés hídrico.

Conociendo la ausencia de cambio de *Asr1* a nivel no sinónimo en *Lycopersicon*, decidimos ver si también existía conservación de los patrones de expresión ¿Está la expresión de *Asr1*, en situación de estrés hídrico, conservada en las especies del género *Lycopersicon*? ¿Qué ocurre con los otros tres genes? Para poder responder esta pregunta intentamos medir los niveles de los cuatro genes *Asr* en condiciones de estrés hídrico tanto en hoja como en raíz a tres tiempos distintos. Elegimos condiciones de estrés hídrico porque es cuando más fácilmente se detectarían estos genes (teniendo en cuenta la bibliografía). Para ello dejamos las plantas secándose en la mesada por 6 ó 24 horas y les extrajimos el RNA tanto de raíz como de hoja. Para controlar que todas las especies perdiesen similares cantidad de agua (y estuviesen, por lo tanto, con el mismo status hídrico en los distintos tiempos) medimos el contenido relativo de agua (CRA) en hojas a 0, 6 y 24 horas.

Alanina	GCT	GCA	GCC	GCG	total	% GC 3ra
<i>Asr1</i> (14)	4	7	4	1	16	31
<i>Asr2</i> (13)	7	6	2	0	15	13
<i>Asr3</i> (15)	6	7	3	0	16	19
<i>Asr4</i> (14)	8	6	2	0	16	13
Glicina	GGT	GGA	GGC	GGG	total	% GC 3ra
<i>Asr1</i> (8)	3	2	2	2	9	44
<i>Asr2</i> (9)	6	3	1	0	10	10
<i>Asr3</i> (8)	7	2	0	0	9	0
<i>Asr4</i> (9)	5	4	0	1	10	10
Glutamato	GAA	GAG	Total	% GC 3ra		
<i>Asr1</i> (17)	6	13	19	68		
<i>Asr2</i> (15)	9	8	17	47		
<i>Asr3</i> (12)	6	7	13	54		
<i>Asr4</i> (20)	11	11	22	50		
Histidina	CAT	CAC	Total	% GC 3ra		
<i>Asr1</i> (16)	8	16	24	67		
<i>Asr2</i> (16)	9	12	21	57		
<i>Asr3</i> (19)	8	9	17	53		
<i>Asr4</i> (17)	10	7	17	41		
Lisina	AAA	AAG	Total	% GC 3ra		
<i>Asr1</i> (19)	13	5	18	28		
<i>Asr2</i> (21)	7	11	18	61		
<i>Asr3</i> (16)	12	9	21	43		
<i>Asr4</i> (15)	6	13	19	68		

Figura 21. Uso de codones para los cinco aminoácidos mayoritarios en los genes *Asr*. Entre paréntesis se indica qué porcentaje de la proteína corresponde a cada uno de los cinco aminoácidos. Para *Asr4* se tuvo en cuenta sólo la región en común con los otros genes.

El contenido relativo de agua es un buen indicador del status hídrico de la planta (Hsiao, 1973) y es relativamente fácil de obtener. Las distintas especies perdieron similares cantidades de agua y tuvieron niveles comparables de contenido relativo de agua (no mostrado). Estos valores similares de CRA validan, de alguna manera, la comparación de los niveles de RNAm.

En principio, nos fue imposible detectar los genes *Asr2* y *Asr3* (tanto en raíz como en hoja) por medio de la técnica de *Northern Blot*. La sensibilidad de este método podría no ser suficiente para la detección del ARNm de estos dos genes, inclusive con varios días de exposición de las placas.

En hoja a 0 y 6 horas de desecación, *Asr1* y *Asr4* fueron indetectables. Pero a 24 horas de estrés se vieron bandas en unas cuantas especies (figura 22). Lo interesante de

este patrón, en hoja a 24 horas de estrés, es que tanto *Asr1* y *Asr4* no son detectables en las especies que habitan lugares áridos (*L.chilense* y *L.peruvianum* v.*humifusum*). Una excepción a esta observación es *Asr1* en *L.hirsutum*. Para el resto de las especies los niveles son relativamente similares para cada gen. En raíz los niveles de *Asr4* son indetectables, así como los de *Asr1* sin estrés (0 horas). A seis horas de estrés en raíz *L.chilense* tiene altos niveles de *Asr1*, lo que contrasta con la ausencia de banda en las otras especies (figura 22). A 24 horas de estrés en raíz todas las especies parecen tener niveles muy bajos de *Asr1* (resultados no mostrados).

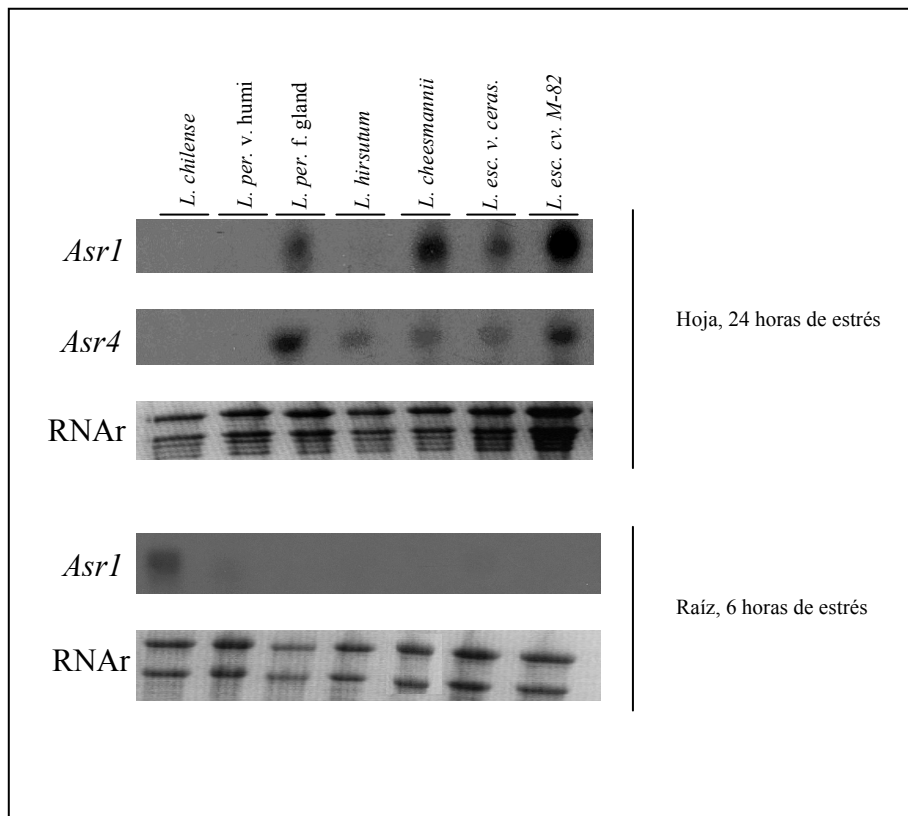


Figura 22. Expresión de los genes *Asr1* y *Asr4* en hojas y raíces estresadas hídricamente. Las bandas corresponden a ensayos de Northern Blot. Se usó el RNAr como control de carga del ARN total.

Capítulo II

En este capítulo se detallan los experimentos llevados a cabo para determinar la función del gen *Asr1* *in planta*. Con una aproximación de genética reversa intentamos descubrir que le ocurre a la planta cuando los niveles de este gen se encuentran modificados. Dado que la transformación y selección de tomates transgénicos es problemática, decidimos trabajar con dos Solanáceas cercanas para las cuales existen protocolos exitosos de obtención de transgénicas. Seguramente la función de *Asr1* estará, en general, conservada en tomate, tabaco y papa, por lo que los resultados obtenidos podrán extrapolarse de una planta a la otra.

La secuencia codificante completa del gen *Asr1* de tomate fue clonada en orientación correcta (sentido) y también en orientación antisentido en el vector de expresión pBINAR (Liu et al., 1990). El gen queda entonces bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus mosaico del coliflor (CaMV) y tiene el terminador del gen octopina sintetasa (OCS) (Figura 23). Con este plásmido se transformó *Agrobacterium tumefaciens* que luego fue utilizada para infectar discos de hoja de tabaco y papa.

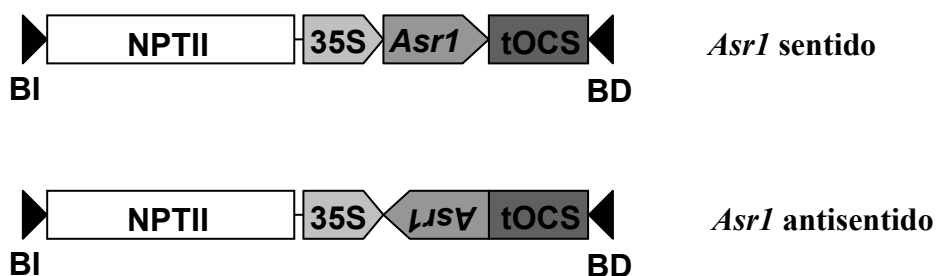


Figura 23. Esquema de las construcciones sentido y antisentido en el plásmido pBINAR, utilizadas para transformar *Agrobacterium*. “BD” y “BI” indican al borde derecho e izquierdo respectivamente del T-DNA. NPT-II es el gen de la neomicina fosfotransferasa, que confiere resistencia al antibiótico kanamicina.

Análisis fenotípico y bioquímico de plantas de papa (*Solanum tuberosum*) que sobreexpresan o tienen silenciado el gen *Asr1*.

El *screening* de las plantas de papa se hizo por la técnica de *Northern Blot*. Con una sonda de ADN se analizaron los niveles de *Asr1* en las plantas transformadas (resistentes a kanamicina) con la construcción sentido. Debido a los bajos niveles que tiene *ci21A/Asr1* en hoja, las plantas que tenían la construcción antisentido (resistentes a kanamicina) se analizaron con ribosonda para detectar si los niveles del gen estaban disminuidos. Nos quedamos con 10 líneas que sobreexpresaban y 10 que tenían silenciado *ci21A/Asr1*. A estas 20 líneas les hicimos una caracterización fenotípica inicial (de tres plantas por línea) para poder quedarnos con tres líneas sentido y tres líneas antisentido. Esta caracterización inicial consistió en tomar pesos frescos y secos de hojas y tallos y además peso fresco de tubérculos. La parte aérea de las líneas transgénicas parecía ser igual a la de las plantas *wild type*, pero se notaban diferencias en el peso de los tubérculos. Ocho de diez líneas antisentido tenían menor peso fresco en los tubérculos (no mostrado), elegimos tres de estas para seguir el trabajo. Tres de diez líneas sentido tenían un peso fresco de tubérculos levemente mayor (no mostrado) y por lo tanto las elegimos para seguir. En la figura 24 se muestran los niveles del gen *ci21A/Asr1* en las líneas seleccionadas.

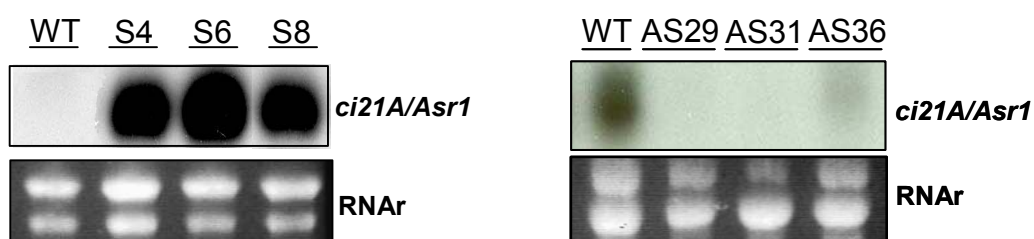


Figura 24. Niveles de expresión del gen *ci21A/Asr1* en las líneas seleccionadas. Las putativas sobreexpresantes fueron analizadas con una sonda de ADN y las antisentido con una ribosonda producto de una transcripción *in vitro*. Como se puede ver las líneas sentido tienen la letra “S” y las antisentido las letras “AS”.

Habiendo seleccionado las líneas, decidimos realizar una nueva caracterización fenotípica de las mismas, pero con más plantas (seis por línea). La idea era ver si se repetía lo que habíamos observado inicialmente en las transgénicas sentido y

antisentido. En la figura 25 se pueden ver los resultados de esta segunda caracterización fenotípica. Los únicos cambios significativos observados en más de una línea son el peso fresco de tubérculos que está disminuído en dos líneas antisentido (esto hace que el índice de cosecha sea menor) y el número de tubérculos, que es menor en las tres líneas sobreexpresantes. No se repitió la observación del *screening* inicial en el que las líneas sobreexpresantes tenían mayor peso fresco de tubérculos. En la parte aérea no parece haber diferencias (como se había visto en el *screening* inicial) entre las líneas.

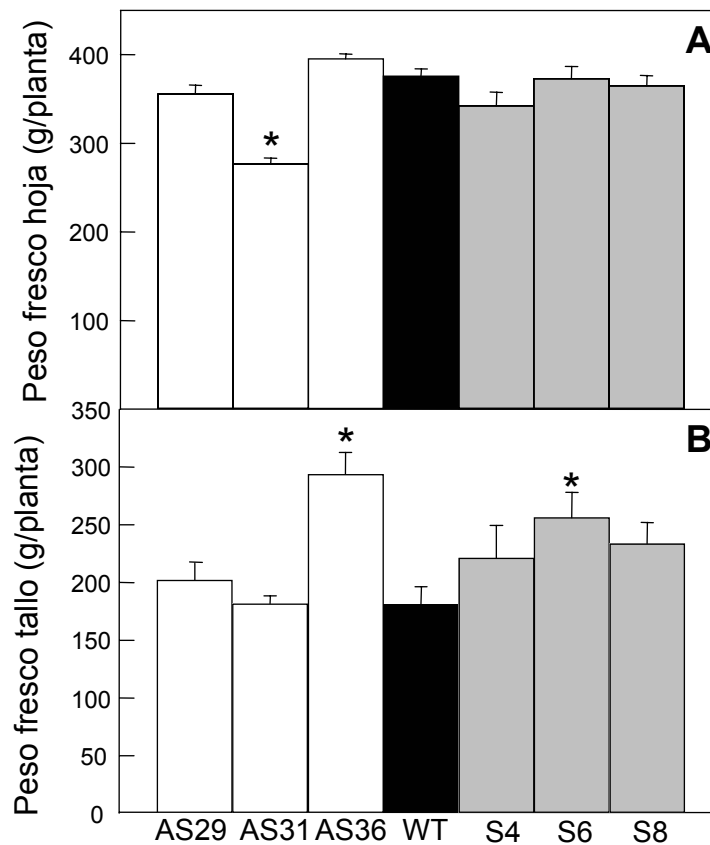


Figura 25. Fenotipo de las plantas que sobreexpresan o tienen silenciado *ci21A/Asr1*. Peso fresco de las hojas(A), tallos (B) y tubérculos (C) por planta. Número de tubérculos por planta (D) e índice de cosecha (E). Los asteriscos marcan las diferencias significativas (prueba de *Student*, $P < 0.05$, $n = 6$). Las barras de error corresponden al error standard.

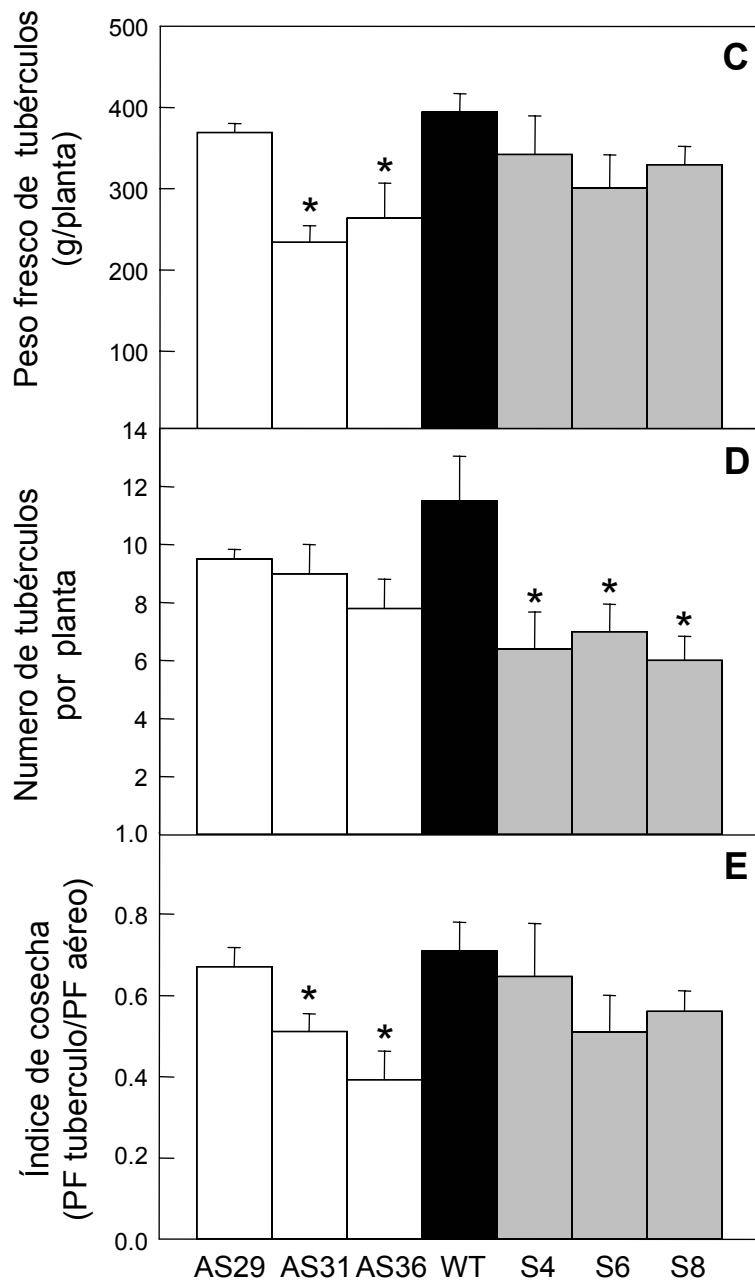


Figura 25. Fenotipo de las plantas que sobreexpresan o tienen silenciado *ci21A/Asr1*. Peso fresco de las hojas (A), tallos (B) y tubérculos (C) por planta. Número de tubérculos por planta (D) e índice de cosecha (E). Los asteriscos marcan las diferencias significativas (prueba de *Student*, $P < 0.05$, $n = 6$). Las barras de error corresponden al error standard.

Para continuar con la caracterización de la parte aérea medimos parámetros de intercambio gaseoso (asimilación de CO₂, transpiración y conductancia estomática) a distintas intensidades lumínicas en plantas *wild type*, dos líneas antisentido y dos líneas sobreexpresantes. Pudimos ver que no había diferencias entre las líneas para ninguno de los parámetros medidos (figura 26).

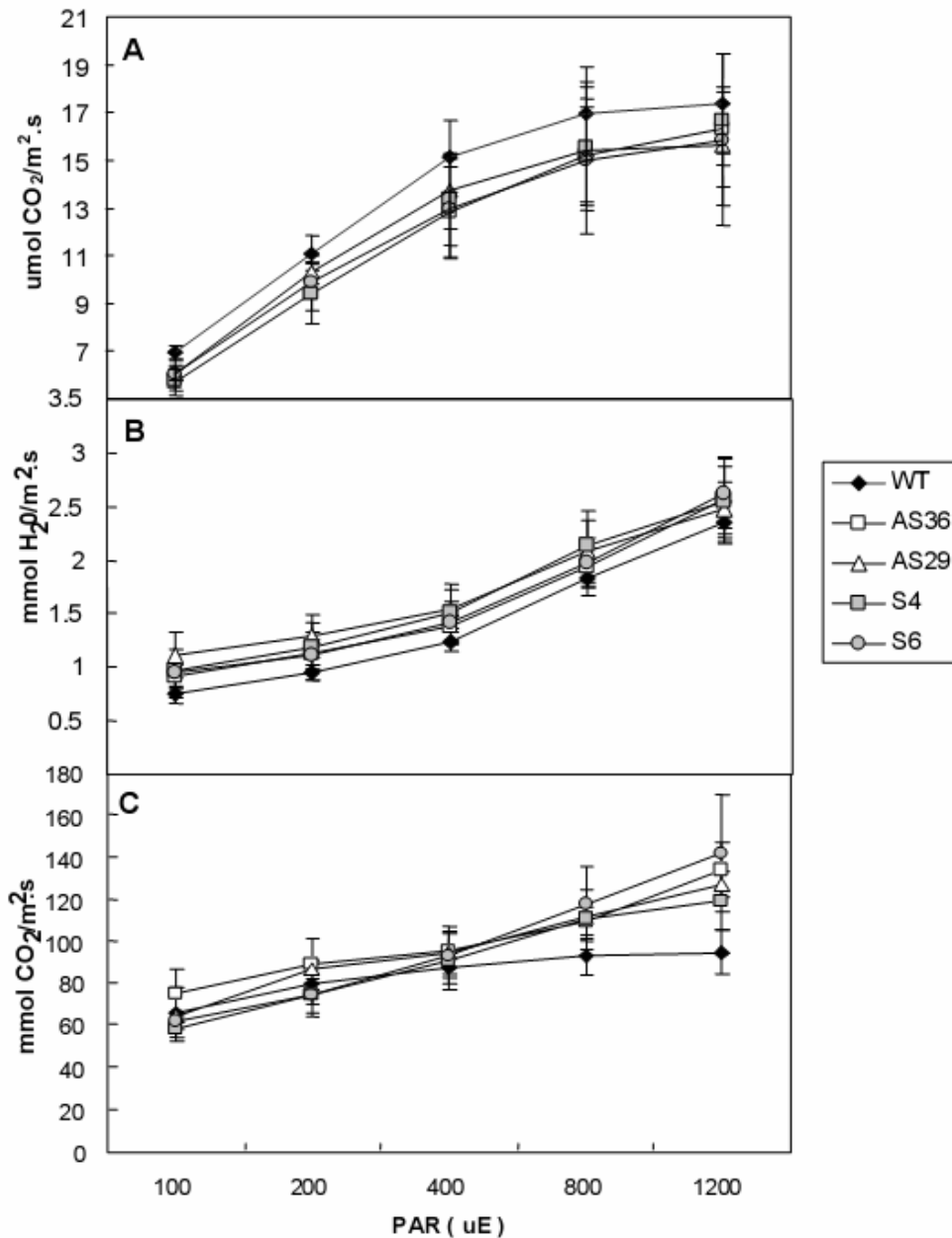


Figura 26. Asimilación de CO₂ (A), transpiración (B) y conductancia estomática (C) en las distintas líneas. Estos parámetros fueron medidos a 5 intensidades lumínicas (100 a 1200 μE). Las barras de error corresponden al error standard (n = 6).

Como ya comentamos en el capítulo I de los resultados de esta tesis, existen tres genes *Asr* decriptos en papa. Por ello quisimos ver si las plantas que expresaban *Asr1* en orientación antisentido también tenían la expresión del gen *ci21B* modificada. *Asr1* de tomate es más parecido en secuencia a *ci21A* de papa, pero también tiene alta identidad con *ci21B* (que es ortólogo de *Asr2*). Los niveles de *ci21B* en las plantas antisentido son similares a los de las plantas *wild type*; en dos líneas se ve una leve disminución que no es significativa (figura 26). Sólo una de las sobreexpresantes mostró niveles mayores de mensajero para este gen.

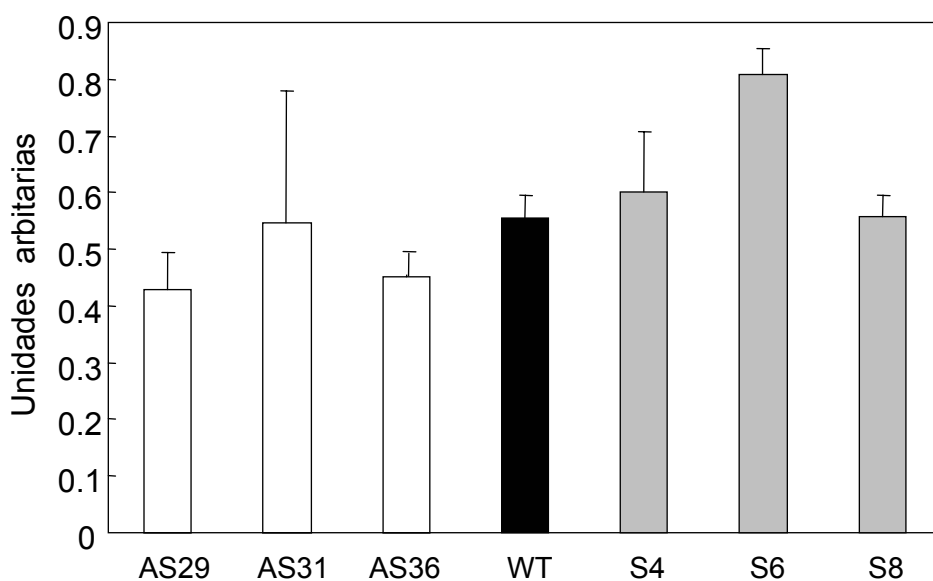


Figura 26. Niveles de ARNm (medidos por *Real-Time PCR*) del gen *ci21B* en plantas que tiene silenciado o sobreexpresan el gen *ci21A/Asr1*. Los valores respresentan el promedio de tres plantas y las barras corresponden al error standard de estas mediciones.

Para continuar con la caracterización bioquímica de estas plantas analizamos las cantidades de dos azúcares solubles (glucosa y sacarosa) y almidón tanto en hojas como en tubérculos. En hoja, medimos los niveles de los azúcares en tres puntos del día con la idea de que podría haber diferencias entre las líneas que sólo se evidenciaran en un determinado momento circadiano. No encontramos diferencias en los niveles de estos tres azúcares en ninguno de los tres momentos del día (figura 27).

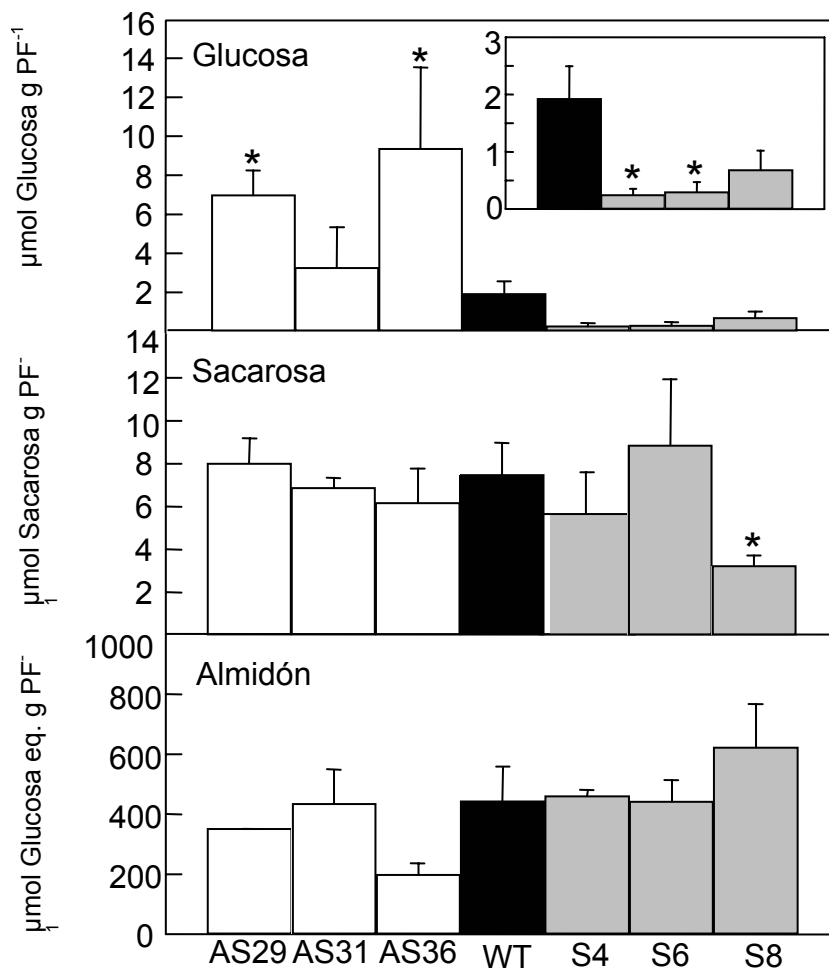


Figura 27. Niveles de glucosa, sacarosa y almidón en hojas. “CL” es el comienzo del período de luz a las 7AM, “FL” es el final del período de luz a las 21 PM, “FO” es el final del período de oscuridad a las 5 AM. Se representa la media y el error standard (n = 6). Los datos están normalizados por gramo de peso fresco (g PF).

En cambio, en los tubérculos de estas mismas plantas se vieron claras diferencias entre las líneas para la glucosa, pero no para sacarosa (salvo en la línea S8) y almidón (figura 28). En las tres líneas sobreexpresantes se encontraron menores niveles de glucosa (significativamente menores en dos líneas) comparando con las *wild type*. De manera opuesta, en las líneas antisentido los niveles de glucosa estaban aumentados (significativamente en dos líneas) con respecto a las plantas *wild type*.

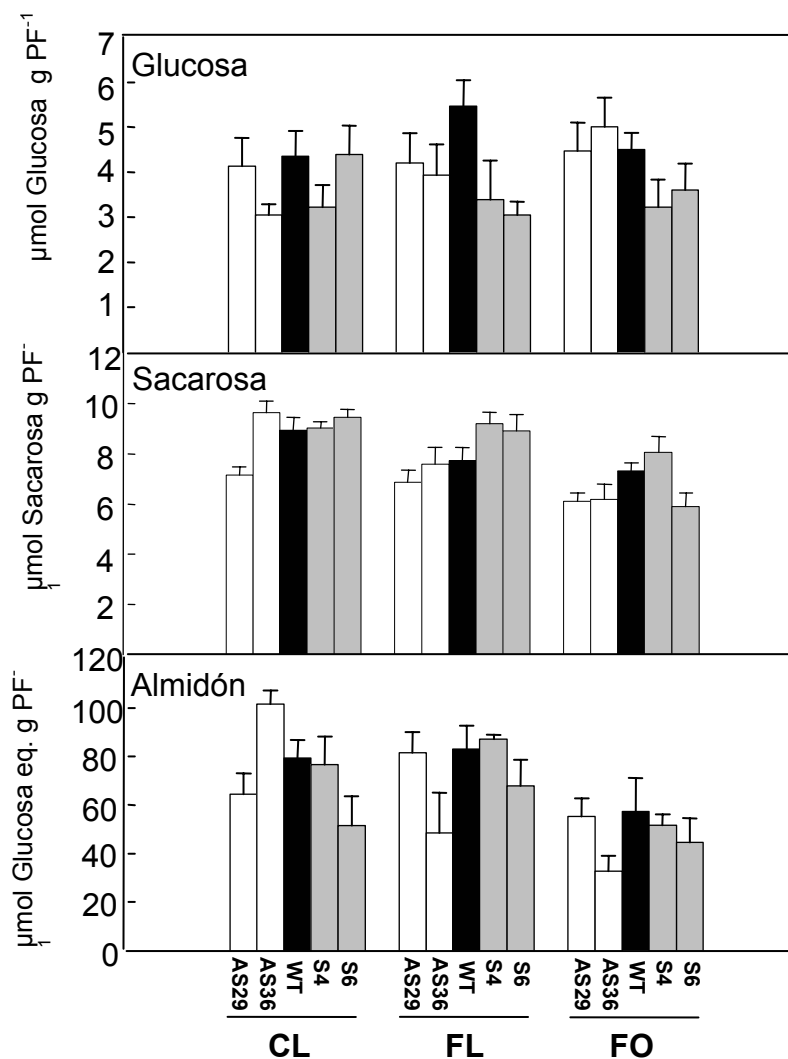


Figura 28. Niveles de glucosa, sacarosa y almidón en tubérculos. El *inset* en glucosa muestra los niveles de las líneas sobreexpresantes comparados con las plantas *wild type*. Los asteriscos marcan las diferencias significativas (prueba de *Student*, $P < 0.05$, $n = 6$). Las barras de error corresponden al error standard. Los datos están normalizados por gramo de peso fresco (g PF).

Estas interesantes observaciones con respecto al contenido de glucosa en tubérculo llevaron a que nos preguntásemos si la importación de la glucosa y la partición de lo la misma estaba modificada en las líneas transgénicas. Entonces, incubamos discos de tubérculos con glucosa marcada con ^{14}C (ver materiales y métodos para más detalles) y analizamos la importación de este monosacárido y su metabolismo. Hicimos mediciones a 2, 4, 6 y 8 horas de comenzada la incubación con $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glucosa. Dado que las tendencias fueron similares en todos los tiempos, presentamos sólo los datos de las 2 horas de incubación (figura 29).

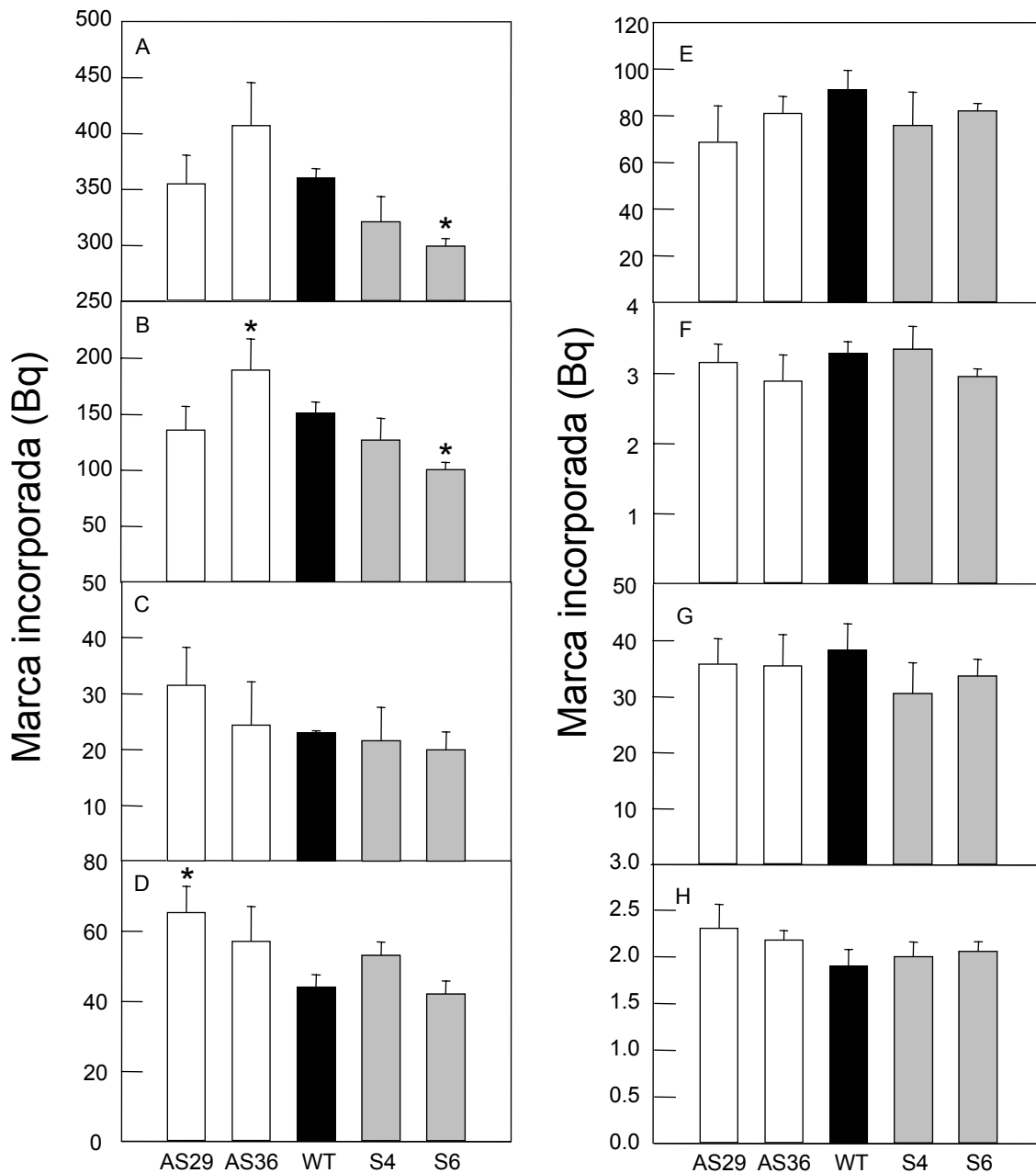


Figura 29. Importación de glucosa por discos de tubérculo en 2 horas (A) y partición en las distintas fracciones (B-H). Azúcares (B), aminoácidos (C), ácidos orgánicos (D), almidón (E), proteínas (F), pared celular (G) y CO₂ (H). Los asteriscos marcan las diferencias significativas (prueba de *Student*, $P < 0.05$, $n = 4$). Las barras de error corresponden al error standard. Bq = bequerels.

En la figura 29 se puede ver que la importación total de glucosa fue muy distinta entre las líneas; la línea AS36 mostró mayor incorporación de glucosa, mientras que las líneas S4 y S6 tuvieron menor importación (siempre con respecto al *wild type*). Estas diferencias son significativas en el caso de la línea S6 y la AS36 (no a las 2 horas, pero si a las 4 o 6 horas de incubación). La marca encontrada en los azúcares solubles (28 B)

presenta tendencias similares a las de la incorporación total. En cambio, no se encuentran diferencias en los aminoácidos, pared celular y almidón. Las líneas antisentido mostraron mayor marca en ácidos orgánicos (significativo en la línea AS29) y un concomitante aumento (no significativo) en la producción de CO₂ marcado (figuras 28 D y H). Estas últimas observaciones son consistentes con lo visto en los análisis metabólicos (ver más adelante)

Quisimos ver si las diferencias en la importación de glucosa estaban correlacionadas con una expresión diferencial de los transportadores de glucosa en tubérculos. Para ello medimos los niveles estacionarios de ARNm de tres transportadores de hexosas de la membrana plasmática. Los HTs se seleccionaron porque se expresaban en tejidos “destino” y además estaban funcionalmente caracterizados como transportadores en otras especies. Los elegidos fueron un homólogo de papa del *HvHT* (*Hordeum vulgare* STP1, Weschke et al., 2003; TC# 96617), y dos homólogos de papa del transportador *LeHT2* (*Lycopersicon esculentum* HT2, Gear et al., 2000; TC# 97054 y #111123). En la figura 30 se muestran los resultados de este análisis. El homólogo del *HvHT* muestra mayores niveles en AS36 y menores niveles en las sobreexpresantes (aunque no significativos) con respecto al *wild type*. Con uno de los homólogos de tomate (TC# 97054) se obtuvo un patrón similar, con una significativa disminución en las dos líneas sobreexpresantes. El otro HT (TC# 111123) se expresa en muy bajos niveles en tubérculo y por lo tanto las mediciones tenían un gran error entre plantas. Por ello, no presentamos los datos.

Para continuar con la caracterización de los tubérculos de las líneas analizamos los niveles estacionarios de una gran cantidad de metabolitos por la técnica de cromatografía gaseosa (GC) acoplada a espectrometría de masa (MS) (ver M y M para más detalles de esta técnica). Pudimos ver que la fructosa y muchos azúcares derivados

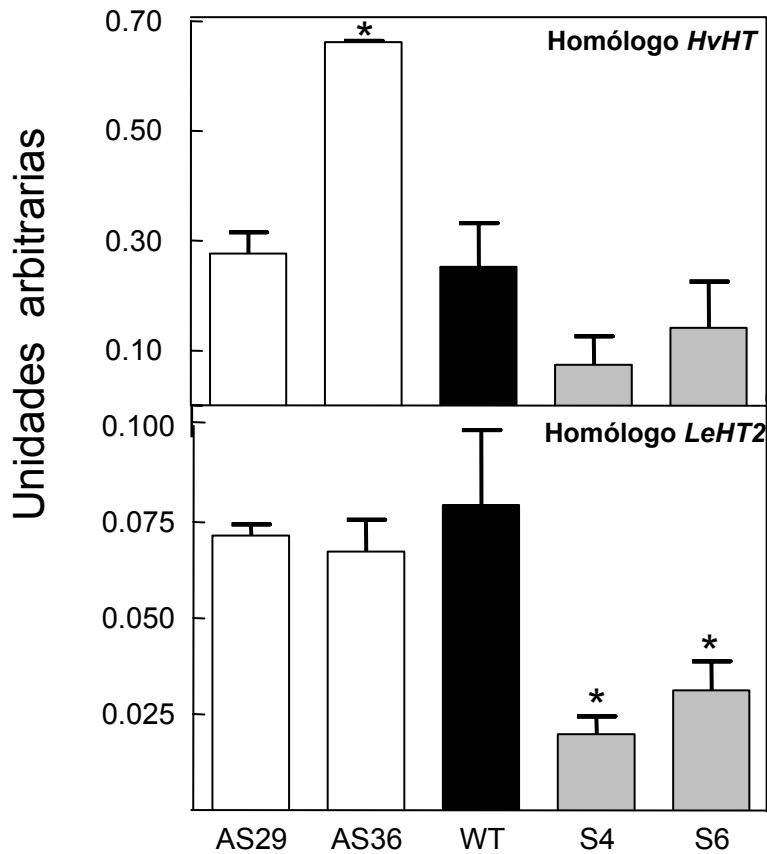


Figura 30. Niveles estacionarios de ARNm de dos transportadores de hexosas en tubérculos. Los valores representan el promedio de tres plantas y las barras corresponden al error standard de estas mediciones. Los asteriscos marcan las diferencias significativas (prueba de *Student*, $P < 0.05$, $n = 3$)

de la glucosa y la fructosa mostraban niveles significativamente mayores en las plantas antisentido (Tabla 1). Contrastando con esto, la fructosa estaba disminuida en las plantas sobreexpresantes. Asimismo, las plantas antisentido mostraron altos niveles de varios intermediarios de Krebs (isocitrato, citrato, malato y fumarato), lo que sugiere un aumento en la respiración. En las sobreexpresantes no se vieron diferencias en estos metabolitos, salvo por el succinato (Tabla 1). En cuanto a los aminoácidos, se vieron marcados descensos tanto en plantas antisentido como sobreexpresantes. Fenilalanina, aspartato, metionina, treonina y serina están en menores niveles en plantas antisentido y sobreexpresantes. Una excepción a este patrón es la prolina, que se encuentra considerablemente aumentada en dos líneas antisentido.

	AS29	AS31	AS36	WT	S4	S6	S8
Gluconico	0.52 ± 0.05	1.84 ± 0.48	1.21 ± 0.16	1.00 ± 0.03	1.52 ± 0.12	1.30 ± 0.12	1.21 ± 0.08
Quinico	0.77 ± 0.13	0.50 ± 0.05	0.85 ± 0.10	1.00 ± 0.05	1.24 ± 0.12	1.24 ± 0.10	1.48 ± 0.03
Dehydroascorbico	0.87 ± 0.15	0.80 ± 0.10	1.03 ± 0.08	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.03	0.87 ± 0.05	1.07 ± 0.06
Isocítrico	1.23 ± 0.41	2.85 ± 0.67	2.12 ± 0.91	1.00 ± 0.37	1.71 ± 0.28	1.76 ± 0.49	2.11 ± 0.51
Cítrico	1.29 ± 0.16	1.70 ± 0.42	2.27 ± 0.42	1.00 ± 0.06	1.75 ± 0.23	1.11 ± 0.12	0.99 ± 0.13
Threonico	0.96 ± 0.03	1.51 ± 0.14	1.12 ± 0.09	1.00 ± 0.05	0.89 ± 0.04	1.07 ± 0.07	0.99 ± 0.04
Málico	2.22 ± 0.35	2.73 ± 0.62	2.57 ± 0.48	1.00 ± 0.07	1.21 ± 0.35	1.27 ± 0.02	1.53 ± 0.27
Fumarico	3.43 ± 1.60	1.80 ± 0.47	2.11 ± 0.62	1.00 ± 0.12	0.87 ± 0.15	0.84 ± 0.16	0.86 ± 0.09
Succínico	0.15 ± 0.05	2.03 ± 0.61	0.48 ± 0.34	1.00 ± 0.35	0.16 ± 0.05	0.63 ± 0.13	0.23 ± 0.09
Fosfórico	1.08 ± 0.04	1.19 ± 0.07	1.28 ± 0.11	1.00 ± 0.04	1.05 ± 0.04	0.88 ± 0.11	1.06 ± 0.03

Glutamina	0.26 ± 0.03	0.81 ± 0.17	0.64 ± 0.27	1.00 ± 0.21	1.24 ± 0.34	3.74 ± 1.24	1.31 ± 0.40
Tirosina	3.40 ± 1.19	Nd	0.44 ± 0.35	1.00 ± 0.52	0.54 ± 0.22	4.91 ± 2.10	0.82 ± 0.39
Arginina	nd	1.44 ± 0.10	0.76 ± 0.39	1.00 ± 0.40	1.30 ± 0.57	2.43 ± 1.12	0.88 ± 0.37
Asparagina	0.82 ± 0.77	0.51 ± 0.39	0.57 ± 0.48	1.00 ± 0.63	1.29 ± 0.65	1.98 ± 1.09	1.17 ± 0.67
Fenilalanina	0.65 ± 0.16	0.18 ± 0.03	0.35 ± 0.07	1.00 ± 0.04	0.33 ± 0.05	1.13 ± 0.31	0.53 ± 0.06
Glutámico	1.38 ± 0.48	0.93 ± 0.29	0.82 ± 0.27	1.00 ± 0.24	2.06 ± 0.65	1.66 ± 0.59	1.76 ± 0.47
GABA	0.40 ± 0.08	1.25 ± 0.18	1.03 ± 0.27	1.00 ± 0.05	0.74 ± 0.07	0.91 ± 0.06	0.85 ± 0.04
Aspártico	0.70 ± 0.08	0.95 ± 0.31	0.75 ± 0.13	1.00 ± 0.10	0.83 ± 0.08	0.81 ± 0.10	0.88 ± 0.06
Methionina	0.77 ± 0.14	0.53 ± 0.26	0.58 ± 0.13	1.00 ± 0.10	0.57 ± 0.06	0.94 ± 0.20	0.80 ± 0.04
b-alanina	0.51 ± 0.06	0.68 ± 0.16	0.74 ± 0.07	1.00 ± 0.07	0.46 ± 0.12	1.02 ± 0.07	0.78 ± 0.11
Threonina	0.72 ± 0.17	0.44 ± 0.10	0.54 ± 0.11	1.00 ± 0.06	0.59 ± 0.04	0.82 ± 0.06	0.71 ± 0.03
Serina	0.51 ± 0.13	0.68 ± 0.17	0.57 ± 0.12	1.00 ± 0.04	0.45 ± 0.05	0.90 ± 0.03	0.76 ± 0.07
Glicina	0.77 ± 0.38	0.94 ± 0.18	0.96 ± 0.13	1.00 ± 0.26	0.99 ± 0.10	1.02 ± 0.20	1.28 ± 0.17
Prolina	14.58 ± 8.43	8.68 ± 5.19	0.53 ± 0.08	1.00 ± 0.17	1.69 ± 0.31	0.83 ± 0.13	0.76 ± 0.09
Valina	1.14 ± 0.23	0.65 ± 0.09	0.70 ± 0.06	1.00 ± 0.05	0.76 ± 0.07	1.08 ± 0.12	1.05 ± 0.03

Sorbitol/galactitol	1.10 ± 0.03	1.13 ± 0.08	1.44 ± 0.14	1.00 ± 0.02	1.14 ± 0.07	1.09 ± 0.04	1.18 ± 0.06
Manitol	2.19 ± 0.20	1.39 ± 0.17	1.63 ± 0.11	1.00 ± 0.10	0.83 ± 0.04	1.06 ± 0.14	1.15 ± 0.12
Galactosa	2.11 ± 0.66	1.04 ± 0.02	1.73 ± 0.29	1.00 ± 0.05	0.89 ± 0.15	1.03 ± 0.22	0.70 ± 0.14
Manosa	4.11 ± 0.10	1.27 ± 0.01	2.30 ± 0.38	1.00 ± 0.08	0.78 ± 0.09	1.09 ± 0.20	0.82 ± 0.12
Fructosa	7.19 ± 3.26	1.80 ± 0.35	2.34 ± 0.30	1.00 ± 0.17	0.59 ± 0.10	0.88 ± 0.19	0.42 ± 0.03

Myo-inositol-1-P	0.59 ± 0.07	1.46 ± 0.17	0.93 ± 0.12	1.00 ± 0.12	0.64 ± 0.07	0.93 ± 0.07	0.68 ± 0.07
Glucosa-6-P	1.76 ± 0.13	1.89 ± 0.19	1.85 ± 0.31	1.00 ± 0.04	1.46 ± 0.21	0.98 ± 0.09	1.54 ± 0.21
Fructosa-6-P	1.85 ± 0.15	1.96 ± 0.33	1.90 ± 0.37	1.00 ± 0.04	1.53 ± 0.23	1.01 ± 0.12	1.67 ± 0.25
Glycerol-1-P	0.92 ± 0.13	1.40 ± 0.17	1.12 ± 0.14	1.00 ± 0.03	0.69 ± 0.06	0.91 ± 0.05	0.94 ± 0.07

Tabla 1. Perfil metabólico de tubérculos de papa. Se expone el promedio ± el error standard (n = 6) normalizado por el WT. Los valores significativos están en negrita (prueba de *Student*, P<0.05). ND = no determinado.

Análisis fenotípico y bioquímico de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que sobreexpresan o tienen silenciado el gen *Asr1*.

Las plantas antisentido de tabaco fueron analizadas de la misma manera que las de papa para determinar si tenían silenciado *ci21A/Asr1*. En el caso de las sobreexpresantes pudimos ir un paso más adelante; con un anticuerpo que detecta el carboxi-terminal de *Asr1* y por medio de un *Western blot* pudimos ver que la sobreexpresión del gen traía aparejado un aumento en la cantidad de proteína (cosa que supusimos en el caso de las papas). La caracterización fenotípica de las plantas luego del *screening* inicial por expresión nos permitió elegir tres líneas sobreexpresantes y tres líneas antisentido (Figura 31). En el caso de las líneas antisentido, pudimos observar que la mayoría mostraba una drástica disminución del tamaño del tallo. Elegimos tres líneas entre todas las que resultaron ser “enanas” (Figura 32). Las plantas sobreexpresantes no tenían ningún fenotipo evidente (Figura 32) y por lo tanto seleccionamos las que mostraban una mayor cantidad de *Asr1* en el *Western blot*.

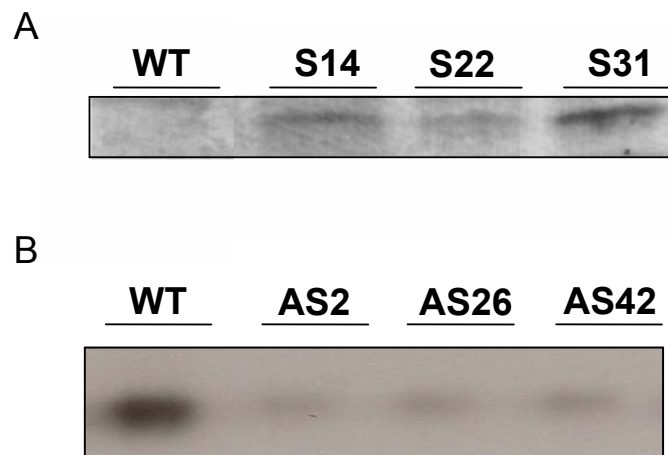


Figura 31. Análisis de la sobreexpresión o silenciamiento de *ci21A/Asr1*. (A) Niveles de ASR1 en hojas de plantas sobreexpresantes medido por *Western Blot*. (B) Niveles de *ci21A* en hojas de plantas antisentido medido por *Northern Blot* con una ribosonda específica.

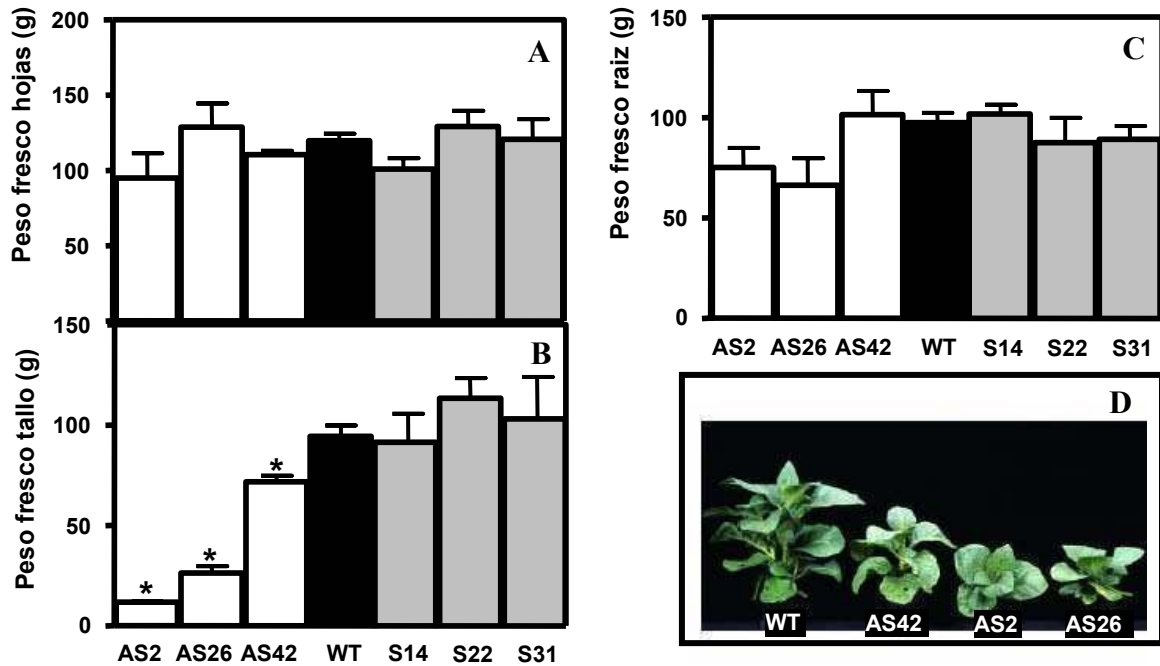


Figura 32. Fenotipo de plantas de tabaco de 8 semanas que sobreexpresan o tienen silenciado *ci21A/Asr1*. Peso fresco de las hojas (A), peso fresco del tallo (B), peso fresco de la raíz (C) e imagen fotográfica de las plantas antisentido comparadas con una *wild type* (D).

Además de sus diferencias en tamaño, las plantas antisentido tenían grandes manchas necróticas todo a lo largo de sus hojas (Figura 33)

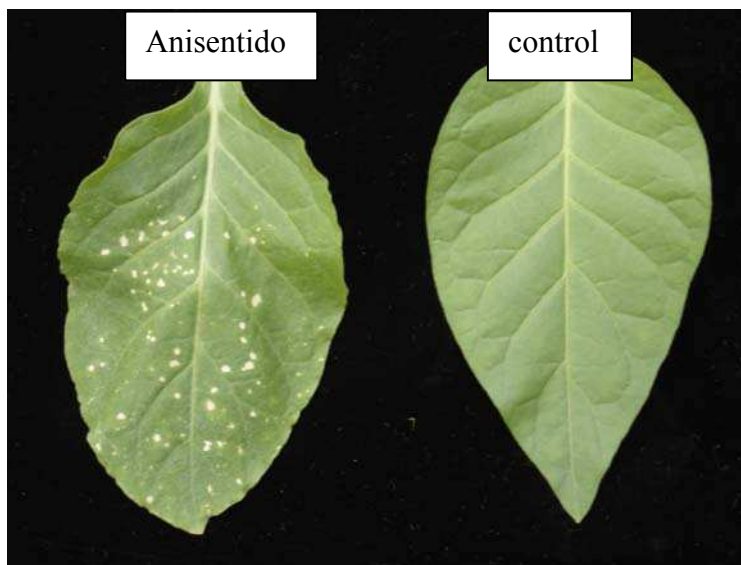
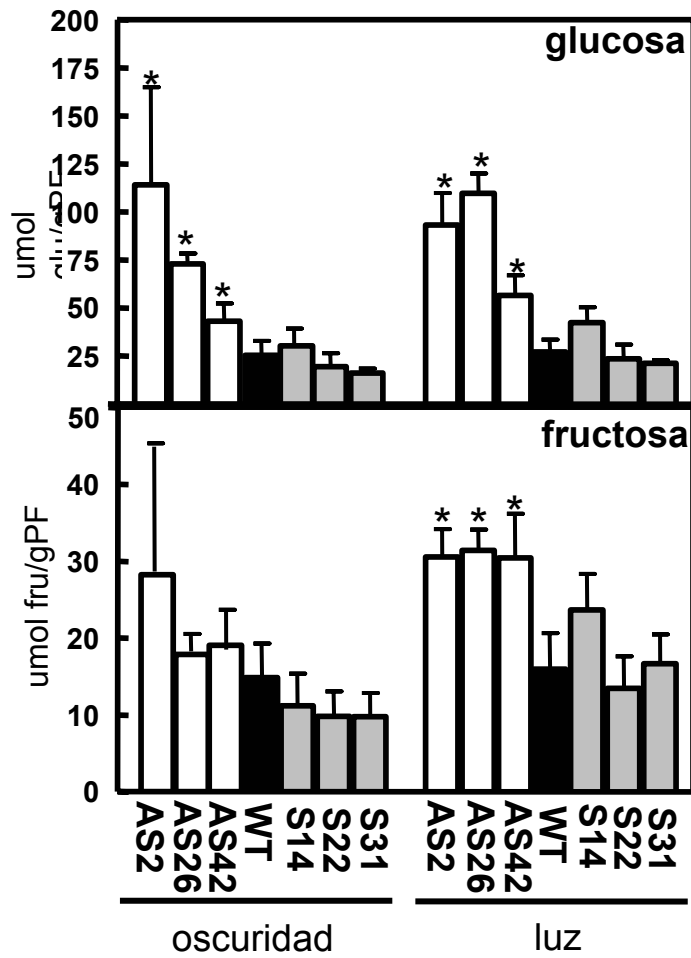


Figura 33. Fenotipo de hojas de líneas antisentido comparadas con una planta *wild type*. Se muestra la cara adaxial de la hoja

Al igual que con las plantas de papa, medimos los niveles de azúcares solubles y almidón en hojas. En este caso también pudimos detectar la fructosa y la incluimos en el análisis (Figura 34). Tomamos dos tiempos distintos del día, uno de luz (13 PM) y otro de oscuridad (5 AM). No se vieron diferencias para la sacarosa y el almidón, pero sí para las hexosas. La plantas antisentido tienen mayor contenido de glucosa que las control tanto en luz como en oscuridad. La fructosa también está aumentada en plantas antisentido, pero sólo durante el período de luz. La plantas sobreexpresantes no mostraron ningún cambio con respecto a las wild type.



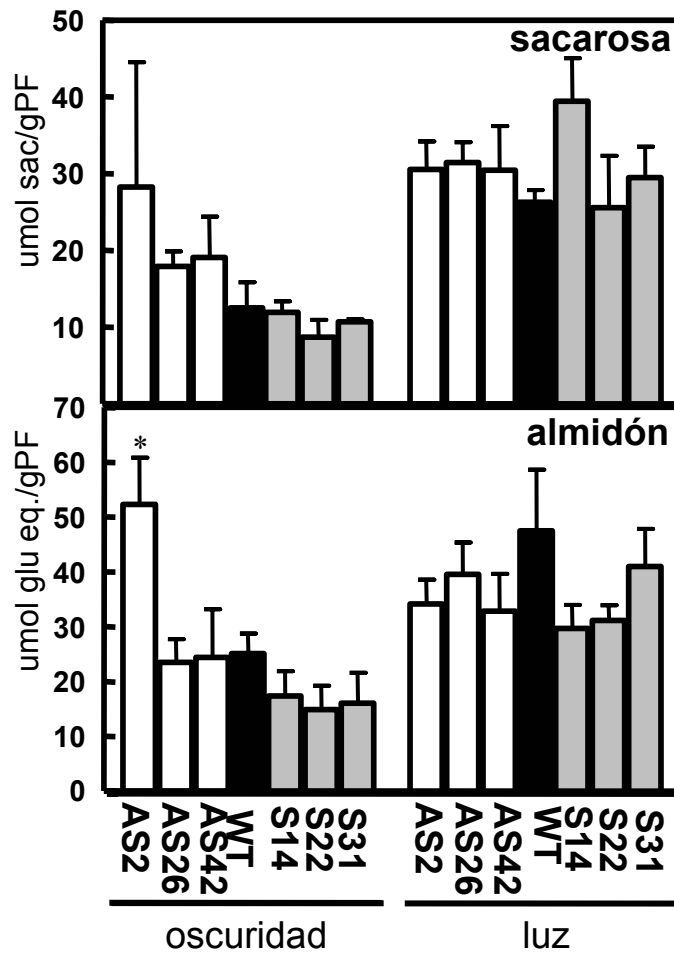


Figura 34. Niveles de azúcares solubles y almidón en plantas de tabaco que sobreexpresan o tienen silenciado el gen *Asr1*. Los asteriscos marcan las diferencias significativas (prueba de *Student*, $P < 0.05$, $n = 6$). Las barras de error corresponden al error standard. Los datos están normalizados por gramo de peso fresco (g PF).

Capítulo III

En este capítulo se detallan los experimentos llevados a cabo para determinar la estructura cuaternaria de la proteína ASR1. Antes de ello haré una brevísima introducción al porqué realizamos los ensayos que se describirán. En sucesivos ensayos de *Western Blot* con un anticuerpo contra la proteína ASR1 pudimos observar bandas específicas de 15, 30 y 45 kD (Maskin et al., en preparación). Estos ensayos fueron hechos en condiciones desnaturalizantes (SDS + β -MSH), lo que lleva a pensar que podría haber dímeros o trímeros de ASR1 con alta estabilidad. En álamo, se vio que la proteína SP1 forma oligómeros que no se desarman en un PAGE con SDS y β -MSH (Wang et al., 2002).

Para determinar si la proteína ASR1 forma oligómeros *in vitro* decidimos utilizar la técnica de microscopia de fuerza atómica (AFM). El microscopio de fuerza atómica no tiene lentes y por lo tanto sus reconstrucciones no son imágenes (pero parecen serlo); cuenta con un sensor de fuerza que al moverse va haciendo un mapa de la topografía de una superficie con un poder de resolución de nanómetros. Esta técnica permite “observar” proteínas y ácidos nucleicos (simple o doble cadena) a nivel de molécula única. Es decir, podemos “observar” una molécula de un plásmido o una molécula de proteína. Para ello es necesario purificar a homogeneidad proteínas y/o ácidos nucleicos, ya que cualquier impureza será detectada por el microscopio (de hecho, también es necesario contar con agua que esté libre de macromoléculas que puedan ser detectadas por el sensor de fuerza) Eso fue lo que intentamos hacer y finalmente pudimos obtener la proteína ASR1 pura (figura 35). Para ello clonamos la secuencia codificante de *Asr1* en un vector de expresión procariótico y purificamos la proteína de bacterias por medio de una columna de nickel (aprovechando los tractos de histidina que tiene ASR1 en su N y C terminal). Asimismo, purificamos el plásmido Bluescript SK+ por CsCl, con la idea de poder formar un complejo proteína-ADN.

La primera visualización que hicimos fue de la proteína ASR1 (en la figura 36 se muestra una foto representativa). Pudimos ver pequeñas esferas globulares de tamaño muy homogéneo, que en promedio ($n = 50$) miden $0,43 \pm 0,01$ nm de altura y $12,01 \pm 0,27$ nm de diámetro. Creemos que estas esferas son los monómeros de ASR1.

Posteriormente visualizamos el plásmido, que tiene aproximadamente 3000 pares de bases (figura 37).

Habiendo observado a la proteína ASR1 y un plásmido (por separado) y cotejando que ambos tenían el grado de pureza necesario, nos embarcamos en la tarea de poder visualizar un posible complejo proteína-ADN. Luego de varios intentos variando las concentraciones de ambos componentes, pudimos observar el complejo poniendo la proteína y ADN en una relación 10:1. Todas las moléculas de plásmido que observamos tenían proteína pegada y en la mayoría se podían detectar claramente posibles dímeros de ASR1 (en la figura 38 se muestran fotos representativas). El diámetro de estos putativos dímeros es aproximadamente el doble del diámetro (25,85 nm, $n = 20$) del supuesto monómero. Al hacer el experimento con una relación 1:1, los resultados fueron similares.

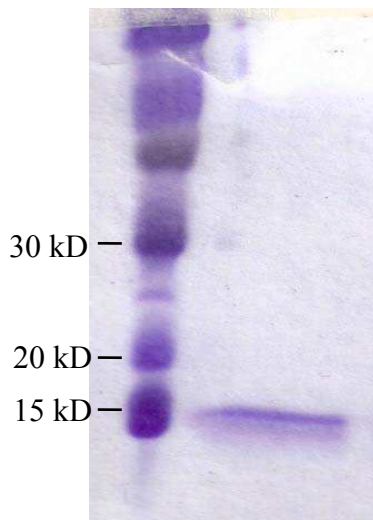


Figura 35. Purificación de la proteína ASR1. Se muestra un gel PAGE teñido con Coomassie Blue. La calle de la izquierda corresponde al marcador de peso molecular y la de la derecha a la proteína ASR1

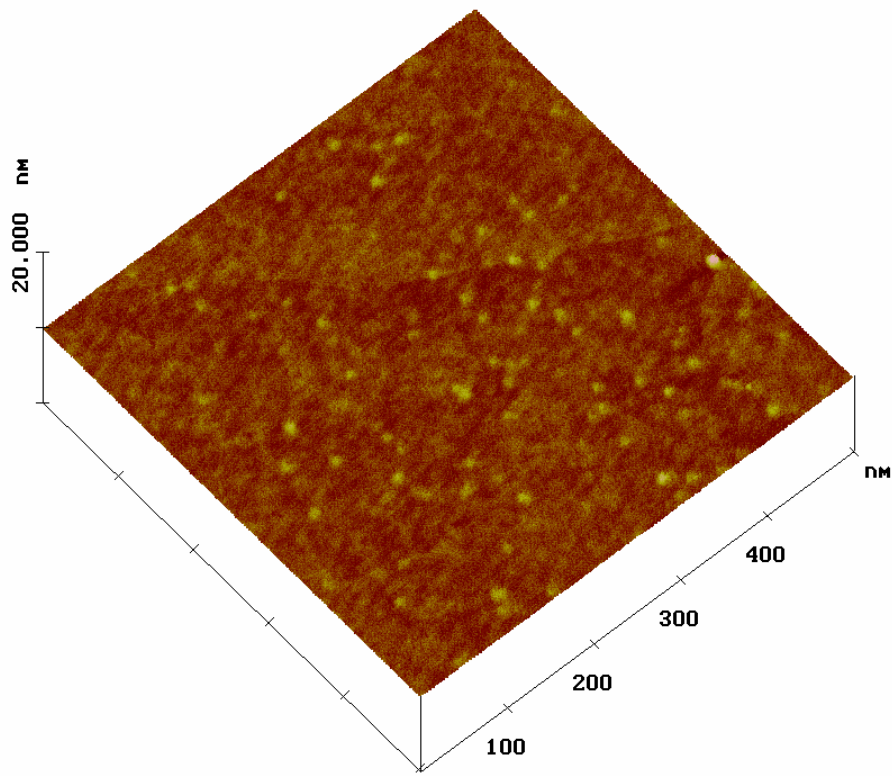


Figura 36. Visualización de ASR1 por microscopia de fuerza atómica. Las esferas amarillas corresponderían a los monómeros de la proteína. La imagen fue tomada con un microscopio NanoScope III. Las barras al costado de la imagen indican la escala de las coordenadas X, Y y Z.

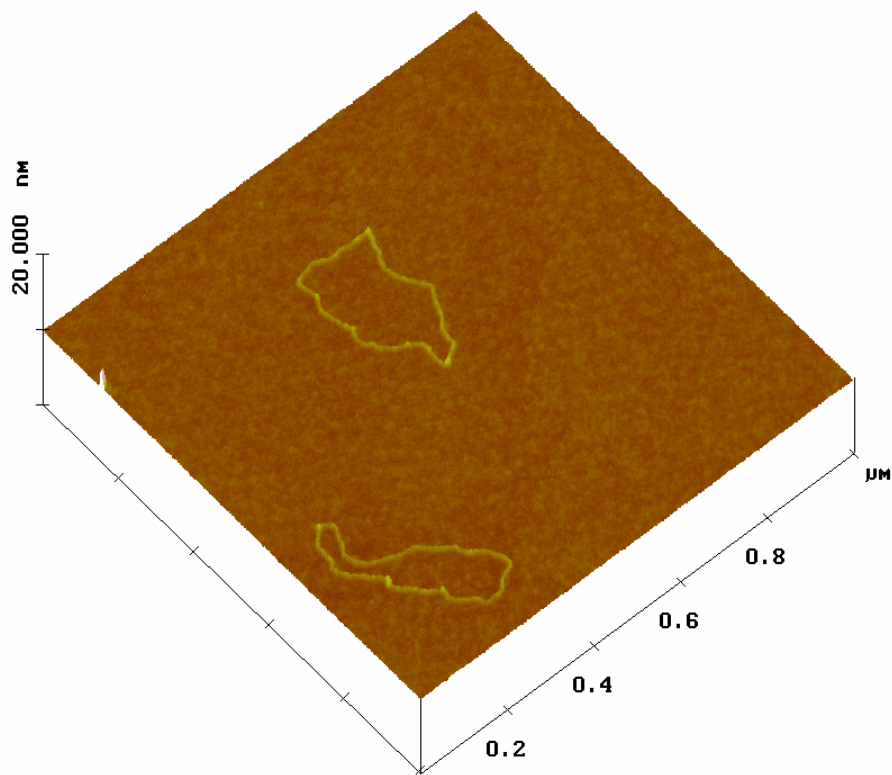


Figura 37. Visualización del plásmido Bluescript por microscopía de fuerza atómica. Se pueden ver las moléculas en estado relajado (sin enrollamiento). La imagen fue tomada con un microscopio NanoScope III. Las barras al costado de la imagen indican la escala de las coordenadas X, Y y Z.

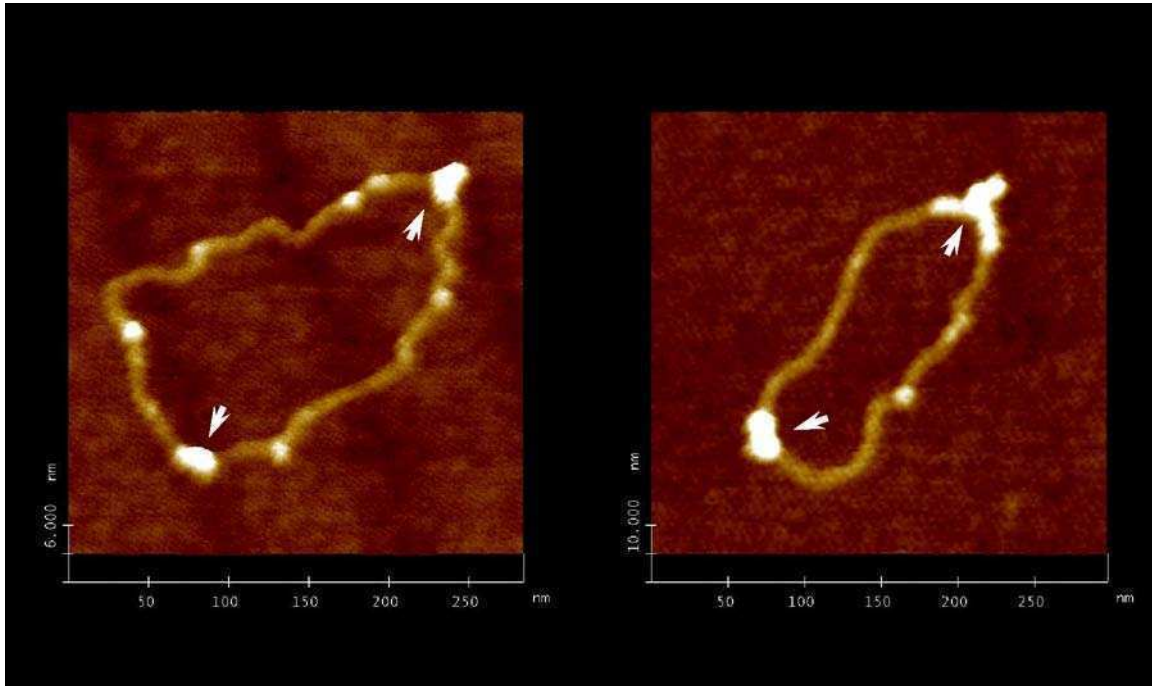


Figura 38. Visualización del complejo ASR1-ADN por microscopia de fuerza atómica. Las flechas indican los posibles dímeros. Las otras esferas blancas serían monómeros de la proteína. La imagen fue tomada con un microscopio NanoScope III. Las barras al costado de la imagen indican la escala de las coordenadas X y Z.

Discusión

Discusión del capítulo I de resultados

La primera conclusión que se puede sacar del análisis evolutivo de los genes *Asr* es que en ciertos casos los mismos presentan un mayor parecido dentro de la especie que con las especies lejanas evolutivamente. Los genes de tomate y papa se agrupan entre sí, al igual que los de la gimnosperma *Pinus taeda*. En dos especies cercanas como son papa y tomate (divergieron hace 10 millones de años; Alba et al., 2000) se pueden determinar las relaciones de ortología entre genes. Lo mismo ocurre con la mayoría de los genes de maíz y arroz, que divergieron hace 65 millones de años (Song et al., 2002). En otras familias génicas los miembros divergieron en secuencia (y en función) poco después de los eventos de duplicación y luego mantuvieron su identidad en cada una de las especies luego de numerosos eventos de especiación. Este es el caso de la familia génica de los fitocromos en plantas (Alba et al., 2000) y los genes *Hox* en animales (García-Fernández, 2005).

Este patrón de identidad intra-grupo podría estar causada por algún mecanismo de evolución concertada o nacimiento y muerte de genes. También podría ser una mezcla de estos procesos. Hay ciertas evidencias que apoyan la idea de una familia génica dinámica (en cuanto a la composición de los miembros en las especies) y por lo tanto favorecerían la idea de una evolución por nacimiento y muerte de genes. Estas evidencias son: 1) la probable ausencia de *Asr3* en papa (esta tesis) y *Asr4* en tabaco (Dóczy et al., 2005), 2) una duplicación reciente en arroz que originó a los miembros *Asr3* y *Asr4* y 3) la presencia de un solo *Asr* en vid (Cakir et al., 2003; Goes da Silva et al., 2005) y la ausencia de estos genes en *Arabidopsis*. Sin embargo, en el genoma de arroz no encontramos pseudogenes *Asr*, algo esperable estando dentro de un marco de evolución por nacimiento y muerte de genes. Quizás los pseudogenes se forman pero tienen poco tiempo de permanencia en el genoma porque son deletéreos. De cualquier manera, este modelo de evolución no tiene predicciones realmente claras sobre lo que se debería encontrar y por lo tanto no es posible aseverar en qué medida los genes de una familia evolucionan de esta manera.

Dentro de tomate, las proteínas ASR son muy similares entre sí y existen muchos aminoácidos que están conservados entre las cuatro secuencias. Esto hace que los genes se agrupen en un árbol de NJ. Esto podría indicar algún tipo de evolución concertada. Si así fuese el caso, debería haber alguna huella de que existe o existió algún proceso que está homogeneizando las copias dentro de una familia génica. Para ello se han

desarrollado pruebas que buscan conversión génica entre miembros de una familia (Drouin et al., 1999). Nosotros aplicamos una de estas pruebas (Sawyer, 1989) a los genes *Asr* de tomate. Encontramos que hubo un evento de conversión génica entre *Asr3* y *Asr4* de tomate que dejó como huella un fragmento idéntico de 62 pares de bases entre estas copias. Pero, no hallamos evidencias de conversión génica que involucren *Asr1* y *Asr2*.

Quizás, bajo un modelo puro de evolución concertada hubiésemos esperado que los *Asr* de tomate sean todavía más parecidos entre sí y se diferencien totalmente de los de papa. Lo mismo vale para arroz y maíz. En la familia del ARNr 28S (el paradigma de la evolución concertada) entre dos especie tan cercanas como humano y chimpancé los genes tienen mayor identidad con los de su propia especie (Arnheim et al., 1980). Pero sí hemos encontrado un evento de conversión génica, lo que lleva a pensar que pudieron haber ocurrido otros en la historia de esta familia. Aumenta esta sospecha la posición física cercana de los *Asr* en tomate, una condición que incrementa las probabilidades de que ocurra conversión génica (Ezawa et al., 2006). En nuestro estudio vimos que los genes de arroz son más divergentes entre sí y están ubicados en cromosomas distintos, lo que de alguna manera lleva a pensar en conversión génica en tomate.

La homogeneidad en la secuencia de los ASR de tomate seguramente es mantenida por selección purificadora sobre sitios importantes para la función de la proteína. Es posible que los pocos aminoácidos que diferencian a un gen de otro sean relevantes a nivel funcional y por lo tanto la homogeneidad en secuencia no conlleve una idéntica funcionalidad. Esta última idea es apoyada por los datos de esta tesis que muestran que hay presiones selectivas diferenciales actuando sobre *Asr1* en el género *Lycopersicon* (ver más abajo). Alternativamente, los que podría diferenciar a los genes *Asr* en tomate es su patrón de expresión. Es decir, eventos de subfuncionalización o neofuncionalización a nivel del promotor generaron copias que son totalmente necesarias en distintos tejidos o condiciones fisiológicas.

En cuanto a ASR1, su secuencia está totalmente conservada dentro del género *Lycopersicon*. Esta proteína mantuvo todos sus residuos durante 10 millones de años en todos los linajes del género *Lycopersicon*. Una posible explicación a esta baja tasa de reemplazo es la expresión ubicua de este factor de transcripción, que traería aparejada la existencia de múltiples sitios de unión en regiones promotoras. Entonces, cualquier cambio que ocurriese en la proteína podría afectar alguna de las múltiples uniones a

regiones promotoras y sería seleccionado negativamente. El gen *Asr1* se expresa en fruto, flor, semilla, raíz, tallo y hoja en condiciones normales y podría ser considerado como un gen *housekeeping*. En cambio, los otros miembros no parecen tener un espectro tan amplio de expresión en condiciones fisiológicas normales y están restringidos a ciertos órganos (Maskin et al., 2001; L. Maskin, datos no publicados; Tomato EST database). Una situación similar se ha reportado para la familia génica *Skp1*, en la que la expresión en mayor número de tejidos correlaciona con una menor tasa de sustitución de reemplazo (Kong et al., 2004).

Se sabe que el ARNm de *Asr1* se encuentra en altos niveles en la flor (Tomato EST database, www.tigr.org/tdb/tgi) y durante el desarrollo del fruto de tomate (Bovy et al., 2002). Además, el número de ESTs de este gen es considerablemente mayor que el de los otros tres genes. Los números reportados para *Asr1*, *Asr2*, *Asr3* y *Asr4* son 74, 5, 2 y 9 respectivamente. Estos ESTs vienen de distintas “bibliotecas” y representan los genes expresados en distintos órganos (se puede encontrar una descripción exhaustiva de estas “bibliotecas” en www.tigr.org/tdb/tgi). Como vimos en la introducción de esta tesis, se ha visto que la tasa de reemplazo está negativamente correlacionada con los niveles de expresión tanto en organismos multicelulares (Subramanian et al., 2004; Wright et al., 2004) como unicelulares (Rocha y Danchin, 2004; Drummond et al., 2005). En vertebrados los niveles de expresión están positivamente correlacionados con la ubicuidad en la expresión (Subramanián et al., 2004) y por lo tanto podría hacerse difícil determinar cuál de las dos variables es la que afecta la tasa de reemplazo. *Asr1* tiene expresión ubicua y alta a la vez. Seguramente alguna de estas características, o ambas en cierta proporción, están determinando la lenta evolución de esta proteína en tomate.

Otra característica saliente de *Asr1* en *Lycopersicon* es su baja tasa de sustitución sinónima comparada con los otros miembros de la familia. Una posible explicación para este hecho es que los codones sinónimos en este gen no son selectivamente equivalentes, causando una evolución dominada tanto por deriva como por selección (Ohta, 1973). En este campo, se ha encontrado una relación entre el nivel de expresión y el uso de codones en organismos unicelulares y multicelulares (Akashi, 2001). Se ha propuesto que los genes de mayor expresión “utilizan” ciertos codones que les confieren una mayor eficiencia (= rapidez) o precisión (= menor cantidad de errores) durante la traducción. En la planta *Arabidopsis thaliana*, Chiapello y colaboradores (1998) encontraron dos grupos de genes en cuanto al uso de codones. El primer grupo contiene genes de la fotosíntesis y otros considerados *housekeeping*, que exhiben un alto GC₃. El

otro grupo está formado por genes que se expresan en algunos tejidos o condiciones determinadas y cuyo tercera posición es baja en GC (lo que es similar a decir alto AT₃). *Asr1* podría incluirse en el primer grupo con sus características de *housekeeping* y su relativamente alto GC₃ (comparado con el promedio en tomate).

La ausencia de datos en tomate sobre la abundancia de los ARNt impide que conozcamos si el uso de ciertos codones se correlaciona con los *transfers* de mayor abundancia. Sin embargo, podemos aventurar que los altos niveles de expresión de *Asr1* estarían determinando su baja tasa de sustitución silenciosa. La presencia de ciertos codones en la secuencia codificante (carácter bajo selección) permitiría que este gen sea traducido con mayor rapidez y/o menos errores. Aparentemente los codones más favorecidos serían los que tienen G o C en la tercera posición (igual que lo que ocurre en *Arabidopsis*; Chiapello et al. 1998). Esta aseveración vale si se tiene en cuenta cuatro de los aminoácidos más abundantes en la proteína: glutamato, alanina, glicina e histidina. Sólo en el caso de la lisina se vio que los codones con AT₃ estaban favorecidos en *Asr1*.

En resumen, *Asr1* parece ser distinto a los otros miembros de la familia en tomate. Su secuencia codificante está extremadamente conservada en el género *Lycopersicon*; algo seguramente causado por los altos niveles y ubicuidad en su expresión. Los otros miembros de la familia parecerían estar más libres para cambiar, algo que probablemente confirió a *Asr2* la potencialidad para evolucionar por selección positiva durante la adaptación de ciertas especies a lugares áridos (Frankel et al., 2003).

Con respecto a *Asr4* de tomate, podemos decir que este gen está ubicado cerca de los otros tres genes en el cromosoma IV. La proteína codificada por *Asr4* es más grande que las otras tres, ya que tiene una región extra de 186 aminoácidos que repite imperfectamente una secuencia de 13 aminoácidos. Las búsquedas en bases de datos (que identificaran secuencias con identidad en otras especies) no dieron pistas claras de cuál podría ser la función de este “dominio”. Dentro de la repetición de 13 aminoácidos está el motivo Serina-Tirosina-Glicina: este motivo está también presente varias veces en proteínas que responden a estrés en *S.cerevisiae* (Treger y McEente, 1990). Asimismo, este tripéptido se encuentra como mínimo 10 veces en proteínas con función desconocida del hongo *Ashbya gossypii* (Genbank # NM210779) y *Plasmodium falciparum* (Genbank # AAC47854).

Nuestro datos de expresión de *Asr1* en hoja estresada hídricamente en distintas especies de tomate nos permiten concluir que la activación no está conservada filogenéticamente (a diferencia de la secuencia codificante). Esta disparidad podría estar causada por diferencias en la región promotora del gen que responde al estrés (cis) o por proteínas que activan la expresión de *Asr1* (trans). La obtención de un similar patrón de activación en *Asr4* (= se activa en las mismas especies *Asr1*) lleva a pensar que son cambios en trans que determinan la transcripción de más de un gen. Fue interesante ver que las especies que habitan lugares áridos no mostraron expresión de estos dos genes en hoja estresada, lo que lleva a pensar que tienen una distinta respuesta génica ante condiciones de estrés. A pesar de esto, se pudo ver la expresión de *Asr1* en raíz de *L.chilense* estresada por 6 horas, mientras que en las demás especies no se detectó la presencia de este ARNm. Esta apoya aún más la idea de una respuesta génica distinta en las especies de lugares áridos. En fin, la respuesta de expresión génica de *L.chilense* ante el estrés podría ser distinta y merece ser analizada a gran escala (midiendo muchos genes a la vez).

Discusión del capítulo II de resultados

Como discutimos en párrafos anteriores, el gen *Asr1* tiene características diferentes al resto de la familia *Asr* de tomate. Estas cualidades podrían indicar una mayor importancia en la planta. Por lo tanto, este fue el blanco para nuestros estudios funcionales. En el capítulo II de resultados describimos lo obtenido al analizar el fenotipo de plantas que sobreexpresan o tienen silenciado el gen *ci21A/Asr1*. El efecto de esta modificación genética fue analizado desde el punto de vista morfológico, bioquímico y molecular.

En general, el fenotipo de la parte aérea de las plantas de papa transgénicas fue similar al de las plantas *wild type*. Hubo cambios significativos en el peso de tallos y hojas, pero no se observaron en más de un línea sobreexpresante o antisentido. Por lo tanto no podemos atribuir estos cambios al transgén *Asr1*. Asimismo, no se vieron diferencias (en tres momentos distintos del día) en el contenido de glucosa, sacarosa y almidón en las hojas de las líneas de papa transgénicas con respecto a las control. Tampoco se vieron diferencias entre las líneas en la asimilación de CO₂, la tasa de

transpiración y la conductancia estomática. Todo esto lleva a la conclusión de que el metabolismo foliar en papa no se modificó por la sobreexpresión o silenciamiento de *ci21A/Asr1*. A la vez, que las plantas tengan similar tasa fotosintética, y sus azúcares no muestren diferencias durante el día, hace pensar que la carga de azúcares al floema será similar entre las líneas (Strand et al., 2000).

Hay por lo menos dos explicaciones para la falta de efecto del transgén en hojas de plantas de papa. Primero, y suponiendo que *ci21A/Asr1* está involucrado en modular a transportadores de hexosas, no se conoce si estos tienen una función importante en la hoja madura (tejido fuente). Lo que se conoce de estos transportadores fue estudiado en tejidos heterotróficos (Sherson et al., 2003; Weschke et al., 2003). Algo que sí se sabe de los transportadores en hojas, es su rol en la importación de glucosa para el funcionamiento de los estomas (Staedler et al., 2003). Pero esta última función parecería ser independiente de *ci21A/Asr1* ya que las propiedades estomáticas (en condiciones normales) no se modificaron en las líneas transgénicas. También es posible que *ci21A/Asr1* afecte sólo una parte de los transportadores y que los *ci21A/Asr1* independientes suplan al resto.

En segundo lugar podría ser que los cofactores necesarios para la función de *ci21A/Asr1* no estén presentes en hoja en condiciones fisiológicas normales. Schneider y colaboradores (1997) demostraron que la proteína CI21A sólo se encuentra en tubérculo en condiciones normales (= sin estrés). Entonces, se podría pensar que en hoja no estresada los cofactores de *ci21A/Asr1* están ausentes. En el futuro sería interesante observar si el fenotipo foliar se modifica en las líneas transgénicas luego o durante la aplicación de estrés hídrico.

Contrastando la situación en hojas, los tubérculos se ven claramente afectados por el transgén. Dos líneas antisentido tuvieron un menor peso fresco en los tubérculos, lo que llevó a una disminución del índice de cosecha. No tenemos pistas claras de las causas de este fenotipo. Podría estar de alguna manera relacionado con los altos niveles de glucosa. Las líneas sobreexpresantes desarrollaron menos tubérculos, pero el peso fresco total no se vio afectado. Esto podría estar causado por una deficiente importación de azúcares por vía apoplástica (una vía relevante en la tuberización; Fernie y Willmitzer, 2001) durante la formación de los tubérculos (ver más abajo la discusión de los experimentos de importación de glucosa).

En cuanto a los azúcares en tubérculo, no se vieron diferencias en la sacarosa y el almidón entre las líneas; pero se observaron interesantes diferencias en los contenidos

de glucosa. Las plantas sobreexpresantes tienen menor y las antisentido mayor cantidad de glucosa que las plantas *wild type*. Esto implica que hay una correlación negativa entre la cantidad de glucosa en la planta y los niveles de *ci21A/Asr1*. Del resto de los metabolitos analizados en tubérculo, ninguno muestra esa correlación, lo que deja entrever que *ci21A/Asr1* estaría modulando los niveles de glucosa en este órgano. Los altos niveles de glucosa en las plantas antisentido están acompañados por un aumento en otros azúcares solubles como la fructosa, la manosa, y las hexosas fosfato. En cambio, en las plantas sobreexpresantes la fructosa (al igual que la glucosa) está disminuida.

Para nuestra sorpresa, vimos que muchos aminoácidos tienen niveles bajos tanto en tubérculos de plantas sobreexpresantes como antisentido. En plantas con altos niveles de sacarosa (Roessner-Tunali et al., 2003) se observó el mismo fenómeno, lo que podría homologarse con lo que pasa en las plantas antisentido. Pero, llamativamente, esto también ocurre en las plantas sobreexpresantes. En fin, no sabemos exactamente a qué se debe este cambio metabólico en los aminoácidos, pero seguramente se halla relacionado con el contenido de azúcares.

Un cambio metabólico destacable es el aumento de la prolina en dos líneas antisentido. La prolina es un soluto compatible que ayuda a mantener la turgencia durante condiciones de deshidratación (atrayendo agua por presión osmótica) y protegería del daño a las proteínas. En este sentido, es posible que haya una relación entre *ci21A/Asr1* y la prolina. En este mismo sentido va el hallazgo de Kalifa y colaboradores (2004): plantas de tabaco que sobreexpresan *Asr1* acumularon menos cantidad de prolina en hoja en condiciones de estrés salino.

Los experimentos con glucosa marcada revelaron que los tubérculos sobreexpresantes tienen una menor importación de esta hexosa. Concomitantemente, estos tubérculos tenían menores niveles de ARNm de dos transportadores de hexosas de membrana. En el caso de las plantas antisentido las evidencias no fueron tan contundentes: la importación de glucosa estaba aumentada en una sola línea. Lo notable es que esta misma línea mostró altos niveles de uno de los transportadores analizados. Estos datos (junto con lo analizado anteriormente) llevan a pensar que *ci21A/Asr1* está involucrado en el control de la importación de glucosa en tejidos heterotróficos. Otra posibilidad, que no podemos descartar, es que este gen esté relacionado con la detección del nivel de glucosa. En este marco, la sobreexpresión de *ci21A/Asr1* estaría

desencadenando una incorrecta “sensación” de alta glucosa y por lo tanto disminuiría la tasa de incorporación de glucosa. Lo contrario estaría pasando en las plantas antisentido. Sin embargo, los experimentos de Cakir y colaboradores (2003), que demostraron que un ASR se une al promotor de un transportador de hexosas, apoyan en mayor medida la teoría de que el gen está involucrado en la regulación del transporte de glucosa en tubérculos. Además, la localización subcelular de *Asr1* en células acompañantes del floema (L.Maskin, resultados no publicados) sugiere que este gen puede estar relacionado con la movilización de azúcares. En vid, el transportador de hexosas controlado por ASR también se expresa en células acompañantes del floema (Vignault et al., 2005).

Las plantas de tabaco que tienen silenciado el gen *Asr1* tuvieron también un fenotipo interesante, pero a diferencia de las de papa, se observó en la parte aérea. Los tallos de estas líneas son significativamente más pequeños que los de las plantas *wild type*. El mismo fenotipo fue observado en unas plantas de tabaco sobreexpresantes (en toda la planta) de una invertasa citosólica (Canam et al., 2006). Además, las hojas de estas plantas tienen zonas necróticas fácilmente observables en la hoja.

Cuando se analizan los niveles de los azúcares solubles y el almidón en hojas de plantas *Asr1*-antisentido se observan también diferencias. La glucosa tanto en luz como en oscuridad está aumentada con respecto a las plantas control. Lo mismo ocurre con la fructosa en el período de luz (pero no en oscuridad). Ni en la sacarosa ni el almidón se ven diferencias comparando con las plantas *wild type*. Estos datos llevan a dos conclusiones relevantes: 1) el gen *Asr1* no está involucrado en la regulación de los niveles de sacarosa ni almidón ya que tanto plantas de papa como de tabaco (que tienen modificados los niveles de este gen) no mostraron cantidades anormales de estos azúcares. Pero sí está involucrado de alguna manera en la regulación de los niveles de hexosas, ya que tanto en papa, en un órgano destino, como en tabaco, en un órgano fuente, las cantidades de glucosa y fructosa se hallaron modificadas 2) En tabaco, las hojas parecen responder al silenciamiento del gen *Asr1*, cosa que no pasaba en papa. Recordemos que en hojas de papa no había modificaciones en los niveles de azúcares en las plantas *Asr1*-antisentido. En ambas especies se analizaron los azúcares en condiciones fisiológicas normales. Esto lleva a pensar que podría haber una “utilización” diferente de los genes *Asr* en hoja de tabaco y de papa. Sabemos que en hoja de papa el

gen *ci21A/Asr1* no se expresa en condiciones normales ni ante un tratamiento con ABA (Schneider et al., 1997). Lamentablemente no tenemos datos de la actividad de *Asr1* en hojas de tabaco lo que nos impide hacer una comparación con plantas de papa.

En este momento estamos intentando analizar la incorporación de glucosa en discos de hoja de tabaco (de las distintas líneas transgénicas). A la vez, planeamos medir los niveles de ARNm de un transportar de hexosas que tiene actividad en las hojas. Deseamos, también, conocer las causas del fenotipo enano y la presencia de las manchas necróticas en hojas de los tabacos antisentido

Discusión del capítulo III de resultados

Sabíamos por estudios de otro laboratorio que la proteína ASR1 tiene afinidad por el ADN en presencia de zinc y que tiene preferencia (medida por un ensayo de SELEX) por la secuencia C₂₋₃(C/G)A (Kalifa et al., 2004). Este mismo laboratorio reportó el “mapeo” de la región de unión a zinc y de pegado a ADN en la proteína (Rom et al., 2006). Asimismo, teníamos indicios (por experimentos de nuestro laboratorio) que indicaban que ASR1 podría formar dímeros o trímeros muy estables. Estos indicios se basaban en geles de poliacrilamida con agentes desnaturizantes que mostraban bandas correspondientes al doble y al triple del peso molecular de ASR1.

Nosotros visualizamos la proteína y su unión al ADN por medio de microscopia de fuerza atómica (AFM). Estos ensayos nos brindaron la posibilidad de ver si efectivamente ASR1 forma dímeros en presencia o ausencia de ADN. Para realizar estos experimentos debimos primero purificar la proteína de bacterias, cosa que hicimos con una columna de nickel aprovechando los dos tractos de histidina que tiene ASR1.

En un principio observamos la proteína sola (sin ADN). Logramos ver esferas muy pequeñas, algo esperable dado el peso molecular de la proteína (13 kD). El tamaño de estas esferas era homogéneo, con un promedio de 12 nanómetros. Pero en ninguno de los campos observados detectamos alguna estructura que hiciera pensar en un dímero o trímero del supuesto monómero observado. Es posible que la interacción con el soporte de mica “desarme” los dímeros de ASR1. En este caso la proteína está interaccionando directamente con la mica (cosa que no ocurre cuando se incuba con ADN). También es

factible que haya algún otro factor necesario para que ocurra la oligomerización de ASR1 que no está presente cuando se purifica la proteína.

Para poder ver el un complejo proteína-ADN purificamos un plásmido de 3 Kb, que sería fácilmente observable con el microscopio de fuerza atómica. Incubamos la proteína y el plásmido en relación 10:1 y 1:1 obteniendo los mismos resultados: todas las moléculas de plásmido observadas tuvieron proteína pegada. Esto corrobora el descubrimiento hecho por Kalifa et al. (2004). En la mayoría de los complejos pudimos observar posibles dímeros de la proteína ASR1, luego de verificar que había dos estructuras distintas asociadas a los plásmidos. Se pudieron ver claramente los supuestos monómeros de ASR1 y en la misma molécula una estructura de aproximadamente el doble de diámetro con apariencia de dos esferas juntas. Esto lleva a pensar que los dímeros de ASR1 existen, por lo menos cuando la proteína está asociada al ADN.

El plásmido Bluescript tiene la secuencia $C_2(C/G)A$ numerosas veces dado que la misma es pequeña; se espera encontrar cada 128 pares de bases. Intentamos medir la distancia entre las moléculas de ASR1 pegadas a los plásmidos para ver si existía algún patrón que indicase la unión a ciertas regiones en particular. No pudimos encontrar nada concluyente luego de un análisis laborioso. La mejor manera de confirmar la especificidad de ASR1 por la mencionada secuencia sería con el uso de un fragmento de ADN lineal y pequeño y con pocos sitios putativos de pegado.

La dimerización de un factor de transcripción en el pegado al ADN no es algo novedoso para la Biología Molecular. La familia de factores de transcripción basic-helix-loop-helix (bHLH) muestra este comportamiento (Toledo-Ortiz, 2003). Lo mismo ocurre con algunas proteínas de las familias MADS box (Immink et al., 2002) y bZIP (Mechta-Grigoriou et al., 2003).

Hemos aportado evidencia que apoya la dimerización de ASR1 en el pegado a ADN. Seguimos sin conocer lo que le ocurre a la proteína en solución, con a sin ADN. Para ello se puede usar la técnica de AFM, pero sin secar la muestra, lo que permite observar partículas en solución. Estos son posibles experimentos para realizar en el futuro.

Bibliografía

Akashi H. Gene expression and molecular evolution. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11(6):660-6.

Akashi H, Eyre-Walker A. Translational selection and molecular evolution. *Curr Opin Genet Dev.* 1998;8(6):688-93.

Alba R, Kelmenson PM, Cordonnier-Pratt MM, Pratt LH. The phytochrome gene family in tomato and the rapid differential evolution of this family in angiosperms. *Mol Biol Evol.* 2000;17(3):362-73.

Alexander LJ. Transfer of a dominant type resistance to the four known Ohio pathogenic strains of tobacco mosaic virus (TMV) from *Lycopersicon peruvianum* to *L. esculentum*. *Phytopatology* 1963; 61: 611-617.

Alexander LJ, Hoover MM. Progress report of national Screening Committee for disease resistance in tomato. For 1952. U.S. Dept. Agriculture. Plant disease reporter suppl. 1953; 136: 51-84.

Amitai-Zeigerson H, Scolnik PA, Bar-Zvi D. Genomic nucleotide sequence of tomato *Asr2*, a second member of the stress/ripening-induced *Asr1* gene family. *Plant Physiol.* 1994;106(4):1699-700.

Arnheim N, Krystal M, Schmickel R, Wilson G, Ryder O, Zimmer E. Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on nonhomologous chromosomes in man and apes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77(12):7323-7.

Atanassova R, Leterrier M, Gaillard C, Agasse A, Sagot E, Coutos-Thevenot P, Delrot S. Sugar-regulated expression of a putative hexose transport gene in grape. *Plant Physiol.* 2003;131(1):326-34.

Baxter CJ, Carrari F, Bauke A, Overy S, Hill SA, Quick PW, Fernie AR, Sweetlove LJ. Fruit carbohydrate metabolism in an introgression line of tomato with increased fruit soluble solids. *Plant Cell Physiol.* 2005;46(3):425-37.

Bierne N, Eyre-Walker A. The genomic rate of adaptive amino acid substitution in *Drosophila*. *Mol Biol Evol.* 2004;21(7):1350-60.

Bohs L, Olmstead RG. *Solanum* phylogeny inferred from chloroplast DNA sequence data. En M. Nee, D. E. Symon, R. N. Lester y J. P. Jessop editores, *Solanaceae IV, advances in biology and utilization* 1999; 97–110. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.

Bovy A, de Vos R, Kemper M, Schijlen E, Almenar Pertejo M, Muir S, Collins G, Robinson S, Verhoeyen M, Hughes S, Santos-Buelga C, van Tunen A. High-flavonol tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes *LC* and *C1*. *Plant Cell.* 2002;14(10):2509-26.

Bray EA. Drought- and ABA-Induced Changes in Polypeptide and mRNA Accumulation in Tomato Leaves. *Plant Physiol.* 1988;88(4):1210-1214.

- Bray,EA. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology* 1993; 103: 1035-1040.
- Buttner M, Sauer N. Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1465(1-2):263-74.
- Cakir B, Agasse A, Gaillard C, Saumonneau A, Delrot S, Atanassova R. A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell*. 2003;15(9):2165-80.
- Canam T, Park JY, Yu KY, Campbell MM, Ellis DD, Mansfield SD. Varied growth, biomass and cellulose content in tobacco expressing yeast-derived invertases. *Planta*. 2006; en prensa.
- Canel C, Bailey-Serres JN, Roose ML. Pummelo fruit transcript homologous to ripening-induced genes. *Plant Physiol*. 1995;108(3):1323-4.
- Carrari F, Fernie AR, Iusem ND. Heard it through the grapevine? ABA and sugar cross-talk: the ASR story. *Trends Plant Sci*. 2004;9(2):57-9.
- Chang S, Puryear JD, Dias MADL, Funkhouser EA, Newton RJ, Cairney J. Gene expression under water deficit in loblolly pine (*Pinus taeda*): Isolation and characterization of cDNA clones. *Physiol Plant*. 1996; 97: 139-148.
- Chiapello H, Lisacek F, Caboche M, Henaut A. Codon usage and gene function are related in sequences of *Arabidopsis thaliana*. *Gene*. 1998; 209(1-2):GC1-GC38.
- da Silva FG, Iandolino A, Al-Kayal F, Bohlmann MC, Cushman MA, Lim H, Ergul A, Figueroa R, Kabuloglu EK, Osborne C, Rowe J, Tattersall E, Leslie A, Xu J, Baek J, Cramer GR, Cushman JC, Cook DR. Characterizing the grape transcriptome. Analysis of expressed sequence tags from multiple *Vitis* species and development of a compendium of gene expression during berry development. *Plant Physiol*. 2005; 139(2):574-97.
- Davidson CJ, Tirouvanziam R, Herzenberg LA, Lipsick JS. Functional evolution of the vertebrate Myb gene family: B-Myb, but neither A-Myb nor c-Myb, complements *Drosophila* Myb in hemocytes. *Genetics*. 2005; 169(1):215-29.
- Delrot S, Atanassova R, Maurousset L. Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1465(1-2):281-306.
- Doczi R, Kondrak M, Kovacs G, Beczner F, Banfalvi Z. Conservation of the drought-inducible DS2 genes and divergences from their ASR paralogues in solanaceous species. *Plant Physiol Biochem*. 2005; 43(3):269-76.
- Doczi R, Csanaki C, Banfalvi Z. Expression and promoter activity of the desiccation-specific *Solanum tuberosum* gene, StDS2. *Plant Cell Environ*. 2002; 25: 1197-1203.
- Drouin G, Prat F, Ell M, Clarke GD. Detecting and characterizing gene conversions between multigene family members. *Mol Biol Evol*. 1999;16(10):1369-90.

- Drummond DA, Raval A, Wilke CO. A single determinant dominates the rate of yeast protein evolution. *Mol Biol Evol.* 2006; 23(2):327-37.
- Duret L. tRNA gene number and codon usage in the *C. elegans* genome are co-adapted for optimal translation of highly expressed genes. *Trends Genet.* 2000; 16(7):287-9.
- Eshed Y, Abu-Abied M, Saranga Y, Zamir D. *Lycopersicon esculentum* lines containing small overlapping introgressions from *L. pennellii*. *Theor Appl Genet.* 1992; 83:1027-1034
- Ezawa K, Oota S, Saitou N; SMBE Tri-National Young Investigators. Proceedings of the SMBE Tri-National Young Investigators' Workshop 2005. Genome-wide search of gene conversions in duplicated genes of mouse and rat. *Mol Biol Evol.* 2006; 23(5):927-40.
- Fay JC, Wyckoff GJ, Wu CI. Testing the neutral theory of molecular evolution with genomic data from *Drosophila*. *Nature.* 2002; 415(6875):1024-6.
- Fernie AR, Willmitzer L. Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiol.* 2001; 127(4):1459-65.
- Fernie AR, Roessner U, Trethewey RN, Willmitzer L. The contribution of plastidial phosphoglucomutase to the control of starch synthesis within the potato tuber. *Planta.* 2001; 213(3):418-26.
- Fernie AR, Roessner U, Geigenberger P. The sucrose analog palatinose leads to a stimulation of sucrose degradation and starch synthesis when supplied to discs of growing potato tubers. *Plant Physiol.* 2001; 125(4):1967-77.
- Fillion L, Ageorges A, Picaud S, Coutos-Thevenot P, Lemoine R, Romieu C, Delrot S. Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. *Plant Physiol.* 1999; 120(4):1083-94.
- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 2002; 14: Suppl:S15-45.
- Finkelstein RR, Tenbarger KM, Shumway JE, Crouch ML. Role of ABA in Maturation of Rapeseed Embryos. *Plant Physiol.* 1985; 78(3):630-636.
- Frankel N, Hasson E, Iusem ND, Rossi MS. Adaptive evolution of the water stress-induced gene *Asr2* in *Lycopersicon* species dwelling in arid habitats. *Mol Biol Evol.* 2003; 20(12):1955-62.
- Fridman E, Carrari F, Liu YS, Fernie AR, Zamir D. Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science.* 2004; 305(5691):1786-9.
- Garcia-Fernandez J. The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nat Rev Genet.* 2005; 6(12):881-92.

- Gear ML, McPhillips ML, Patrick JW, McCurdy DW. Hexose transporters of tomato: molecular cloning, expression analysis and functional characterization. *Plant Mol Biol.* 2000; 44(5):687-97.
- Geigenberger P. Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. *J Exp Bot.* 2003; 54(382):457-65.
- Gilad A, Amitai-Zeigerson H, Scolnik PA, Bar-Zvi D. *Asr1*, a tomato water-stress regulated gene: genomic organization, developmental regulation and DNA-binding activity. *Acta Horticulturae.* 1997; 447:447-454.
- Giraudat J, Hauge BM, Valon C, Smalle J, Parcy F, Goodman HM. Isolation of the *Arabidopsis* *ABI3* gene by positional cloning. *Plant Cell.* 1992; 4(10):1251-61.
- Graur, D. and W.-H. Li. *Fundamentals of Molecular Evolution*, second edition, 2000. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Gu Z, Rifkin SA, White KP, Li WH. Duplicate genes increase gene expression diversity within and between species. *Nat Genet.* 2004; 36(6):577-9.
- Hall, TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 1999; 41:95-98.
- Hancock JM. Gene factories, microfunctionalization and the evolution of gene families. *Trends Genet.* 2005; 21(11):591-5.
- Hare PD, Cress WA, Van Staden J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ.* 1998; 21: 535-553.
- Hsiao TC. Plant response to water stress. *Annual Review of Plant Physiology.* 1973; 4: 519-70.
- Hong SH, Kim IJ, Yang DC, Chung WI. Characterization of an abscisic acid responsive gene homologue from *Cucumis melo*. *J Exp Bot.* 2002; 53(378):2271-2.
- Huang JC, Lin SM, Wang CS. A pollen-specific and desiccation-associated transcript in *Lilium longiflorum* during development and stress. *Plant Cell Physiol.* 2000; 41: 477-485.
- Hughes AL, Nei M. Models of host-parasite interaction and MHC polymorphism. *Genetics.* 1992; 132(3):863-4.
- Hughes AL, Nei M. Evolution of the major histocompatibility complex: independent origin of nonclassical class I genes in different groups of mammals. *Mol Biol Evol.* 1989; 6(6):559-79.
- Ikemura T. Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes. *J Mol Biol.* 1981; 146(1):1-21.

- Immink RG, Gadella TW Jr, Ferrario S, Busscher M, Angenent GC. Analysis of MADS box protein-protein interactions in living plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(4):2416-21.
- Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1996; 47:377-403.
- Iusem ND, Bartholomew DM, Hitz WD, Scolnik PA. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening. *Plant Physiol*. 1993; 102(4):1353-4.
- Jeanneau M., Gerentes D, Foueillassar X, Zivy M, Vidal J, Toppan A, Perez P. Improvement of drought tolerance in maize: Towards the functional validation of the ZM-ASR1 gene and increase of water use efficiency by over-expressing C4-PEPC. *Biochimie*. 2002; 84:1127-1135.
- Jenkins JA. The origin of cultivated tomato. *Economic Botany*. 1948; 2: 379-392.
- Kalifa Y, Gilad A, Konrad Z, Zaccari M, Scolnik PA, Bar-Zvi D. The water- and salt-stress-regulated *Asr1* (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein. *Biochem J*. 2004; 381(Pt 2):373-8.
- Kalifa Y, Perlson E, Gilad A, Konrad Z, Scolnik PA, Bar-Zvi D. Over-expression of the water and salt stress-regulated *Asr1* gene confers an increased salt tolerance. *Plant Cell Environ*. 2004; 27(12):1459-1468.
- Kermode AR, Bewley JD. Regulatory processes involved in switch from seed development to germination. Possible roles for desiccation and ABA. *En Drought resistance in plants, physiological and genetic aspects*. 1987. Editores: Monti, I y E. Porceddu. Bruselas, Bélgica.
- Kimura M. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. 1983. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.
- Knapp S, Bohs L, Nee M, Spooner DM. Solanaceae - a model for linking genomics with biodiversity. *Comp Funct Genom*. 2004; 5:285-291.
- Koch KE. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1996; 47:509-540.
- Kondo K, Yamamoto M, Matton DP, Sato T, Hirai, Norioka S, Hattori T, Kowiyama Y. Cultivated tomato has defects in both *S-RNase* and *HT* genes required for stylar function of self-incompatibility. *Plant Journal*. 2002; 29: 627-636.
- Kong H, Leebens-Mack J, Ni W, dePamphilis CW, Ma H. Highly heterogeneous rates of evolution in the *SKP1* gene family in plants and animals: functional and evolutionary implications. *Mol Biol Evol*. 2004; 21(1):117-28.
- Koorneef M, Manhart CJ, Hihorst HWM, Karssen CM. In vivo inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid

- biosynthesis and responsive mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 1989; 90: 463-469.
- Kreps JA, Wu Y, Chang HS, Zhu T, Wang X, Harper JF. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol.* 2002; 130(4):2129-41.
- Kuhn C, Hajirezaei MR, Fernie AR, Roessner-Tunali U, Czechowski T, Hirner B, Frommer WB. The sucrose transporter StSUT1 localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiol.* 2003; 131(1):102-13.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 2004; 5(2):150-63.
- Lalonde S, Wipf D, Frommer WB. Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu Rev Plant Biol.* 2004; 55: 341–372
- Leung J, Giraudat J. Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1998; 49:199-222.
- Li Y, Walton DC. Xanthophylls and Abscisic Acid Biosynthesis in Water-Stressed Bean Leaves. *Plant Physiol.* 1987; 85(4):910-915.
- Linnaeus C. *Species Plantarum*. Primera edición, 1753. Holmiae, Estocolmo, Suecia.
- Liu XJ, Prat S, Willmitzer L, Frommer WB. cis regulatory elements directing tuber-specific and sucrose-inducible expression of a chimeric class I patatin promoter/GUS-gene fusion. *Mol Gen Genet.* 1990; 223(3):401-6.
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem.* 1987; 163(1):16-20.
- Luckwill LC. The genus *Lycopersicon*: an historical, biological, and taxonomic survey of the wild and cultivated tomatoes. *Aberdeen University Studies* 1943; 120: 1–44.
- Lynch M, Conery JS. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science.* 2000; 290(5494):1151-5.
- Marshall J. A., S. Knapp, M. R Davey, J. B. Power, E. C. Cocking, M. D. Bennett y A. V. Cox. 2001. *Theor. App. Genet.* 103: 1216-1222.
- Maskin L, Gudesblat GE, Moreno JE, Carrari FO, Frankel N, Sambade A, Rossi M, Iusem ND. Differential expression of the members of the Asr gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Sci* 2001; 161: 739–746.
- Massingham T, Davies LJ, Lio P. Analysing gene function after duplication. *Bioessays.* 2001; 23(10):873-6.

- Mbeguie-A-Mbeguie D, Gomez RM, Fils-Lycaon B. Molecular cloning and nucleotide sequence of a protein from apricot fruit (accession No. U82760) homologous to LEC14B protein isolated from *Lithospermum* gene expression during fruit ripening (PGR 97-161). *Plant Physiol.* 1997; 115: 1288
- McClellan PE, Hanson MR. Mitochondrial DNA sequence divergence among *Lycopersicon* and related *Solanum* species. *Genetics.* 1986; 112: 649-667.
- Mechta-Grigoriou F, Giudicelli F, Pujades C, Charnay P, Yaniv M. c-jun regulation and function in the developing hindbrain. *Dev Biol.* 2003; 258(2):419-31.
- Miller P. *The gardeners dictionary, abridged.* Cuarta edición, 1754. Londres, Reino Unido.
- Miller JC, Tanksley SD. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.* 1990; 80: 437-448.
- Muller, C. H. A revision of the genus *Lycopersicon*. United States Department of Agriculture, Miscellaneous Publication. 1940; 382: 1-28.
- Monforte AJ, Tanksley SD. Development of a set of near isogenic and backcross recombinant inbred lines containing most of the *Lycopersicon hirsutum* genome in a *L. esculentum* genetic background: a tool for gene mapping and gene discovery. *Genome.* 2000; 43(5):803-13.
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science.* 2003; 300(5617):332-6.
- Moore RC, Purugganan MD. The early stages of duplicate gene evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(26):15682-7.
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plant.* 1962; 15:473-497.
- Muschak M, Willmitzer L, Fisahn J. Gas-exchange analysis of chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase antisense potatoes at different air humidities and at elevated CO₂. *Planta.* 1999; 209(1):104-11.
- Nei M, Rooney AP. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet.* 2005; 39:121-52.
- Nelkin B, Strayer D, Vogelstein B. Divergence of primate ribosomal RNA genes as assayed by restriction enzyme analysis. *Gene.* 1980;11(1-2):89-96.
- Ohno S. *Evolution by gene duplication.* 1970. Springer Verlag, New York.
- Ohta T. Slightly deleterious mutant substitutions in evolution. *Nature.* 1973; 246(5428):96-8.

- Ota T, Nei M. Divergent evolution and evolution by the birth-and-death process in the immunoglobulin VH gene family. *Mol Biol Evol.* 1994; 11(3):469-82.
- Padmanabhan VDM, Dias AL, Newton RJ. Expression analysis of a gene family in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) induced by water deficit stress. *Plant Molecular Biology* 1997; 35: 801-807.
- Pal C, Papp B, Lercher MJ. An integrated view of protein evolution. *Nat Rev Genet.* 2006; 7(5):337-48.
- Palmer JD, Zamir D. Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in *Lycopersicon*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982; 79(16):5006-5010.
- Paques F, Haber JE. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999; 63(2):349-404.
- Parry A, Horgan R. Carotenoids and abscisic acid (ABA) biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plant.* 1991; 82: 320-326.
- Patrick JW. Phloem unloading: sieve element unloading and post-sieve element transport. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1997; 48:191-222.
- Patrick JW, Offler CE. Post-sieve element transport of photoassimilates in sink regions. *J Exp Bot.* 1996; 47:1165–1177.
- Peralta IE, Spooner DM. Classification of wild tomatoes: a review. *Kurtziana.* 2000; 28: 45–54.
- Peralta IE, Spooner DM. Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. Secton *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). *Am J Bot.* 2001; 88: 1888-1902.
- Price J, Laxmi A, St Martin SK, Jang JC. Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2004; 16(8):2128-50.
- Quatrano RS. The role of hormones during seed development. En *Plant hormones and their role in plant growth and development.* 1987 Editor: Davies PJ. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht , Holanda.
- Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol.* 2003; 133(4):1755-67.
- Razem FA, El-Kereamy A, Abrams SR, Hill RD. The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature.* 2006; 439(7074):290-4.

- Rensink WA, Lee Y, Liu J, Iobst S, Ouyang S, Buell CR. Comparative analyses of six solanaceous transcriptomes reveal a high degree of sequence conservation and species-specific transcripts. *BMC Genomics*. 2005; 6:124.
- Riccardi F, Gazeau P, de Vienne D, Zivy M. Protein changes in response to progressive water deficit in maize. Quantitative variation and polypeptide identification *Plant Physiol*. 1998; 117(4):1253-63.
- Rick CM. Biosystematic studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum*. The biology and taxonomy of Solanaceae. Linnean Society Symposium Series 7, 1979. Editores: Hawkes JG, Lester RN, Skelding AD. Academic Press, New York, New York, Estados Unidos.
- Rocha EP. The quest for the universals of protein evolution. *Trends Genet*. 2006; 22(8):412-6.
- Rocha EP, Danchin A. An analysis of determinants of amino acids substitution rates in bacterial proteins. *Mol Biol Evol*. 2004; 21(1):108-16.
- Rocha-Sosa M, Sonnewald U, Frommer W, Stratmann M, Schell J, Willmitzer L. Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *EMBO J*. 1989; 8(1):23-29.
- Roessner U, Wagner C, Kopka J, Trethewey RN, Willmitzer L. Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant J*. 2000; 23(1):131-42.
- Roessner-Tunali U, Urbanczyk-Wochniak E, Czechowski T, Kolbe A, Willmitzer L, Fernie AR. De novo amino acid biosynthesis in potato tubers is regulated by sucrose levels. *Plant Physiol*. 2003;133(2):683-92.
- Roitsch T, Gonzalez MC. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci*. 2004; 9(12):606-13.
- Rom S, Gilad A, Kalifa Y, Konrad Z, Karpasas MM, Goldgur Y, Bar-Zvi D. Mapping the DNA- and zinc-binding domains of ASR1 (abscisic acid stress ripening), an abiotic-stress regulated plant specific protein. *Biochimie*. 200; 88(6):621-8.
- Rossi M, Lijavetzky D, Bernacchi D, Hopp HE, Iusem N. Asr genes belong to a gene family comprising at least three closely linked loci on chromosome 4 in tomato. *Mol Gen Genet*. 1996; 252(4):489-92.
- Rossi M, Iusem ND. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) genomic clone homologous to a gene encoding an abscisic acid-induced protein. *Plant Physiol*. 1994; 104(3):1073-4.
- Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 3rd Edition, 2001. Cold Spring Harbor Laboratory, New York,
- Sauer N, Baier K, Gahrtz M, Stadler R, Stolz J, Truernit E. Sugar transport across the plasma membranes of higher plants. *Plant Mol Biol*. 1994; 26(5):1671-9.

- Sawyer S. Statistical tests for detecting gene conversion. *Mol Biol Evol.* 1989; 6(5):526-38.
- Schmelz EA, Engelberth J, Alborn HT, O'Donnell P, Sammons M, Toshima H, Tumlinson JH 3rd. Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(18):10552-7.
- Schneider A, Salamini F, Gebhardt C. Expression patterns and promoter activity of the cold-regulated gene *ci21A* of potato. *Plant Physiol.* 1997; 113(2):335-45.
- Shen YY, Wang XF, Wu FQ, Du SY, Cao Z, Shang Y, Wang XL, Peng CC, Yu XC, Zhu SY, Fan RC, Xu YH, Zhang DP. The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature.* 2006; 443(7113):823-6.
- Sherson SM, Alford HL, Forbes SM, Wallace G, Smith SM. Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* 2003; 54(382):525-31.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot.* 2006; en prensa.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol.* 2003; 6(5):410-7.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. *Plant Physiol.* 1997; 115(2):327-334.
- Silhavy D, Hutvagner G, Barta E, Banfalvi Z. Isolation and characterization of a water-stress-inducible cDNA clone from *Solanum chacoense*. *Plant Mol Biol.* 1995; 27(3):587-95.
- Skriver K, Mundy J. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell.* 1990; 2(6):503-12.
- Smith PG. Embryo culture of a tomato species hybrid. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 1944; 44: 413-416.
- Song R, Llaca V, Messing J. Mosaic organization of orthologous sequences in grass genomes. *Genome Res.* 2002; 12(10):1549-55.
- Stadler R, Buttner M, Ache P, Hedrich R, Ivashikina N, Melzer M, Shearson SM, Smith SM, Sauer N. Diurnal and light-regulated expression of *AtSTP1* in guard cells of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2003; 133(2):528-37.
- Stitt M, Lilley R McC, Gerhardt R, Heldt HW. Metabolites in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Meth Enzymol.* 1989; 174, 518-552.
- Strand A, Zrenner R, Trevanion S, Stitt M, Gustafsson P, Gardestrom P. Decreased expression of two key enzymes in the sucrose biosynthesis pathway, cytosolic fructose-

1,6-bisphosphatase and sucrose phosphate synthase, has remarkably different consequences for photosynthetic carbon metabolism in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2000; 23(6):759-70.

Subramanian S, Kumar S. Gene expression intensity shapes evolutionary rates of the proteins encoded by the vertebrate genome. *Genetics.* 2004; 168(1):373-81.

Sueoka N, Kawanishi Y. DNA G+C content of the third codon position and codon usage biases of human genes. *Gene.* 2000; 261(1):53-62.

Sugiharto B, Ermawati N, Mori H, Aoki K, Yonekura-Sakakibara K, Yamaya T, Sugiyama T, Sakakibara H. Identification and characterization of a gene encoding drought-inducible protein localizing in the bundle sheath cell of sugarcane. *Plant Cell Physiol.* 2002; 43(3):350-4.

Swanson WJ. Adaptive evolution of genes and gene families. *Curr Opin Genet Dev.* 2003; 13(6):617-22.

Tal M, Imber D. Abnormal stomatal behaviour and hormonal imbalance in flacca wilt mutant tomato. II. Auxin and abscisic acid-like activity. *Plant Physiol.* 1970; 46: 372-373.

Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, de Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, et al. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics.* 1992; 132(4):1141-60.

Thompson MV. Phloem: the long and the short of it. *Trends Plant Sci.* 2006; 11(1):26-32.

Toledo-Ortiz G, Huq E, Quail PH. The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell.* 2003; 15(8):1749-70.

Treger JM, McEntee K. Structure of the DNA damage-inducible gene DDR48 and evidence for its role in mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1990; 10(6):3174-84.

Trethewey RN, Geigenberger P, Riedel K, Hajirezaei MR, Sonnewald U, Stitt M, Riesmeier JW, Willmitzer L. Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis. *Plant J.* 1998; 15:109-118.

Van der Hoeven R, Ronning C, Giovannoni J, Martin G, Tanksley S. Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *Plant Cell.* 2002; 14(7):1441-56.

Vaidyanathan R, Kuruvilla S, Thomas G. Characterization and expression pattern of an abscisic acid and osmotic stress responsive gene from rice. *Plant Sci.* 1999; 140: 25–36.

- Vignault C, Vachaud M, Cakir B, Glissant D, Dedaldechamp F, Buttner M, Atanassova R, Fleurat-Lessard P, Lemoine R, Delrot S. VvHT1 encodes a monosaccharide transporter expressed in the conducting complex of the grape berry phloem. *J Exp Bot.* 2005; 56(415):1409-18.
- Viola R, Roberts AG, Haupt S, Gazzani S, Hancock RD, Marmioli N, Machray GC, Oparka KJ. Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. *Plant Cell.* 2001; 13(2):385-98.
- Wang HJ, Hsu CM, Jauh GY, Wang CS. A lily pollen ASR protein localizes to both cytoplasm and nuclei requiring a nuclear localization signal. *Physiol Plant.* 2005; 123(3): 314-320.
- Wang CS, Liao YE, Huang JC, Wu TD, Su CC, Lin CH. Characterization of a desiccation-related protein in lily pollen during development and stress. *Plant Cell Physiol.* 1998; 39(12):1307-14.
- Wang WX, Pelah D, Alergand T, Shoseyov O, Altman A. Characterization of SP1, a stress-responsive, boiling-soluble, homo-oligomeric protein from aspen. *Plant Physiol.* 2002; 130(2):865-75.
- Weschke W, Panitz R, Gubatz S, Wang Q, Radchuk R, Weber H, Wobus U. The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *Plant J.* 2003; 33(2):395-411.
- Williams LE, Lemoine R, Sauer N. Sugar carriers in higher plants - a diversity of roles and complex regulation. *Trends Plant Sci.* 2000; 5:283-290.
- Wright SI, Yau CB, Looseley M, Meyers BC. Effects of gene expression on molecular evolution in *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis lyrata*. *Mol Biol Evol.* 2004; 21(9):1719-26.
- Yang CY, Chen YC, Jauh GY, Wang CS. A Lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2005; 139(2):836-46.
- Yang Z. Likelihood ratio tests for detecting positive selection and application to primate lysozyme evolution. *Mol Biol Evol.* 1998; 15(5):568-73.
- Yang Z. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput Appl Biosci.* 1997; 13(5):555-6.
- Zeevaart JAD, Creelman RA. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 1988; 39: 439-473.
- Zhang LY, Peng YB, Pelleschi-Travier S, Fan Y, Lu YF, Lu YM, Gao XP, Shen YY, Delrot S, Zhang DP. Evidence for apoplasmic phloem unloading in developing apple fruit. *Plant Physiol.* 2004; 135(1):574-86.

Zhu JK. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2002; 53:247-73.