



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Biofortificación de cultivos alimenticios: estrategias para el aumento de hierro y zinc en el tubérculo de Spunta.

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica.

Licenciado Juan Ignacio Cortelezzi

Directora de tesis: Dra. Daniela Andrea Capiati

Directora adjunta: Dra. María Noelia Muñiz García

Consejera de estudios: Dra. Rita María Ulloa

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N Torres”, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 17 de febrero de 2025

Biofortificación de cultivos alimenticios: estrategias para el aumento de hierro y zinc en el tubérculo de Spunta

Resumen

La deficiencia de hierro es una de las carencias nutricionales más extendidas a nivel mundial, afectando a unos dos mil millones de personas, principalmente niños y mujeres de países en desarrollo. La anemia por deficiencia de hierro impacta negativamente en la salud y calidad de vida de la población. Aumentar el contenido de hierro en cultivos de alto consumo representa una estrategia clave para abordar esta problemática global. La papa, el tercer cultivo alimentario más importante a nivel mundial y con una notable adaptación a distintos climas y suelos, es un excelente candidato para la biofortificación con micronutrientes como el hierro y el zinc.

Si bien el hierro es un nutriente esencial para las plantas, su exceso puede ser tóxico y su acumulación disparar una respuesta de estrés que limite tanto su capacidad de almacenamiento como la productividad y/o supervivencia de la planta. Para optimizar la acumulación de hierro, no sólo es importante su absorción por las raíces, sino también su transporte en asociación con moléculas estabilizadoras como la nicotianamina y su almacenamiento de forma segura asociado a proteínas como la ferritina. Esta proteína forma estructuras esféricas de 24 subunidades, protegiendo el hierro y evitando el estrés oxidativo asociado a su acumulación. En este trabajo, se desarrollaron vectores binarios para la expresión heteróloga en papa del gen *AtNAS1* (Nicotianamina Sintasa 1 de *Arabidopsis thaliana*) bajo un promotor constitutivo, y del gen *PvFER* (Ferritina de *Phaseolus vulgaris*) bajo la regulación de un promotor específico de tubérculo. Además, se generó una construcción combinada que permite la coexpresión de ambos genes (*AtNAS1* y *PvFER*). Las transformaciones se realizaron en plantas de papa de la variedad Spunta, que representa el 90% del mercado de consumo fresco en Argentina.

Mediante la transformación de papas con *Rhizobium radiobacter*, se obtuvieron dos líneas transgénicas para *PvFer* (F1 y F2), una para *AtNAS1* (N1) y cinco líneas transgénicas dobles (FN1 a FN5). Las plantas fueron caracterizadas en invernadero, evaluando parámetros morfo-fisiológicos como altura, número de hojas, densidad estomática, pérdida de agua, contenido de clorofila y rendimiento productivo, con especial énfasis en la cantidad, tamaño y forma de los tubérculos. Las líneas N1, F1 y F2 resultaron indistinguibles de las plantas control (*wild type*, wt), mientras que 4 de las 5 líneas transgénicas dobles (FN1, FN2, FN3 y FN5) exhibieron efectos adversos en el crecimiento vegetativo y el rendimiento. Sin embargo, la línea FN4 no presentó diferencias significativas en crecimiento vegetativo ni en rendimiento respecto de las plantas wt.

El objetivo principal de este trabajo fue obtener líneas transgénicas de papa con niveles aumentados de hierro y zinc en los tubérculos. Con la estrategia de coexpresión se obtuvo un incremento significativo de zinc del 40-90% en las líneas dobles y un aumento del 53-80% en el contenido de hierro en los tubérculos al cultivar las plantas en un sustrato de baja riqueza mineral. En un sustrato con mayor riqueza mineral, la línea FN4 mostró un aumento del 110% en el contenido de hierro y del 80% en zinc, sin afectar la productividad ni la calidad de procesamiento lo que indica una mejora sustancial en la calidad nutricional sin efectos negativos asociados. FN4 demostró una mayor capacidad de acumulación de hierro a medida que se incrementa su disponibilidad en el sustrato sin una penalización en el rendimiento. Estos resultados resaltan el potencial de esta estrategia para la biofortificación de papa, y el desarrollo de nuevas variedades que contribuyan a la mejora de la salud y calidad de vida de la población.

Palabras clave: Biofortificación – Ferritina – Nicotianamina – *Solanum tuberosum* – Ingeniería genética

Biofortification of food crops: strategies for increasing iron and zinc in Spunta tuber

Abstract

Iron deficiency is one of the most widespread nutritional deficiencies worldwide, affecting approximately two billion people, primarily children and women in developing countries. Iron deficiency anemia has severe consequences on public health and quality of life. Increasing iron content in widely consumed crops represents a key strategy to address this global issue. Potato, the third most important food crop worldwide, with remarkable adaptability to different climates and soils, is an excellent candidate for biofortification with micronutrients such as iron and zinc.

Although iron is an essential nutrient for plants, its excess can be toxic, triggering a stress response that limits both its storage capacity and the plant's productivity and/or survival. To optimize iron accumulation, not only its uptake by roots is important, but also its transport in association with stabilizing molecules such as nicotianamine and its safe storage bound to proteins like ferritin. This protein can form spherical structures composed of 24 subunits, protecting iron and preventing oxidative stress associated with its accumulation. In this study, binary vectors were developed for the heterologous expression in potato of the *AtNAS1* gene (*Nicotianamine Synthase 1* from *Arabidopsis thaliana*) under a constitutive promoter and the *PvFER* gene (Ferritin from *Phaseolus vulgaris*) under the regulation of a tuber-specific promoter. Additionally, a combined construct was generated to allow the co-expression of both genes (*AtNAS1* and *PvFER*). Transformations were performed in Spunta potato plants, a variety that accounts for 90% of the fresh consumption market in Argentina.

Through *Rhizobium radiobacter*-mediated transformation, two transgenic lines were obtained for *PvFER* (F1 and F2), one for *AtNAS1* (N1), and five double transgenic lines (FN1 to FN5). The plants were characterized in a greenhouse, evaluating morpho-physiological parameters such as height, number of leaves, stomatal density, water loss, chlorophyll content, and productivity, with special emphasis on the number, size, and shape of the tubers. The N1, F1, and F2 lines were indistinguishable from wild-type (wt) plants, whereas four of the five double transgenic lines (FN1, FN2, FN3, and FN5) exhibited adverse effects on vegetative growth and yield. However, the FN4 line showed no significant differences in vegetative growth or yield compared to wt plants.

The main objective of this study was to obtain transgenic potato lines with increased iron and zinc levels in tubers. With the coexpression strategy, a significant increase in zinc content (40–90%) was obtained in the double transgenic lines, accompanied by a 53–80% increase in iron content in tubers when plants were grown in a low-mineral substrate. In a higher-mineral substrate, the FN4 line exhibited a 110% increase in iron content and an 80% increase in zinc, without affecting productivity or processing quality, indicating a substantial improvement in nutritional quality without associated negative effects. FN4 demonstrated a greater capacity for iron accumulation as its availability in the substrate increased, without a yield penalty. These results highlight the potential of this strategy for potato biofortification and the development of new varieties that contribute to improving public health and quality of life.

Keywords: Biofortification – Ferritin – Nicotianamine – *Solanum tuberosum* – Genetic engineering

Agradecimientos

Este trabajo es fruto de la influencia y el apoyo de muchas personas, a las que quiero agradecer:

Quiero empezar agradeciéndole a **Dani**, por abrirme las puertas del 211 y haberme dirigido durante esta tesis, por su infinita paciencia y confianza en mí. Gracias por brindarnos libertad a la hora de trabajar, pero siempre guiándonos, y asegurándose de que no nos falte nada. Te agradezco por todos estos años de dirección, por las mil y una lecturas de esta tesis, y te felicito por el laboratorio que lograste conformar, un espacio donde se trabaja con compromiso, rodeado de gente buena.

A **Noe**, la persona de la que aprendo todos los días. No tengo palabras para agradecerte todo lo que me enseñaste en estos años. Siempre dispuesta a escuchar y a hacerte tiempo para ayudarnos, aunque estés haciendo quince cosas a la vez. Admiro tu capacidad de trabajo y resolución de problemas. Tenerte como codirectora hizo mi doctorado no solo más enriquecedor y formativo, sino también mucho más divertido. Infinitas gracias.

A **Jessi, Marti, Juampi y Iara**, por los miles de mates, llantos y risas que compartimos. Por los días que trabajamos hasta que se hizo de noche, pero también por las noches que festejamos hasta que se hizo de día. Soy un afortunado de haberlos tenido como compañeros en este doctorado.

A todo el **INGEBI** por hacer de este instituto un lugar de trabajo increíble, donde siempre hay alguien dispuesto a ayudar. Les agradezco por todos estos años compartidos, en los que, por más difícil que estuviera todo, siempre encontraba una sonrisa en los pasillos.

Al **CONICET** y **AGENCIA** por haber financiado mis años de doctorado, y por ser pilares fundamentales en el desarrollo de la ciencia argentina.

A mis amigos y amigas, que por suerte son muchos. Gracias por las charlas interminables, los asados, los fulbitos y los viajes, pero sobre todo por estar en las difíciles y acompañarme siempre.

A mi familia, porque sin ellos nada de esto hubiera sido posible. A **mi mamá**, por ser la persona más incondicional y generosa que conozco, pero también por ser tan divertida. Gracias por siempre cuidarme y acompañarme. A **mi papá**, por su esfuerzo, su humor, su generosidad y por haberme hecho hinch de Vélez. A **Luli**, por los miles de momentos compartidos, por ser una persona brillante y la mejor hermana que alguien puede tener. A **Nico**, por haber sido siempre como un hermano mayor y compañero en mil historias.

A mis abuelos **Hugo y Ernesto**, a quienes pude disfrutar y llevaré siempre en mi corazón. La vida me dio dos abuelas hermosas, **Rosa y Olga** a quienes agradezco por haberme hecho el nieto más feliz, y por confiar siempre en mí.

A **Cami**, la persona que me banca siempre y que me cambió la vida. Gracias por acompañarme todos estos años.

Para finalizar, quiero agradecer especialmente a la **Universidad de Buenos Aires**, pública, gratuita y de calidad, y en particular a la **FCEN**, de la que formo parte hace más de 10 años y soy orgulloso egresado. Le agradezco por haberme dado la oportunidad de estudiar, de crecer, de conocer gente maravillosa, por haberme obligado a pensar y por ser mi segunda casa, por siempre en mi corazón...

Índice

ÍNDICE	6
INTRODUCCIÓN	10
<i>Sobre la seguridad alimentaria</i>	<i>11</i>
<i>Sobre la importancia del Fe y el Zn</i>	<i>12</i>
<i>Sobre la malnutrición en Argentina</i>	<i>13</i>
<i>Sobre la malnutrición en el mundo</i>	<i>14</i>
<i>Sobre la biofortificación</i>	<i>16</i>
<i>Sobre la biofortificación mediante ingeniería genética</i>	<i>17</i>
<i>Sobre la planta de papa</i>	<i>18</i>
<i>Sobre la historia del cultivo de papa</i>	<i>18</i>
<i>Sobre el cultivo de papa en la actualidad</i>	<i>19</i>
<i>Sobre el proceso de tuberización</i>	<i>21</i>
<i>Sobre el Fe y Zn en las plantas</i>	<i>22</i>
<i>Sobre la captación de Fe</i>	<i>22</i>
<i>Sobre el transporte interno</i>	<i>24</i>
<i>Sobre el almacenamiento del Fe</i>	<i>26</i>
<i>Sobre la absorción del hierro</i>	<i>28</i>
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	31
<i>Objetivos generales</i>	<i>32</i>
<i>Objetivos específicos</i>	<i>32</i>
MATERIALES Y MÉTODOS	33
1. CLONADO Y CONSTRUCCIÓN DE VECTORES	34
1.1 <i>Cepas bacterianas utilizadas:</i>	<i>34</i>
1.2 <i>Preparación de Escherichia coli quimio-competentes:</i>	<i>34</i>
1.3 <i>Transformación de E. coli quimio-competentes:</i>	<i>34</i>
1.4 <i>Preparación de Rhizobium radiobacter quimio-competentes:</i>	<i>35</i>
1.5 <i>Transformación de Rhizobium radiobacter quimio-competentes.:</i>	<i>35</i>
1.6 <i>Purificación de ADN plasmídico</i>	<i>35</i>
1.7 <i>Vectores utilizados</i>	<i>36</i>
2. TÉCNICAS DE ADN RECOMBINANTE	39
2.1 <i>Amplificación por PCR</i>	<i>39</i>
2.2 <i>Oligonucleótidos utilizados:</i>	<i>39</i>
2.3 <i>Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa</i>	<i>40</i>
2.4 <i>Cuantificación de ADN.</i>	<i>41</i>
2.5 <i>Digestión con enzimas de restricción</i>	<i>41</i>
2.6 <i>Eliminación de fosfatos en extremos 5'</i>	<i>41</i>
2.7 <i>Reacciones de ligación</i>	<i>41</i>
2.8 <i>Chequeo de las construcciones recombinantes</i>	<i>42</i>
2.9 <i>Extracción de ARN total a partir de material vegetal</i>	<i>42</i>
2.10 <i>Síntesis de ADNc por transcripción reversa</i>	<i>43</i>
2.11 <i>Reacción de PCR semi-cuantitativa</i>	<i>43</i>
2.12 <i>Densitometría de bandas</i>	<i>43</i>
3. OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE S. TUBEROSUM CV SPUNTA MEDIANTE TRANSFORMACIÓN POR R. RADIOBACTER.	44
3.1 <i>Reactivos utilizados para la transformación</i>	<i>44</i>
3.2 <i>Plantas utilizadas</i>	<i>44</i>
3.3 <i>Preparación de inóculos de R. radiobacter</i>	<i>44</i>
3.4 <i>Preparación de los explantos:</i>	<i>45</i>
3.5 <i>Transformación:</i>	<i>45</i>
3.6 <i>Repique de explantos:</i>	<i>45</i>
3.7 <i>Enraizamiento en Kanamicina:</i>	<i>46</i>
3.8 <i>Extracción de ADN a partir de material vegetal</i>	<i>46</i>

4. MANEJO DEL MATERIAL VEGETAL	47
4.1 Micropropagación de plantas in-vitro.....	47
4.2 Tuberización in-vitro	47
4.3 Rusticado	47
4.4 Condiciones del invernadero	47
4.5 Plantas de tubérculo	48
4.6 Crecimiento en diferentes tratamientos de Fe.	48
5. MEDICIONES DE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS Y FISIOLÓGICOS	49
5.1 Mediciones en invernadero.....	49
5.2 Deshidratación de hojas.....	49
5.3 Contenido relativo de agua (CRA)	49
5.4 Tamaño de las hojas	49
5.5 Preparación de impresiones de hoja para microscopia.....	49
5.6 Determinación de la densidad estomática, tamaño de los estomas e índice estomático	50
5.7 Determinación del contenido de pigmentos en hojas	50
5.8 Actividad catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX) en hojas	50
6. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE Fe Y ZN.....	51
6.1 Contenido de Fe y Zn en tubérculos mediante absorción atómica	51
6.2 Contenido de Fe en tubérculos mediante el método de o-fenantrolina	51
7. CARACTERIZACIÓN DE LOS TUBÉRCULOS	52
7.1 Preparación de los tubérculos	52
7.2 Determinación del contenido de agua	52
7.3 Contenido de hidratos de carbono	52
7.4 Contenido de proteínas	53
8. SOLUCIONES EMPLEADAS	53
8.1 Soluciones empleadas en técnicas relacionadas con bacterias.....	53
8.2 Soluciones empleadas en técnicas relacionadas con ADN, ARN y proteínas.	54
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
9.1 Prueba t de Student	54
9.2 ANOVA de 2 vías	54
9.3 ANOVA de 1 vía.....	55
9.4 Consideraciones	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	56
CAPÍTULO I: DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES pPZP-NPT-35S::AtNAS1, pPZP-NPT-pPAT::PvFER Y pPZP-NPT-AtNAS1-PvFER	57
Ferritina y NAS en la planta de papa	57
Diseño y construcción de los vectores binarios.....	59
Construcción del vector pPZP-NPT-35S::AtNAS1.....	60
Construcción del vector pPZP-NPT-pPAT::PvFER.....	62
Construcción del vector pPZP-NPT-35S::AtNAS1-pPAT::PvFER	63
Dificultades encontradas	64
CAPÍTULO II: GENERACIÓN DE LAS PLANTAS 35S::AtNAS1, pPAT::FER Y 35S::NAS1-pPAT:FER	69
Transformación de discos de papa.....	69
Presencia de los transgenes.....	69
Expresión de los transgenes.....	70
CAPÍTULO III: ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE LAS PLANTAS DE PAPA 35S::NAS1, pPAT::PvFER Y 35S::AtNAS1-pPAT::PvFER	73
Crecimiento y tuberización in-vitro	73
Rusticado de plantas transgénicas	74
Caracterización de las hojas de plantas rusticadas	75
Crecimiento de plantas rusticadas.....	76
Contenido de pigmentos en hojas de plantas rusticadas.....	77
Caracterización de los estomas de plantas rusticadas.....	79
Retención de agua en hojas de plantas rusticadas.....	81
Producción de tubérculos en plantas rusticadas.....	85

<i>Calidad de procesamiento de los tubérculos de plantas rusticadas</i>	86
<i>Contenido de Fe y Zn en los tubérculos de plantas rusticadas</i>	87
<i>Análisis de plantas obtenidas a partir de tubérculo</i>	90
<i>Contenido de pigmentos en hojas de plantas de tubérculo</i>	92
<i>Estrés oxidativo en hojas de plantas de tubérculo</i>	93
<i>Retención de agua en hojas de plantas de tubérculo</i>	94
<i>Caracterización de los estomas de plantas obtenidas de tubérculo</i>	97
<i>Producción de tubérculos de plantas obtenidas de tubérculo</i>	98
CAPÍTULO IV: EVALUACIÓN DE LA LÍNEA FN4	101
<i>Rendimiento de FN4 en tierra común</i>	101
<i>Contenido de Fe y Zn de tubérculos en tierra común</i>	103
<i>Potencial de FN4 como tubérculo biofortificado</i>	104
CAPÍTULO V: ANÁLISIS DEL IMPACTO DEL INCREMENTO DE FE EN EL SUSTRATO	105
<i>Comportamiento de FN4 ante variaciones en el Fe en el sustrato</i>	106
CONCLUSIONES	109
<i>Experimentos a futuro</i>	111
BIBLIOGRAFÍA	112

Introducción

*(...)“Su oscura ración de pan
comió el campesino en el campo,
estaba solo y era tarde,
estaba rodeado de trigo,
pero no tenía más pan,
se lo comió con dientes duros,
mirándolo con ojos duros.(...)”*

*Las papas ardiendo protestan
entre las lenguas del aceite.
Es de oro el cordero en las brasas
y se desviste la cebolla(...)
Comer solos es muy amargo
pero no comer es profundo,
es hueco, es verde, tiene espinas
como una cadena de anzuelos
que cae desde el corazón
y que te clava por adentro.
Tener hambre es como tenazas,
es como muerden los cangrejos,
quema, quema y no tiene fuego:
el hambre es un incendio frío.*

*Sentémonos pronto a comer
con todos los que no han comido,
pongamos los largos manteles,
la sal en los lagos del mundo,
panaderías planetarias,
mesas con fresas en la nieve,
y un plato como la luna
en donde todos almorcemos.*

*Por ahora no pido más
que la justicia del almuerzo.
“El gran mantel” de Pablo Neruda*

Sobre la seguridad alimentaria

La seguridad alimentaria es uno de los desafíos más apremiantes del siglo XXI, particularmente en relación con la calidad nutricional de los alimentos básicos. La misma se entiende como el acceso físico, social y económico permanente a alimentos suficientes, seguros y nutritivos que satisfagan las necesidades dietéticas y preferencias alimenticias para una vida activa y saludable (FAO, 1996). Este concepto se sostiene sobre cuatro pilares fundamentales que son la disponibilidad, el acceso, la estabilidad y la utilización. La disponibilidad se refiere a que exista una cantidad adecuada de alimentos con la calidad suficiente para satisfacer las necesidades de la población. La base de este pilar radica en la producción agrícola, siendo ampliamente apoyada por los avances en la tecnología, la mejora de las prácticas de cultivo, el uso de fertilizantes y pesticidas y el desarrollo de mejores variedades de cultivo. La disponibilidad de alimentos a futuro se ve seriamente afectada por el cambio climático, la degradación de los suelos y las nuevas plagas, limitando no solo la capacidad productiva sino también la infraestructura de transporte y almacenamiento de los alimentos. El acceso se refiere a la capacidad de las personas para obtener alimentos adecuados para su nutrición. Este pilar es crucial porque, aunque los alimentos puedan estar disponibles en un país o región, si las personas no tienen los recursos económicos, sociales o físicos para acceder a ellos, la seguridad alimentaria no puede ser alcanzada. Uno de los principales determinantes del acceso a los alimentos es el factor económico. El ingreso de las familias y su capacidad de compra influyen directamente en su acceso a alimentos suficientes y nutritivos, como también así el conocimiento sobre nutrición y prácticas alimentarias adecuadas. El tercer pilar es la estabilidad, que consiste en que las personas tengan acceso a los alimentos de manera sostenida en el tiempo, sin el riesgo de perderlo por crisis económicas, políticas o climáticas. Finalmente, el último pilar es la utilización, que establece el uso adecuado de los alimentos, para garantizar una dieta balanceada en términos de micro y macronutrientes. Los macronutrientes, que incluyen carbohidratos, proteínas y grasas, son esenciales para proporcionar la energía y los componentes necesarios para el crecimiento y el mantenimiento del cuerpo humano, y deben ser consumidos en mayores cantidades que los micronutrientes. Estos últimos incluyen a vitaminas y minerales esenciales que, aunque se necesitan en cantidades pequeñas, tienen un impacto significativo en la salud:

- **Vitamina A:** Es crucial para la visión, el sistema inmunológico y la reproducción. Su deficiencia puede causar ceguera nocturna y aumentar el riesgo de infecciones.
- **Vitamina C:** Es importante para la síntesis de colágeno, la absorción de minerales y el funcionamiento del sistema inmunológico.
- **Vitamina D:** Ayuda en la absorción de calcio y fósforo, esenciales para la salud ósea.
- **Vitaminas del complejo B:** Incluye a las vitaminas B1, B2, B3, B5, B6, B7, B12 y el ácido fólico que son esenciales para el metabolismo energético, la función cerebral y la producción de glóbulos rojos.
- **Hierro (Fe):** Esencial para la formación de los glóbulos rojos y cofactor de diversas enzimas.
- **Zinc (Zn):** Es importante para el crecimiento y desarrollo celular.
- **Calcio:** Es fundamental para la salud ósea y la función muscular. Su deficiencia puede llevar a osteoporosis y fracturas óseas.
- **Yodo:** Es crucial para la producción de hormonas tiroideas. Su deficiencia puede causar bocio.

Sobre la importancia del Fe y el Zn

El Fe cumple funciones indispensables en el cuerpo y se encuentra formando parte de dos compartimentos, uno funcional y otro de almacenamiento. En el funcional se lo encuentra principalmente como parte del grupo hemo, un grupo prostético que forma parte de diversas proteínas como la hemoglobina en los glóbulos rojos (que se encargan de transportar el oxígeno a todo el cuerpo) y la mioglobina (de homóloga función en células musculares). También puede encontrarse formando parte de la transferrina o como cofactor de diferentes enzimas (Ganz & Nemeth 2012). En el de almacenamiento, se encuentra asociado a la ferritina o a la hemosiderina. Los niveles de Fe en el cuerpo están principalmente regulados por la hepcidina, una hormona producida por los hepatocitos que inhibe la absorción de Fe del tubo digestivo (Kwapisz et al. 2009). Para esto, la hepcidina se une a la proteína de membrana ferroportina (transportadora de Fe), induciendo su secuestro por invaginación y su posterior degradación por lisosomas (Veena & Nemeth 2017). La deficiencia de Fe se define como una condición en la que no hay reservas de Fe movilizables, no pudiendo suplementar a los tejidos y a los glóbulos rojos. Los estadios más severos de esta deficiencia pueden llevar a anemia, fatiga, debilidad y, en casos graves, afectar el desarrollo cognitivo y físico en niños, reducir la productividad laboral y aumentar la morbilidad y mortalidad materna. El rango en el estado de Fe de una persona puede ir desde falta de Fe con anemia a falta de Fe sin anemia, luego puede tener un contenido suficiente de Fe (con un rango variable de Fe almacenado), y finalmente un exceso de Fe, que puede causar daño en órganos (Figura 1, OMS 2001).

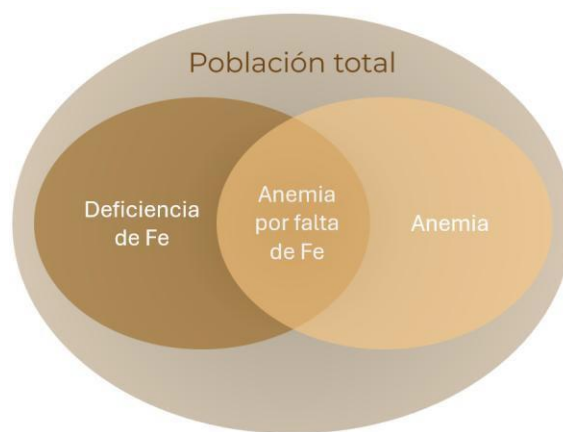


Figura 1. **Deficiencia de Fe y anemia en la población.**

El Zn es requerido en funciones vitales del cuerpo humano, como la actividad de enzimas metaloproteasas, el crecimiento y desarrollo de los tejidos, la protección contra enfermedades infecciosas, la mineralización ósea, la correcta función tiroidea y cognitiva, el desarrollo fetal y la inmunidad (Bhowmik et al. 2010; Prasad 2013; Gammoh & Rink 2017; Calayugan et al. 2021). La deficiencia de cualquiera de estos micronutrientes lleva a la malnutrición.

Sobre la malnutrición en Argentina

La malnutrición y la desnutrición suelen confundirse, pero es importante aclarar que no son sinónimos. La malnutrición se refiere a las carencias, los excesos y los desequilibrios de la ingesta calórica o de nutrientes de una persona (OMS, malnutrición), mientras que la desnutrición es un tipo de malnutrición, que comprende distintos tipos: la emaciación (insuficiencia de peso respecto a la talla), el retraso del crecimiento (talla insuficiente respecto a la edad), y la insuficiencia ponderal (menor peso al esperado para la edad). Otras formas de malnutrición son el sobrepeso y la carencia o exceso de micronutrientes. En Argentina, se realiza la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud (ENNyS), que proporciona información sobre aspectos relacionados con la nutrición. En este caso se analizan los datos de la primer ENNyS (Abeyá et al. 2007), dado que la segunda (2018-2019) redujo significativamente su análisis y no incorporó información sobre anemia ni deficiencia de Fe, por lo que no se cuenta con datos poblacionales actualizados. Según la primer ENNyS, en Argentina el 16.5% de los niños y niñas de entre 6 y 72 meses padece anemia, y la distribución varía a lo largo del país, teniendo el menor porcentaje de niños y niñas con anemia en la región de cuyo (10.1%), y el máximo porcentaje en la región del noreste argentino (22.4%). Para niños y niñas de entre 6 y 23 meses, los valores de anemia ascienden al 34.1% a nivel país, y varía si el hogar tiene necesidades básicas insatisfechas (41.1%) o no (29.4%). En estos mismos niños y niñas, el 35.3% presentó deficiencia de Fe, y la misma está inversamente relacionada con la ingesta de Fe (Figura 2). La prevalencia de anemia fue del 25% para el cuartil de niños con mayor ingesta de Fe (cuarto cuartil), mientras que fue del 44.5% para el cuartil con menor ingesta de Fe (primer cuartil). Esto muestra la importancia de la ingesta de cantidades suficientes de Fe para prevenir la anemia.

En el caso de las mujeres de 10 a 49 años, el 18.7% padece anemia (ENNyS). Como se muestra en la Figura 1, no todas las personas con deficiencia de Fe padecen anemia, ni todas las personas con anemia presentan deficiencia de Fe, pero ambas están relacionadas. El 44.3% de las mujeres argentinas de 10 a 49 años que poseían deficiencia de Fe presentaron anemia, mientras que ese valor cayó al 12.1% en las que no presentaron deficiencia de Fe (Figura 2 c). Del total de mujeres encuestadas a nivel nacional, el 97.9% no utilizó suplementos de Fe, demostrando que esta estrategia tiene una gran limitación en el acceso. La anemia afecta particularmente a personas embarazadas por sus elevados requerimientos de Fe. En Argentina el 59.3% de las personas embarazadas tiene una ingesta de Fe por debajo de lo recomendado, y el 30.5% presenta anemia.

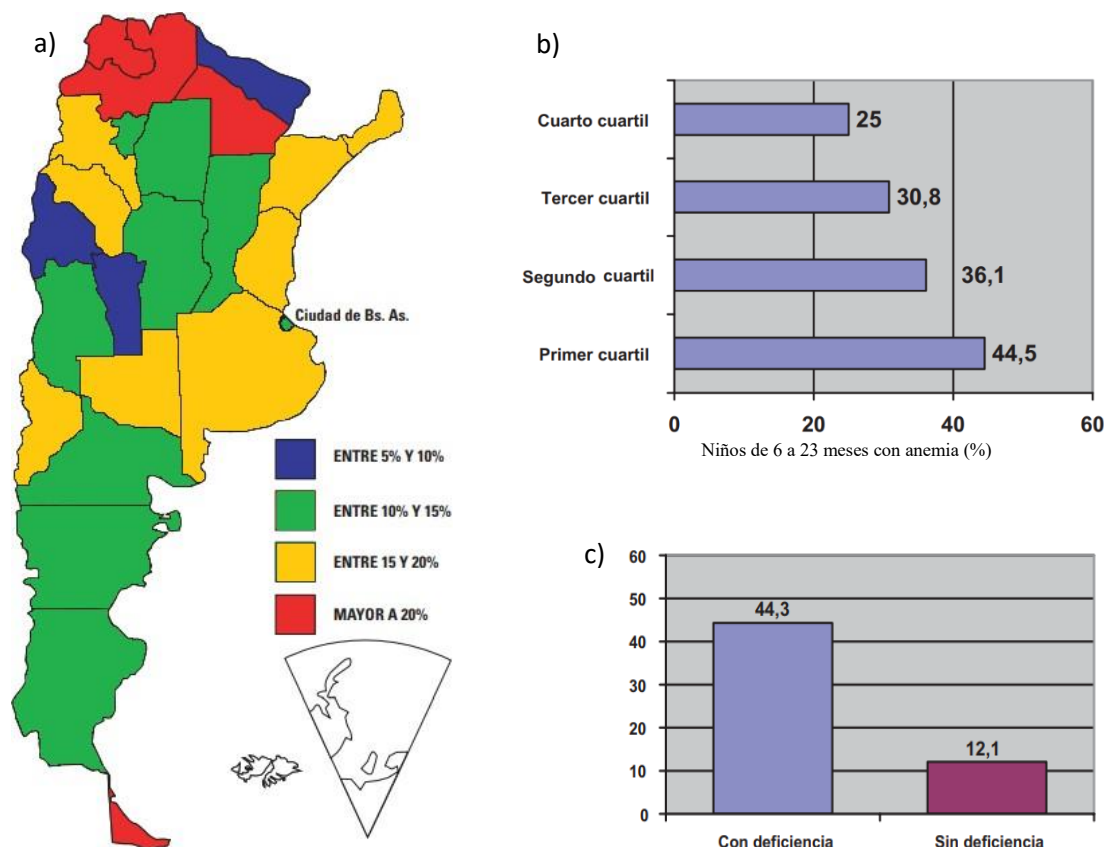


Figura 2. **Anemia en la Argentina** (modificado a partir de la ENNyS). a) Distribución de anemia en niños de 6 a 23 meses en Argentina. b) En el eje X, porcentaje de niños y niñas de 6 a 23 meses con anemia, distribuidos en 4 cuartiles de acuerdo a su ingesta de Fe (siendo el cuarto cuartil el de mayor ingesta). c) Prevalencia de anemia (%) según depleción de depósitos de Fe en mujeres de 10 a 49 años en Argentina.

Según el capítulo XVII del código alimentario argentino, la ingesta diaria recomendada de Zn es de 4.9 mg para una mujer adulta y 10 mg para personas embarazadas o en período de lactancia. De acuerdo con la ENNyS 2007, se estima que el 4.2% de los niños y niñas menores de 5 años y el 33.5% de las mujeres de 10 a 49 años no ingieren la dosis recomendada de Zn (este valor asciende al 52.15% en mujeres embarazadas). Se observó una mayor proporción de niños y niñas de esta edad con una ingesta de Zn menor a la recomendada si el hogar tiene necesidades básicas insatisfechas (5.9%) que si no (3.4%). Para niños de 6 a 23 meses, a nivel país el 11.6% posee una ingesta por debajo del valor recomendado, pero en el noreste argentino la proporción fue del 18.8%.

Sobre la malnutrición en el mundo

En el mundo, la malnutrición debida a la baja ingesta de micronutrientes afecta a un tercio de la población (Van Der Straeten et al. 2020). El 69% de las mujeres no embarazadas en edad reproductiva y el 56% de los niños y niñas en edad preescolar presentan deficiencia de al menos un micronutriente

(Stevens et al. 2022). Una de las principales deficiencias nutricionales a nivel global en la actualidad es la deficiencia de Fe, afectando a más de dos mil millones de personas, especialmente en países en vías de desarrollo donde las dietas son predominantemente basadas en vegetales y carecen de suficientes fuentes de Fe biodisponible (Lynch 2020, Figura 3 a). La prevalencia de anemia en niños de edad escolar en países industrializados fue del 5.9%, en contraste con el 48.1% en países en vías de desarrollo (OMS 2001). La deficiencia de Zn se clasifica como el quinto factor de riesgo principal para enfermedades en el mundo en desarrollo (Maret & Sandstead 2006), y es una causa importante de mortalidad infantil en más de 178 países (Black et al. 2008) (revisado por Senguttuvel et al. 2023). Se estima que el 17.3% de la población mundial está en riesgo de insuficiente consumo de Zn (Wessells & Brown 2012, Figura 3 b).

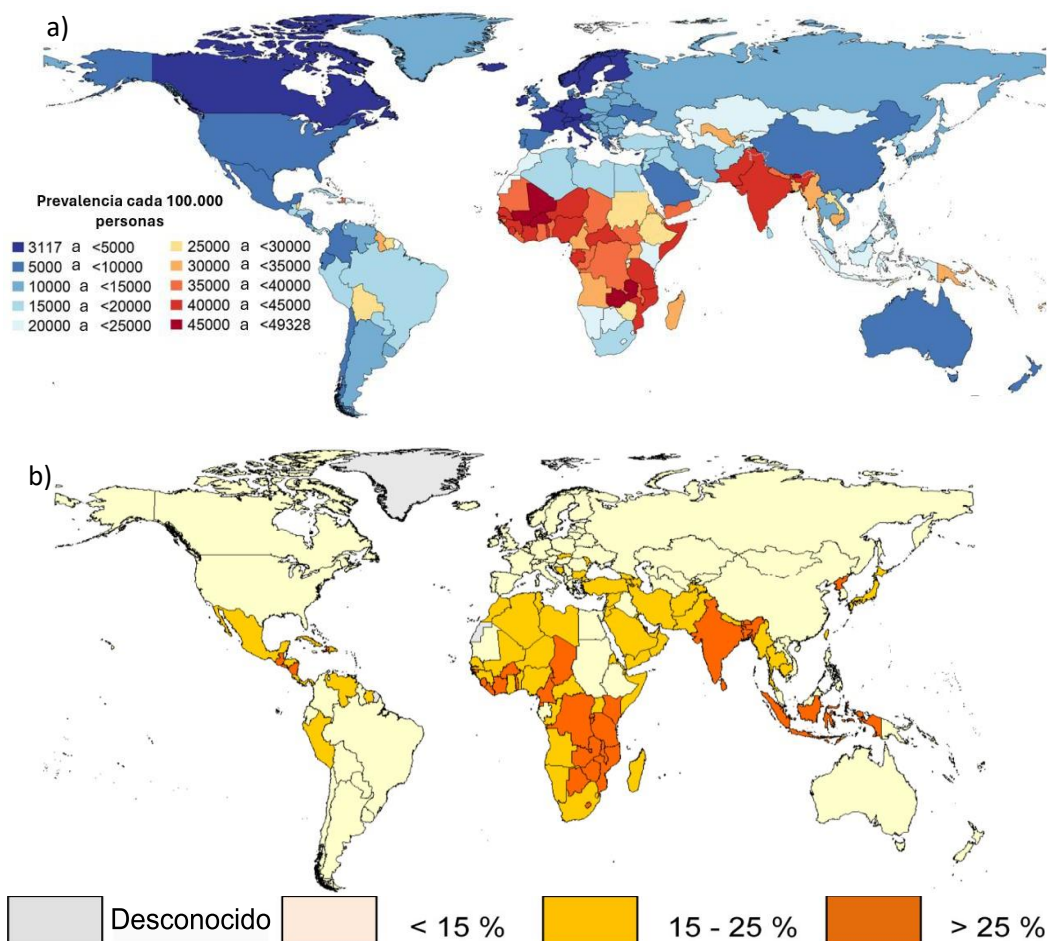


Figura 3. **Distribución de la anemia y deficiencia de zinc en el mundo.** a) Distribución de anemia en el mundo, adaptado de Safiri et al. 2021. b) Distribución de la deficiencia de Zn en el mundo, tomado de Wessells & Brown 2012.

Es el segundo objetivo de la ONU en su programa de desarrollo sustentable acabar con todas las formas de hambre del mundo para el 2030. Para esto hay diversas estrategias difundidas. En el caso de la

falta de micronutrientes, las principales estrategias en la actualidad son la fortificación mediante agregado de vitaminas y minerales en los alimentos y el uso de suplementos dietarios. La desventaja de ambas estrategias es que presentan un alto costo, requieren de infraestructura y dependen de una buena red de distribución, dificultando el acceso para las personas de bajos recursos o de zonas rurales (Gómez-Galera et al. 2010). Por ejemplo, en el caso de Argentina, el 18.7% de las mujeres de 10 a 49 años presentan anemia (ENNyS 2007), pero solo el 1.1% de las mujeres consume suplementos de Fe (Kogan et al. 2008). Una de las estrategias utilizadas es la fortificación de los cultivos, que consiste en el agregado de micronutrientes post-cosecha. Esta estrategia es parcialmente efectiva, ya que implica un incremento en el costo productivo. Como alternativa, un método más eficiente y económico es el incremento de micronutrientes biodisponibles en la porción comestible de los cultivos antes de su cosecha, conocido como biofortificación (FAO 2022). Ambas respuestas permiten proveer de los micronutrientes necesarios a la población, sin necesidad de generar cambios en sus hábitos alimenticios. La biofortificación incluye tres estrategias: La biofortificación agronómica, que consiste en proveer a los cultivos de fertilizantes para incrementar su contenido de micronutrientes, la biofortificación mediante mejoramiento convencional, que se basa en realizar cruza entre variedades de un mismo cultivo buscando un incremento de los micronutrientes, y la biofortificación mediante ingeniería genética, que utiliza a la misma para desarrollar nuevas variedades de cultivos con nuevas o mejoradas propiedades (Li et al. 2024). El programa HarvestPlus del CGIAR apoya la investigación, desarrollo y comercialización de cultivos biofortificados en el mundo, el cual gana apoyo de forma creciente al punto que el Banco Mundial afirmó que los cultivos biofortificados deben ser la norma y no la excepción (World Bank 2017). En parte gracias a este programa, hoy cerca de 20 millones de personas en zonas rurales de países en desarrollo cultivan y consumen cultivos biofortificados (Bouis et al. 2017). Tres criterios deben cumplirse para el éxito de un cultivo biofortificado: 1) debe tener altos rendimientos, ser rentable y aceptado por el productor, 2) el cultivo biofortificado debe ser eficaz y efectivo para reducir la malnutrición por micronutrientes en los seres humanos, 3) debe ser aceptado por los consumidores en las regiones donde la malnutrición por falta de micronutrientes es más severa.

Sobre la biofortificación

Diversas estrategias de biofortificación se han utilizado con éxito. El reemplazo de arroz blanco por arroz biofortificado con β -caroteno reduciría en un 78% la prevalencia de insuficiencia de vitamina A en mujeres en Bangladesh y en 55-60% en mujeres de Filipinas e Indonesia (De Moura et al. 2016). La fertilización de suelos con Zn antes de la cosecha ha demostrado incrementar de dos a tres veces el contenido de Zn en cereales, pero su éxito depende mucho de la especie y del suelo (Rashid & Fox - 1992). Esta aplicación en suelos no es efectiva en el caso del Fe, ya que rápidamente se convierte a la forma Fe^{3+} que no está disponible para las plantas. La aplicación de quelatos de Fe permite sobrepasar este problema de disponibilidad, pero el costo económico de estos es muy alto (Rengel et al. 1999). Por tanto, hay un alto interés en el desarrollo de cultivos con mayor capacidad de captar y transportar los micronutrientes hacia la porción comestible de la planta. En el caso del Zn y el Fe, la biofortificación mediante cruza de variedades ha llevado a incrementos en el contenido de dichos minerales en diversos cultivos. El IRRI

(International Rice Research Institute) presentó una cruce de las variedades IR72 y Zawa de arroz, que dieron origen a la línea IR68144-3B-2-2-3, con un 400% más de Fe que otras líneas comerciales, y que además pierde una menor proporción de este mineral durante el procesado industrial (Gregorio et al. 2000). Mediante cruces, se logró también desarrollar porotos con incrementados niveles de Fe (84 mg/kg de peso seco) respecto a los cultivares comúnmente utilizados (50 mg/kg de peso seco). La alimentación durante 128 días de un grupo de mujeres en Ruanda con estos porotos biofortificados incrementó significativamente el contenido de Fe en sangre (Haas et al. 2016). También se observó un resultado positivo al utilizar una variedad biofortificada de mijo (ICTP8203) por sobre una variedad comercial (DG9444) para alimentar a niños en edad escolar en la India (Finkelstein et al. 2015).

El Centro Internacional de la Papa (CIP) está trabajando desde hace más de 15 años en el desarrollo de variedades de papa biofortificadas mediante cruce de variedades en asociación con el programa HarvestPlus. Al inicio los niveles de Fe y Zn en los tubérculos que utilizaron eran de 0.48 mg/100g y 0.35 mg/100g respectivamente, pero después de cría y selección recurrente lograron elevarlos hasta 0.73 mg/100g de Fe y 0.63 mg/100g de Zn (Bonierbale et al. 2020).

Sobre la biofortificación mediante ingeniería genética

El caso de biofortificación por ingeniería genética que llevó al desarrollo del arroz dorado trajo grandes debates, hasta que diversos estudios mostraron su eficacia y recibió aprobación de la FDA (Tang et al. 2009, Owens 2018). El mismo fue creado por un equipo de científicos liderado por Ingo Potrykus del Instituto Federal Suizo de Tecnología en Zúrich y Peter Beyer de la Universidad de Friburgo en Alemania. Este arroz genéticamente modificado fue diseñado para producir betacaroteno, un precursor de la vitamina A, con el objetivo de combatir la deficiencia de este micronutriente en regiones donde el arroz es un alimento básico (Ye et al. 2000). En el caso de las papas, las estrategias de biofortificación por ingeniería genética han demostrado una gran eficiencia. De acuerdo con Chakraborty et al. 2010, la expresión transgénica del gen *AmA1* de amaranto en tubérculos de plantas de papa llevó a un incremento de hasta 60% en el contenido de proteínas de este cultivo. Otro ejemplo en este cultivo fue la expresión de cuatro genes de la biosíntesis de folato (vitamina B9) de manera específica en tubérculos, que llevó a un incremento del 1200% en el contenido de esta vitamina (De Lepeleire et al. 2018).

Con el objetivo de incrementar el contenido de Fe biodisponible en arroz, se desarrollaron líneas transgénicas de arroz que expresan la lactoferrina humana (HLF), una proteína presente en la leche materna con la capacidad de unir dos átomos de Fe. En estas líneas transgénicas se logró un 0.5% del peso seco en HLF, y un incremento del 100% en su contenido de Fe en granos (Nandi et al. 2002). Las estrategias biotecnológicas más ampliamente utilizadas conllevan el uso de la ferritina, la nicotianamina sintasa, y de transportadores como el Iron Regulated Transporter (IRT) o Yellow Stripe Like (YSL) que ayudan en la captación del Fe y el Zn del suelo. Estos micronutrientes cumplen un rol central en diversos procesos fisiológicos de las plantas y sus deficiencias tienen altos impactos productivos.

A la hora de planificar y desarrollar la biofortificación de un cultivo, es importante que el mismo se encuentre ampliamente distribuido, sea de fácil acceso y de bajo costo, a fin de garantizar el mayor

impacto posible del producto. La papa es el tercer cultivo alimenticio más importante del mundo después del arroz y el trigo. Su alta productividad y adaptabilidad a diferentes condiciones climáticas la convierten en un alimento esencial, siendo en algunas regiones rurales de América Latina y África la principal fuente de energía de la población, que consume entre 300 y 800 gramos al día. Estos tubérculos presentan buenos parámetros nutritivos en cuanto al contenido de algunos micronutrientes como potasio, calcio y vitaminas C, K y B6 (Agrawal et al. 2024). El contenido de Fe y Zn de las papas que se utilizan comercialmente en la actualidad presenta un gran potencial para su mejora.

Sobre la planta de papa

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una planta dicotiledónea herbácea anual originaria de América del Sur, que pertenece al orden de las Solanales y que fue descrita y nombrada por Carlos Linneo en la página 185 de su libro *Species Plantarum* (Linnaeus 1753). Perteneció a la familia Solanaceae, y más específicamente al género *Solanum*, al igual que el tomate, la berenjena y otras especies de importancia económica. El epíteto latino *tuberosum* significa “con tubérculo”, refiriéndose a su capacidad de tuberizar y formar la porción comestible de la planta. Cuenta con dos subespecies, la *Solanum tuberosum andígena* nativa de los Andes y la *Solanum tuberosum tuberosum*, con origen en la península de Chiloé. La planta de papa tiene una historia tan rica como su tubérculo.

Sobre la historia del cultivo de papa

Las primeras evidencias de su uso y cultivo se remontan a los años 3400 a 1600 ac., en la cuenca oeste del lago Titicaca, territorio actual de Perú (López Estupiñán 2023). Durante el desarrollo del imperio Inca la papa se volvió un cultivo central, que los españoles descubrieron en el año 1532. La papa fue llevada a Europa, donde en un principio fue recibida como especie ornamental, y tardó varias generaciones en volverse una fuente de alimento central. De acuerdo con Nunn et al. (2011), la introducción de la papa en Europa tuvo un impacto tan grande que redujo la hambruna y los conflictos bélicos durante al menos dos siglos. Fue tal su difusión en Irlanda, que el cultivo de papa se volvió la principal fuente de alimentos y cerca de un tercio de su población a mediados del siglo XIX dependía casi exclusivamente de la papa para su alimentación. Esta gran dependencia de un solo cultivo generó que una plaga de *Phytophthora infestans* que se extendió por el país entre 1845 y 1849, destruyera los cultivos de papa y generara lo que se conoce como “La Gran Hambruna”, durante la cual la población de la isla se redujo en un 25% (Pafumi 2023). La susceptibilidad a patógenos y la necesidad de utilizar variedades con mayor independencia del fotoperíodo, llevaron a la utilización de la subespecie *tuberosum* por sobre *andígena*, que en la actualidad solo se cultiva en algunas regiones de los Andes sudamericanos.

Sobre el cultivo de papa en la actualidad

Hoy en día, la producción mundial de papa alcanza los 375 millones de toneladas siendo China e India los principales productores (FAO 2023). Argentina produce unos 2.9 millones de toneladas, destinándose aproximadamente 75-80 mil hectáreas a su cultivo que es mayormente para el consumo interno, convirtiéndolo en la hortaliza de mayor consumo en el país. Las principales regiones productoras de Argentina son: Buenos Aires (55%), Córdoba-San Luis (28,8%) y Tucumán (7,7%) como se muestra en la Figura 4 (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca 2023). La gran adaptabilidad de este cultivo a los diversos climas y suelos permite que, durante todo el año, en el mercado argentino haya tubérculos frescos disponibles. Entre octubre y diciembre las papas producidas en Buenos Aires bajan su disponibilidad en el mercado nacional, y es donde las papas de Córdoba, San Luis y Tucumán se encuentran con alta disponibilidad (Figura 4).

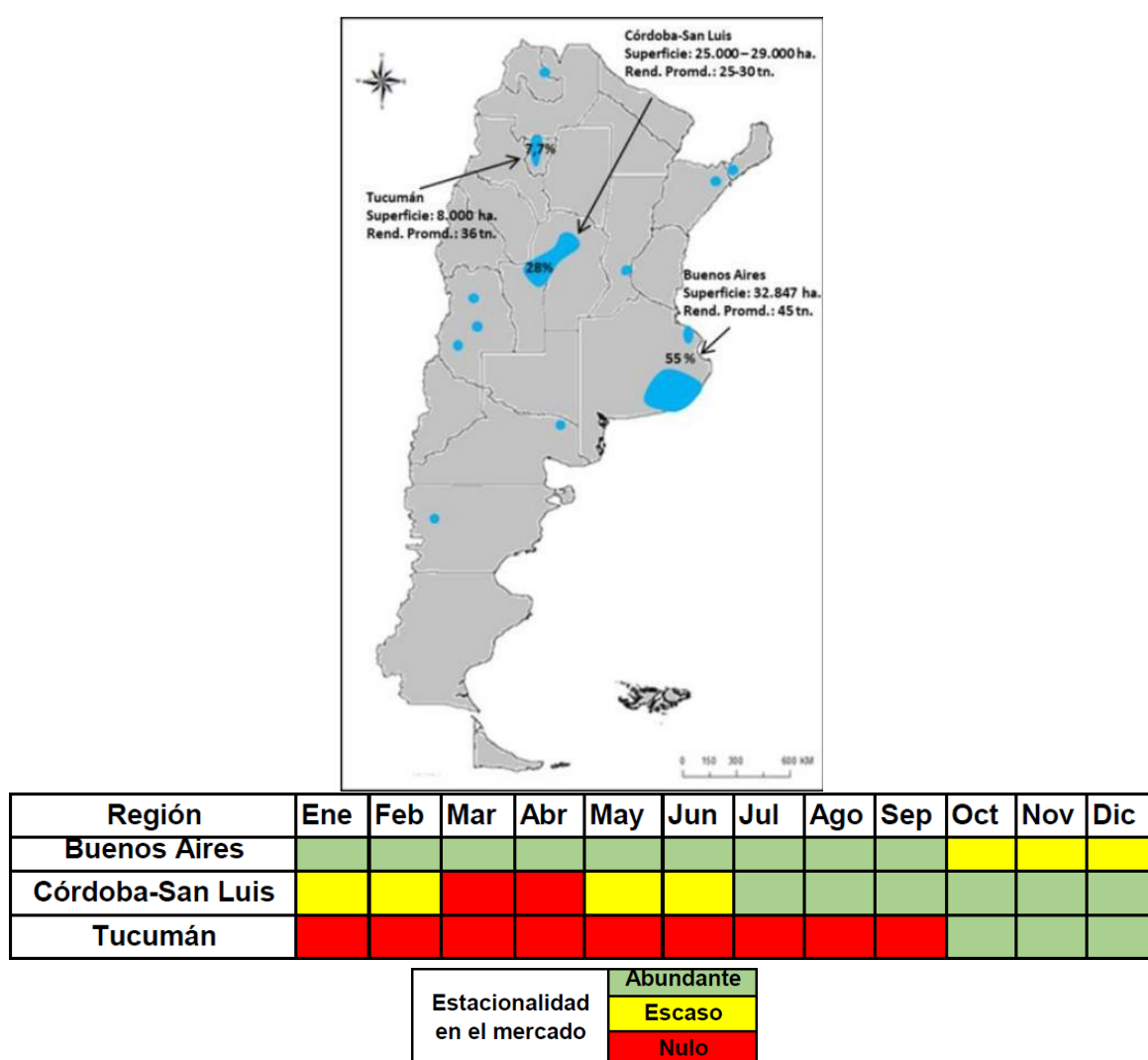


Figura 4. **Producción de papa en la Argentina.** a) mapa de las principales zonas productivas del país. b) Estacionalidad productiva de las tres principales regiones. Tanto el mapa como el cuadro son adaptados del informe de la Secretaría de Agricultura y Pesca de la Argentina 2023.

El 90% de la superficie para consumo fresco en el país utiliza la variedad Spunta, perteneciente a *Solanum tuberosum* subespecie *tuberosum*, creada en Holanda en 1968 a partir de la cruce de las variedades BEA y USDA 96-56 (Secretaría de agricultura, ganadería y pesca 2021, European Cultivated Potato Database). Esta variedad presenta varias ventajas de adaptación a los climas de Argentina, es independiente del fotoperíodo para su tuberización, y su éxito se debe a los altos niveles de rendimiento de hasta 70 Tn/Ha. El tamaño de los tubérculos es grande, presenta resistencia al Virus A y mediana sensibilidad tanto al Virus Y como a *Synchytrium endobioticum*, causante de la verruga de la papa (de acuerdo con la Organización Interprofesional Francesa para las semillas y plantas, SEMAE). Su capacidad de conservación es media (al igual que su período de dormición), y presenta resistencia intermedia a *Phytophthora infestans* y la sarna común de papa. Entre sus principales desventajas se encuentra su bajo contenido de materia seca, su baja calidad culinaria y su sensibilidad al Virus X (Figura 5).

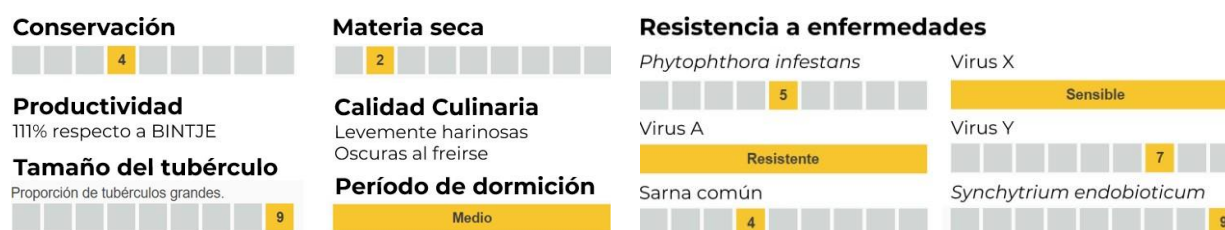


Figura 5. Características de la variedad Spunta. Armado en base a información de la SEMAE.

La papa es una fuente importante de carbohidratos y algunos minerales como el potasio, presentando mayores niveles por gramo de peso fresco que otras fuentes como la banana. La composición química de los tubérculos de papa puede verse en la siguiente figura:

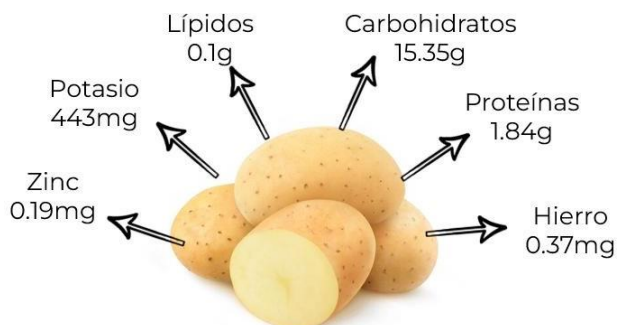


Figura 6. Composición nutricional de tubérculos frescos de papa cada 100g, (Sablani y Mujumdar 2006) para la variedad Russet burbank.

Sobre el proceso de tuberización

Hay un alto interés en el proceso de formación de los tubérculos, ya que su estudio y mejoramiento puede tener impactos directos en la producción. El tubérculo de las papas se forma a partir de los estolones, unos tallos subterráneos generados por la planta. La formación de tubérculos tiene una doble función para la planta, ya que pueden funcionar como órganos de almacenamiento en condiciones ambientales desfavorables, o como sistema de propagación. Para esto último, al entrar en senescencia la planta, los tubérculos se desprenden y quedan en estado de dormición bajo tierra, donde a partir de las diversas yemas surgen nuevas plántulas (Figura 7).

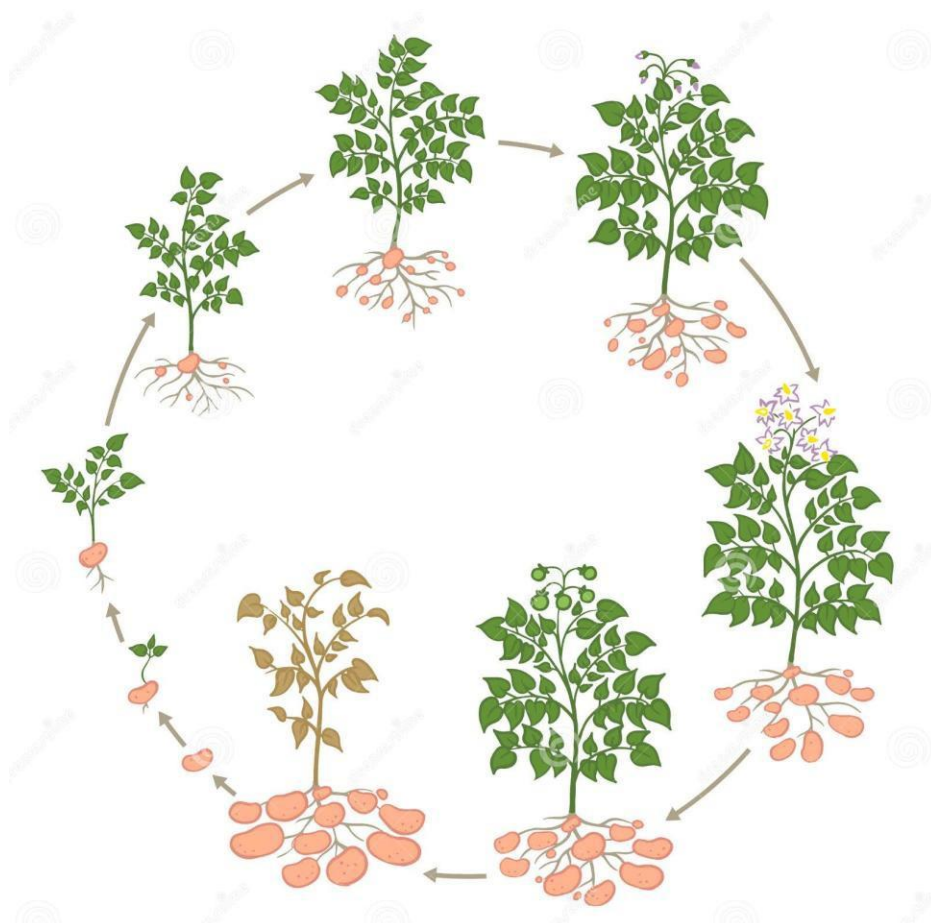


Figura 7. **Ciclo de vida de *S. tuberosum***. A partir de un tubérculo bajo tierra surge una planta, que se desarrolla y da lugar a nuevos tubérculos subterráneos. La planta entra en senescencia y a partir de los tubérculos subterráneos que desarrolló, se generan nuevas plantas.

Para que los estolones se diferencien en tubérculos, debe darse un complejo proceso morfo-fisiológico altamente regulado por las condiciones ambientales conocido como tuberización. Al inicio de la formación del tubérculo, las células de la médula y la corteza aumentan su tamaño y se dividen longitudinalmente, lo que da lugar al engrosamiento subapical del estolón. Cuando los tubérculos

alcanzan un diámetro determinado las divisiones longitudinales cesan y, en la región perimedular, las células comienzan a dividirse en planos orientados al azar y aumentan su tamaño hasta que el tubérculo finaliza su desarrollo. La generación del tubérculo en la porción subterránea es acompañada por otros cambios morfológicos en la porción aérea de la planta (Ewing & Struik 1992, Martínez-García et al. 2002). Las hojas se hacen más grandes y finas, adoptando un color verde pálido, los tallos se vuelven más gruesos y frenan su elongación, se inhibe la ramificación de la planta, los pimpollos frenan su desarrollo y se acelera la senescencia. Cada etapa del proceso de tuberización se encuentra bajo el control de factores medioambientales y genéticos. Es la interacción del genotipo, edad y estado fisiológico de la planta lo que determina la respuesta a un determinado estímulo (Jackson 1999).

Sobre el Fe y Zn en las plantas

El Fe es un componente esencial para numerosas funciones biológicas en las plantas, cumpliendo un rol central en la síntesis de clorofila, en la cadena respiratoria y en la fotosíntesis. Debido a su rol central, el Fe fue uno de los primeros minerales en ser descrito como esencial para las plantas, en 1865 por Julius von Sachs (Kopriva 2015). La carencia de Fe por parte de las plantas se conoce como clorosis férrica, y tiene un alto impacto en el rendimiento de los cultivos a nivel global. Esto se debe a que, si bien el Fe es el cuarto elemento en abundancia en el mundo, el mismo debe encontrarse en una forma biodisponible para que la planta pueda captarlo. En suelos alcalinos el Fe se encuentra de forma insoluble, lo cual representa cerca del treinta por ciento de los suelos cultivables. Además, la presencia de otros iones metálicos como el Zn y el Cobre (Cu) puede interferir con la absorción del Fe. El Zn está involucrado, entre otras cosas, en la activación de enzimas del metabolismo de carbohidratos, la síntesis de proteínas y auxinas, la formación del polen y la expresión de genes de respuesta a estrés abiótico (Hafeez et al. 2013). La deficiencia de Zn en plantas y suelos afecta a más de 40 países y un 30% de los suelos agrícolas (Alloway 2004, Alloway 2008).

Sobre la captación de Fe

El Fe no suele encontrarse de forma biodisponible en cantidades suficientes para las plantas. Para esto, han desarrollado diversos mecanismos de captación de Fe mediante sus raíces, que se pueden dividir en dos estrategias principales (Römheld & Marschner, 1986):

La estrategia del tipo I o de reducción es utilizada por plantas eudicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas. Hay un alto interés en este mecanismo, ya que involucra cultivos importantes como la papa, el tomate y la soja. Consiste en la secreción de protones (H^+) para aumentar la solubilidad del Fe^{3+} del suelo seguida de su reducción a Fe^{2+} por una proteína de membrana y su captación a través de un transportador de Fe (Figura 8 izquierda). En *Arabidopsis thaliana* se ha identificado a la *Arabidopsis H⁺-ATPasa 2 (AHA2)* como la responsable de esta acidificación local de la rizósfera, que

aumenta la solubilidad del Fe pasando a estar en mayor contacto con las raíces. Es en la membrana plasmática de estas raíces que se encuentra la enzima Ferric Reduction Oxydase 2 (FRO2) que reduce el Fe^{3+} a Fe^{2+} , para que pueda ser absorbido mediante el transportador Iron Regulated Transporter 1 (IRT1) (Martín-Barranco et al. 2020). Este transportador tiene baja selectividad, por lo que puede además ingresar otros minerales como Zn, Cu y Cadmio (Cd) a la célula de la raíz (Rogers et al. 2000). El paso limitante en la velocidad de captado de Fe de este complejo estaría dado por la reducción llevada a cabo por FRO2 (Connolly et al. 2003). En Arabidopsis, la expresión de los genes FRO2 e IRT1 se activa en condiciones de bajo Fe, mediante el factor de transcripción FIT (Yuan et al. 2008). Es interesante que en un estudio reciente se demostró que los tres componentes principales de este mecanismo (AHA2, FRO2 e IRT1) forman en Arabidopsis un complejo para optimizar la captación de Fe (Martin-Barranco et al. 2020). En estas plantas hay un segundo mecanismo que consiste en quelar el Fe^{3+} de la rizósfera mediante la secreción de cumarinas. Las mismas se secretan a través de la proteína de membrana PDR9/ABCG37, quelan al Fe^{3+} , y aumentan su disponibilidad para que FRO2 los reduzca (Fourcroy et al. 2016). Distintas cumarinas pueden ser secretadas, siendo más eficiente la fraxetina cuando el pH es neutro o alcalino. En pH ácido se incrementa la expresión de CYP82C4, favoreciendo la conversión de fraxetina a sideretina (Rajniak et al. 2018, Gautam et al. 2021), que también puede ser secretada y es más eficiente quelando el Fe a pH bajo.

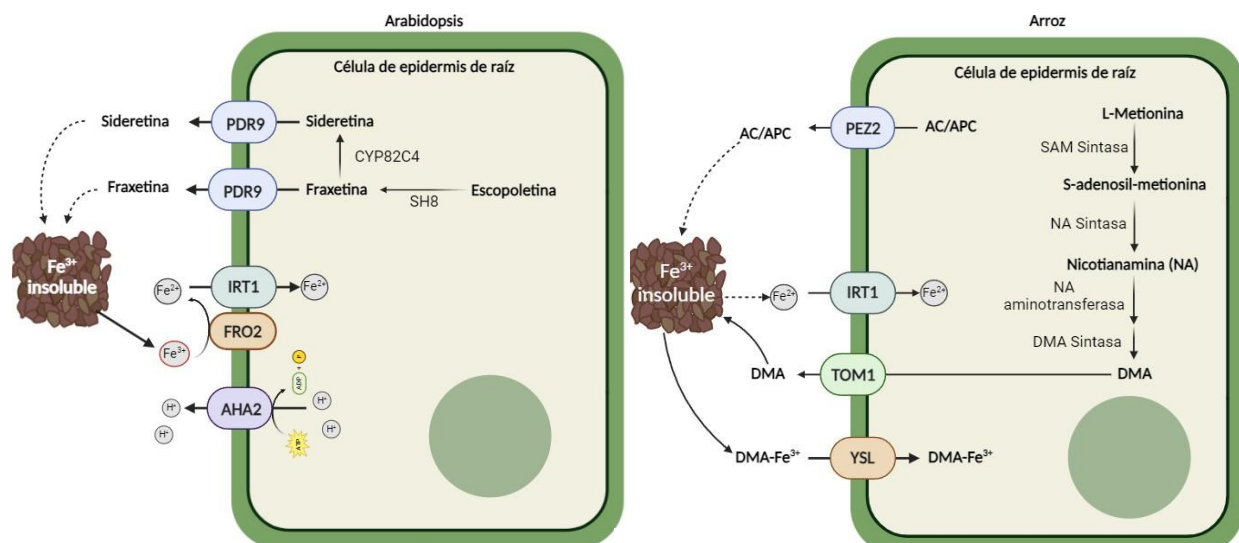


Figura 8. Estrategias de captado de Fe del suelo. Izquierda: esquema de la estrategia tipo I. Derecha: esquema de la estrategia del tipo II. Diseño propio basado en Liang 2022.

La estrategia II o de quelado es específica de gramíneas, por lo que es de alta importancia para cultivos centrales como el arroz, el maíz y el trigo (Figura 8 derecha). Estas plantas secretan moléculas conocidas como fitosideróforos, que tienen una alta afinidad por el Fe^{3+} y lo quelan en formas solubles. Estas moléculas se clasifican dentro del grupo de los ácidos mugineicos (MAs), formados a partir de la L-metionina, que es transformada en S-adenosil-metionina (SAM) por la enzima SAM Sintasa. Con tres moléculas de SAM, la enzima Nicotianamina Sintasa (NAS) forma la nicotianamina (NA), un aminoácido

no proteinogénico con un rol central en el quelado y transporte interno de metales (Mori & Nishizawa 1987). El gen que codifica la enzima NAS fue clonado por primera vez a partir de plantas de cebada (Herbik et al. 1999) y se encuentra en todas las plantas. La NA tiene la capacidad de quelar no solo Fe, sino también Zn, Cu y manganeso (Mn) en el interior de la raíz, y evitar que estos precipiten a lo largo de su transporte por el floema (Nozoye 2018). Además de su rol en todas las plantas, la NA funciona como sustrato de la enzima Nicotianamina aminotransferasa (NAAT) solo presente en gramíneas (Takahashi et al. 2003), que transforma la NA en 3'-oxo intermediario, sustrato de la DMA Sintasa que forma el ácido 2'-deoximugineico (DMA). El DMA puede ser secretado a través del transportador TOM1 (Transporter of mugineic acid 1) directamente, o habiendo sido modificado a otros DMAs. Una vez en la rizosfera, se encarga de formar el complejo DMA-Fe³⁺ que es ingresado a la raíz a través del transportador Yellow Stripe Like (YSL) (Inoue et al. 2009). Este complejo también tiene la capacidad de quelar e ingresar Zn a las células de la raíz. El Zn también aumenta su disponibilidad a medida que el pH desciende, pudiendo ingresar por el transportador IRT, o por transportadores de la familia ZIP (Zinc-regulated, Iron-regulated transporter-like Protein).

Estudios recientes muestran que los límites en la diferenciación entre plantas con estrategia tipo I y II son difusos, dado que algunas plantas como el arroz (gramínea) pueden emplear estrategias de tipo I y captar Fe²⁺ directamente desde la rizósfera en condiciones de bajo O₂ (Cheng et al. 2007). Además, tanto plantas gramíneas como no gramíneas comparten parte del mecanismo de captación de Fe. Las proteínas de arroz NRAMP1 y NRAMP5 participan de la captación de Fe de la rizosfera (Ishimaru et al. 2012) al igual que su ortólogo de Arabidopsis, el AtNRAMP1, que funciona como captador de Fe de baja afinidad (Castaings et al. 2016) a pesar de ser plantas con estrategias diferentes.

Sobre el transporte interno

Los minerales captados por la raíz deben viajar al resto de la planta para cumplir las múltiples funciones para las cuales son requeridos. El Fe²⁺ soluble puede resultar tóxico, y el Fe³⁺ tiene poca movilidad, por lo que el Fe debe unirse a otros compuestos para su translocación. El Fe²⁺ captado por las células epidérmicas se asocia con NA para formar el complejo Fe²⁺-NA a lo largo de su transporte radial hasta que ingresa al xilema (Seregin & Kozhevnikova 2023), donde es cargado por un transportador aún desconocido, y es oxidado a Fe³⁺. Tanto en gramíneas como en Arabidopsis, se ha visto que la mayor parte del Fe³⁺ presente en el xilema se encuentra asociado a citrato o malato para evitar su precipitación (Rellán-álvarez et al. 2010). En ambos casos los transportadores encargados de ingresar el citrato al xilema son los mismos, por lo que el transporte de la raíz al tallo es compartido entre gramíneas y Arabidopsis. El xilema es el encargado del transporte mayoritario desde las raíces hacia las hojas maduras, mientras que el transporte hacia las hojas jóvenes o hacia los órganos sumidero como los tubérculos se da mayormente a través del floema. En el floema, el Fe se encuentra mayormente asociado a NA como Fe²⁺-NA o sus DMAs derivados (en gramíneas). Por lo tanto, el NA en gramíneas no solo funciona como precursor de fitosideróforos para la captación del Fe, sino que también cumple un rol clave en el transporte interno de los minerales.

En *Arabidopsis*, la NA es ingresada en vesículas secretorias de las células por NAET1/2, y es secretada al apoplasto mediante exocitosis, donde se forma el complejo Fe^{2+} -NA (o Zn^{2+} -NA) que es ingresado al floema mediante los transportadores YSL (Chao & Chao 2022). Esto evita que los minerales se precipiten en el pH 7-8 del floema, y facilita su transporte hacia las células destino. La descarga del Fe-NA presente en floema hacia las células en las regiones sumidero se da a través de proteínas YSL (White & Broadley 2009). Una vez en el interior celular, el Fe puede cumplir sus funciones en citoplasma o ingresar a los plástidos a través de la proteína PIC1 (Pham et al. 2020). En plantas de papa (no gramíneas), la NA estaría involucrada en el transporte de Fe y Zn hacia los tubérculos. Esto hace que sea difícil pensar en una estrategia de biofortificación biotecnológica de papas que no involucre a la NA, ya que se encuentra directamente vinculada con la carga de los minerales en la porción comestible de la planta. La NA fue descrita por primera vez en *Nicotiana tabacum* (de ahí su nombre, Noma et al. 1971), y desde entonces se ha encontrado en todas las plantas estudiadas. En 1980, Buděšínský et al. lo describen como un quelante de Fe, pero en la actualidad se sabe que además está involucrado en la homeostasis de Zn, Niquel (Ni), Cu y Mn (Laffont & Arnoux 2020). La NA es sintetizada en todos los tejidos de la planta por la enzima NAS, que utiliza tres SAM para formar una molécula de NA, tres moléculas de S-metil-5'-tioadenosina, y liberar 3 protones (Figura 9 a).

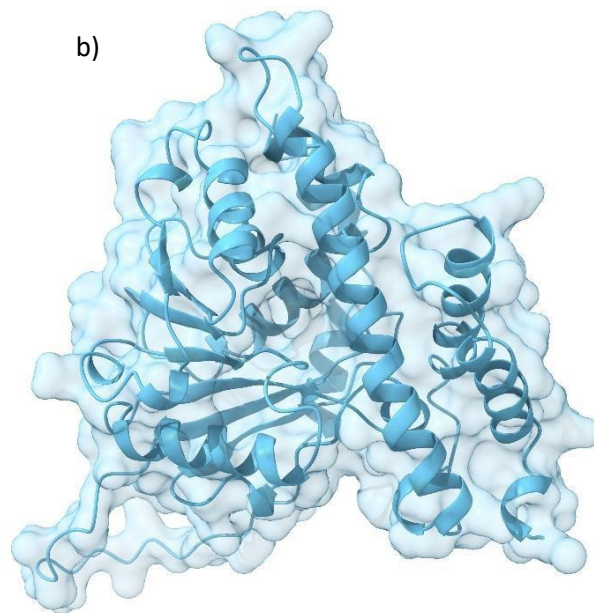
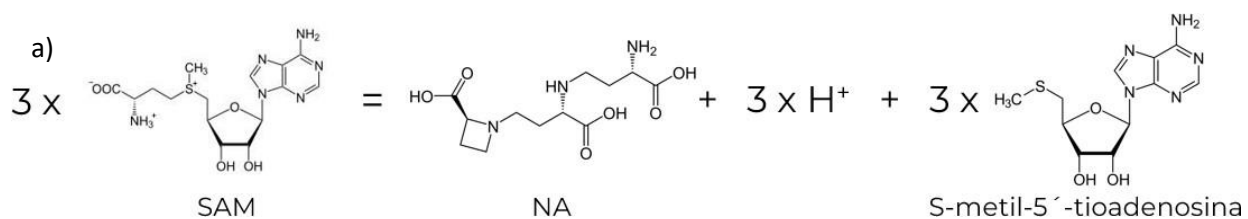


Figura 9. Descripción de la enzima AtNAS1. a) Reacción catalizada por las enzimas NAS. b) Estructura predicha para NAS1 de *A. thaliana* utilizando Alphafold 3.

En *S. tuberosum* se encuentra descrita una sola enzima NAS (*StNAS*) al igual que en otras solanáceas como tomate. La mutante *chloronerva* de tomate no posee actividad de NAS, y presenta un retraso en el crecimiento de raíces y tallos, junto con clorosis en las hojas jóvenes (Becker et al. 1995). En *A. thaliana* hay descritas cuatro enzimas NAS (*AtNAS1*, *AtNAS2*, *AtNAS3* y *AtNAS4*), y se ha observado que las plantas mutantes *nas4x* (incapaces de sintetizar NA) son estériles, cloróticas y que tienen retraso en el crecimiento, indicando que NA es esencial a lo largo del desarrollo de la planta (Klatte et al. 2009, Schuler et al. 2012). A su vez, la sobreexpresión de *NAS* en *Oryza sativa* incrementó el contenido de Fe, Cu y Zn de los granos (Johnson et al. 2011, Lee et al. 2009), demostrando el rol central de la NA en todas las plantas, sin importar su estrategia de captación de Fe. Una vez que los minerales son transportados a la célula destino, deben ser utilizados o almacenados de forma segura.

Sobre el almacenamiento del Fe

Dentro de las células vegetales, los niveles de Fe deben mantenerse en valores fisiológicos adecuados, de entre 10^{-3} – 10^{-5} M. Si hay déficit de Fe, la célula no puede cumplir adecuadamente sus funciones, mientras que el exceso de Fe es tóxico. Es aquí donde juega un rol crucial la ferritina, que puede acumular Fe hasta una concentración de 10^{-2} M, mientras que la solubilidad del Fe^{3+} en condiciones fisiológicas de pH y temperatura es de 10^{-18} M (Zielińska-Dawidziak 2015). Esta proteína es ubicua en plantas y animales (con algunas modificaciones) ya que ambas evolucionaron a partir de un ancestro común (Proudhon et al. 1996). Entre los eventos ocurridos a lo largo de la coevolución de las células de plantas y sus plástidos, uno es la redistribución de la ferritina desde el citoplasma hacia los plástidos, generando una diferencia de localización con respecto a las células animales (Waldo et al. 1995, Figura 10 a). Es en los plástidos donde 24 subunidades de la ferritina se arreglan de manera octaédrica para formar una estructura esférica hueca de 12-13 nm de diámetro con la capacidad de almacenar hasta 4500 átomos de Fe^{3+} (Figura 10). Puede apreciarse que el arreglo de ferritinas forma poros (centro de la figura 10 c y d) a través de los cuales ingresa el Fe que será acumulado por esta molécula. Esto permite una alta acumulación de Fe^{3+} de manera segura, evitando su precipitación en agregados y el daño oxidativo que podría generar el Fe en solución en el interior de la célula. Al ser ingerido por los animales, el Fe asociado a ferritina no tiene la alta biodisponibilidad que tiene aquel que proviene de un grupo hemo (como el asociado a hemoglobina o mioglobina), pero presenta mejor biodisponibilidad que aquel asociado a pequeñas moléculas no-hemo (oxalato, citrato férrico), incrementando su potencial como herramienta para la biofortificación (Zielińska-Dawidziak 2015).

a)
MALAPSKVSPFSGFSLSDGVGAVRNPTCSVLSFLNKKVGSRLGVSA **STVPLTGVIFEPFEEVKKEELAVPTAG**
QVSLARQYYADECESAINEQINVEYNASYVYHSLFAYFDRDNVALKGFAFFKESSEEREHAEKLMKYQNTRG
GRVVLHPIKNVPSEFEHVEKGDALYAMELALSLEKLVNEKLSVHSVADRNDPQLADFIESEFLSEQVEAIKKI
SEYVAQLRMVGKGHGVWHFDQSLLDGHAA

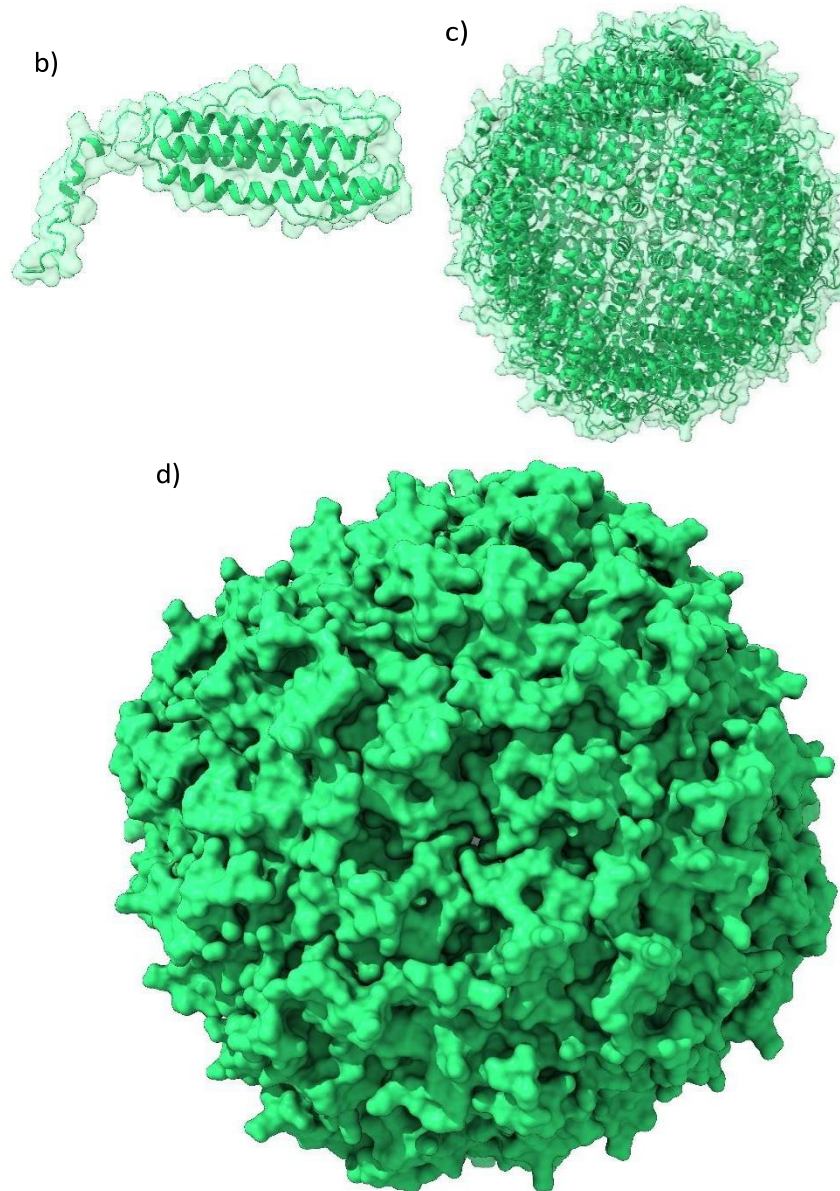


Figura 10. **Secuencia y estructura de la ferritina de *Phaseolus vulgaris*.** a) Secuencia de la ferritina de *P. vulgaris*. En verde, el péptido señal que lleva a su localización dentro de los plástidos, y que es clivado una vez que ingresa a los mismos, y en fucsia el péptido de extensión, propio de plantas, que se encarga de estabilizar la estructura (Spence et al. 1991, Masuda et al. 2010). b) Estructura predicha para una ferritina. c) y d) Estructura predicha por AlphaFold3 (<https://deepmind.google/technologies/alphafold/>) para la macromolécula formada por 24 ferritinas. Puede apreciarse en el centro el poro a través del cual ingresaría el Fe al interior de la macromolécula.

Sobre la absorción del hierro

Desde el punto de vista nutricional, la biodisponibilidad y la absorción del Fe son procesos clave para su utilización en el organismo. Existen dos formas principales del Fe en la dieta, el hierro hemo presente en alimentos de origen animal como carnes (que forma parte de la mioglobina y la hemoglobina) y el Fe no hemo que se encuentra principalmente en fuentes vegetales. La absorción de Fe hemo se encuentra poco caracterizada en comparación con la absorción de Fe no hemo (Fuqua et al. 2012). Se presume que es endocitado por las proteínas HCP1 presentes en las membranas de los enterocitos en el duodeno, pero no se conocen los detalles moleculares de este proceso (Shayeghi et al. 2005). Una vez dentro de los enterocitos, se libera del grupo hemo a través de hemo oxigenasas, y se exporta fuera de las células a través de la ferroportina (FPN1). El Fe hemo se encuentra secuestrado por una protoporfirina y no es accesible para otros factores que afectan la absorción del Fe no hemo, resultando en mayores niveles de absorción por parte del organismo de manera poco dependiente de la dieta (Anderson et al. 2017). En contraste, la absorción del Fe no hemo se encuentra mejor caracterizada. El mismo puede encontrarse en diversas formas que pueden ser Fe soluble, asociado a complejos de bajo peso molecular, asociado a ferritina o en el sitio catalítico de diversas proteínas. El hierro debe encontrarse en su forma reducida Fe^{2+} para poder ser absorbido, por lo que al no encontrarse tan fuertemente secuestrado como el Fe hemo, su biodisponibilidad se ve fuertemente afectada por otros componentes de la dieta. Los fitatos y taninos presentes en los vegetales pueden asociarse al Fe e impedir su absorción, mientras que el ácido cítrico o ascórbico pueden ayudar en mantenerlo en su forma reducida, mejorando su absorción (Anderson et al. 2017).

Si bien las papas no son consideradas una fuente de Fe vegetal como lo son las legumbres, la realidad es que su contribución en la dieta es significativa. Esto se debe a que el contenido de Fe y Zn en las legumbres es mayor que en papas, pero en el caso de las legumbres solo entre el 3.4% y el 4.7% del Fe se absorbe (Petry et al. 2012), mientras que en tubérculos de papa el 28% del Fe es absorbido (Jongstra et al. 2020). Esto se debe al bajo contenido de fitatos en las papas (Zhang et al. 2020) y a su alto contenido de ácido ascórbico, que favorece su absorción.

Resulta obvio decir que la agricultura siempre proveyó la mayor parte de los nutrientes y compuestos que los humanos requieren para su salud y desarrollo, pero a veces olvidamos que este es el rol central de la agricultura. El impacto de la biofortificación aún no fue pleno, pero la evidencia muestra su alto potencial como fuente de micronutrientes en la población. Hemos visto que la papa es uno de los cultivos centrales del mundo con una amplia distribución, bajo costo y fácil almacenamiento, y que además una gran proporción del Fe que contiene puede ser absorbido gracias a su composición, por lo tanto, su biofortificación tiene el potencial de volverse una herramienta central en la lucha contra la malnutrición. Es por esto que en este trabajo se busca incrementar el contenido de Fe y Zn en tubérculos de papa comerciales, sin necesidad del agregado artificial de Fe que complejiza y encarece la producción, dificultando su acceso a las poblaciones que más precisan de estos nutrientes.

Hipótesis

A continuación, se plantea la hipótesis principal de esta tesis doctoral:

- La expresión heteróloga de *AtNAS1* bajo un promotor constitutivo y de *PvFer* bajo un promotor específico para tubérculos en plantas de papa, incrementa significativamente el contenido en Fe y Zn de los tubérculos, mejorando su valor nutricional.

Objetivos

Objetivos generales

La mejora de la calidad nutricional de cultivos de amplia distribución es clave para la seguridad alimentaria. La fitoferritina permite el almacenamiento de Fe de manera segura en las plantas, mientras que la nicotianamina facilita su transporte hacia los órganos sumidero. En este sentido, el objetivo general de este trabajo es generar líneas transgénicas de papa que expresen el gen de la *Ferritina* de manera específica en tubérculos para facilitar la acumulación de Fe, y que a su vez sobreexpresen *Nicotianamina Sintasa 1* para facilitar su transporte hacia los mismos. El fin de esto es evaluar si la expresión heteróloga de estos genes permite una mayor acumulación de Fe y Zn en los tubérculos, sin tener un impacto negativo en el desarrollo de las plantas o en su rendimiento productivo.

Objetivos específicos

- Realizar la construcción de tres vectores binarios:
 1. pPZP-NPT-35S::AtNAS1 para expresar el gen *AtNAS1* de manera constitutiva en las plantas.
 2. pPZP-NPT-pPAT::PvFER para la expresión del gen de la *Ferritina* de manera específica en los tubérculos.
 3. pPZP-NPT-35S::AtNAS1-pPAT::PvFER para la expresión de ambos genes en una misma planta.
- Obtener plantas transgénicas para cada uno de los vectores mencionados, y sus respectivos controles de regeneración.
- Chequear la presencia de los transgenes en cada una de las líneas obtenidas y comparar su expresión entre tubérculo y hojas.
- Caracterizar el crecimiento vegetativo y diversos parámetros fisiológicos de todas las líneas obtenidas y la wt al ser pasadas de *in-vitro* a un invernadero (rusticado).
- Analizar el contenido de hierro y zinc de los tubérculos.
- Validar los resultados obtenidos de plantas rusticadas con plantas obtenidas a partir de tubérculos semilla.
- Caracterizar el crecimiento de las plantas transgénicas bajo distinta disponibilidad de Fe en el sustrato.

Materiales y métodos

1. Clonado y construcción de vectores

1.1 Cepas bacterianas utilizadas:

Para el clonado y construcción de vectores y la secuenciación se utilizaron dos cepas de *Escherichia coli* y una cepa de *Rhizobium radiobacter*:

1.1.1 *E. coli* DH5 α : Mutación recA1 que confiere alta estabilidad a los insertos, mutación endA que confiere alto rendimiento y calidad de ADN, y alta eficiencia de transformación, además de no contar con resistencia a antibióticos. genotipo: F-80dlacZM15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 - thi-1 gyrA96 relA1.

1.1.2 *E. coli* TOP10: Al igual que DH5 α cuenta con las mutaciones recA1 y endA que confiere alto rendimiento y calidad de ADN, y sumando además mutaciones en el sistema de restricción dependiente de metilación (mcrA, mcrBC y mrr). Posee alta eficiencia de transformación y no cuenta con resistencia a antibióticos. genotipo: F- mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 ara139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG.

1.1.3 *R. radiobacter* EHA105: Cepa resistente a rifampicina con alta eficiencia de transformación. Cuenta con el plásmido pEHA105, que contiene los genes *vir*. Se eligió esta cepa debido a que no cuenta con resistencia a espectinomicina ni a kanamicina, y ya fue probada y puesta a punto en el laboratorio en transformaciones anteriores. genotipo: C58 (rif R) Ti pEHA105 (pTiBo542DT-DNA) Succinamopine.

1.2 Preparación de *Escherichia coli* quimio-competentes:

Se inocularon 5 mL de medio LB líquido con un cultivo fresco de bacterias *E. coli* y se creció *OverNight* (ON) a 37 °C con agitación. 1 mL de este cultivo fue utilizado como inóculo para 100 mL de LB líquido, que se creció a 37 °C con agitación hasta llegar a una densidad óptica a 600 nm de 0.5. El cultivo se enfrió en hielo por 10 min y luego fue centrifugado a 2.500 g a 4 °C durante 10 min. El pellet bacteriano fue resuspendido en 32 mL de buffer TB frío y se incubó 5 min en hielo. Se repitió el paso de centrifugación, pero ahora el pellet fue resuspendido cuidadosamente en 8 mL de buffer TB frío, se le agregaron 300 μ L de dimetilsulfóxido y se incubó 10 min en hielo. Estas bacterias se alicuotaron en tubos eppendorf de 1.5 mL estériles, en volúmenes de 100 μ L congelándose inmediatamente en N₂ líquido y colocándolas en freezer a -70 °C hasta su uso.

1.3 Transformación de *E. coli* quimio-competentes:

Para cada transformación por shock térmico se utilizó uno de los tubos preparados en el punto 1.2 con 100 μ L de bacterias competentes. Las bacterias se descongelaron en hielo y se les agregó 10-100 ng de vector. Se incubó en hielo por 30 min, se sometió a un shock térmico a 42 °C durante 1 a 2 min y luego se colocó nuevamente en hielo por 10 min. A continuación, se les agregó 1 mL de LB y se incubó a 37 °C durante 1 h. Finalmente, se plaquearon 100 μ L de la reacción de transformación en medio LB-agar con el antibiótico necesario para la selección de las bacterias

transformadas. El resto de la reacción se centrifugó a 1.200 g por 5 min, se descartó la mayor parte del sobrenadante, se resuspendió el pellet en el líquido remanente y se plaqueó también en LB-agar con antibiótico. Las placas se incubaron a 37 °C en estufa durante 18-24 h.

1.4 Preparación de *Rhizobium radiobacter* quimio-competentes:

20 mL de medio LB con 50 µg/µL de rifampicina se inocularon con bacterias *R. radiobacter* EHA105, y se dejaron en oscuridad y agitación durante 24 a 48 h a 28 °C. De este cultivo se tomó 1 mL para inocular 50 mL de LB, y se dejó crecer hasta una densidad óptica de 0.5 a 600 nm. Se centrifugó a 5.000 g por 5 min y se descartó el sobrenadante. El pellet seco fue resuspendido en 1 mL de CaCl₂ 20 mM frío y se dispensó en tubos conteniendo 100 µL cada uno. Estos tubos fueron inmediatamente puestos en N₂ líquido y almacenados a -70 °C hasta su uso.

1.5 Transformación de *Rhizobium radiobacter* quimio-competentes.:

Se descongeló un tubo conteniendo *R. radiobacter* quimio-competentes del punto 1.4 en hielo durante 10 min y se le agregó 1 µg de ADN plasmídico. Se mantuvo durante 30 min en hielo y luego se colocó en N₂ líquido por 2 min. Rápidamente fue transferido a 37 °C durante 5 min a modo de shock térmico y luego se le agregó 1 mL de LB líquido para incubar 2 h a 28 °C en oscuridad. Finalmente, se plaquearon 100 µL de la reacción de transformación en medio LB-agar con el antibiótico necesario para la selección de las bacterias transformadas. El resto de la reacción se centrifugó a 1.200 g por 5 min, se descartó la mayor parte del sobrenadante, se resuspendió el pellet en el líquido remanente y se plaqueó también en LB-agar con antibiótico. Las placas se incubaron a 28 °C en estufa durante 48 h.

1.6 Purificación de ADN plasmídico

Se inocularon 3-5 mL de medio LB con antibiótico, y se creció el cultivo en agitación a 37 °C ON para el caso de *E. coli* o a 28 °C en oscuridad durante 36 h para *R. radiobacter*. Los cultivos fueron precipitados a 2.500 g durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200 µL de solución P1 (en el caso de *R. radiobacter* se le agregaron además 10 µg de lisozima y se incubó durante 10 min). Esta suspensión se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 mL al que se le agregaron 300 µL de solución de lisis alcalina P2, que luego de 5 min fue neutralizada con 300 µL de solución P3. Se centrifugó 10 min a 13.000 g, y el sobrenadante se pasó a un nuevo tubo eppendorf que contenía 20 µg de RNasa A. Se incubó una hora a 37 °C para permitir la degradación del ARN presente, y se extrajo 1 vez con 400 µL de cloroformo. Para esto, una vez agregado el cloroformo se centrifugó a 13.000 g durante 10 min y se pasó la fase superior acuosa a un nuevo tubo eppendorf. Se le agregaron 800 µL de isopropanol 100% y se agitó hasta la completa disolución. Se centrifugó 20 min a 13.000 g a 4 °C y el pellet se lavó con 1 mL de etanol 70% para disolver las sales presentes. El etanol se descartó luego de una nueva centrifugación a 13.000 g durante 10 min y el pellet fue resuspendido en 10-50 µL de H₂O hexadestilada estéril.

1.7 Vectores utilizados

Vector	Selector	Tamaño (pb)	Usos
pZErO-2 (Invitrogen)	-Kanamicina -ccdB (gen suicida)	3.297	Se utiliza para clonado general
pET28a-c (+) (Stratagene)	Kanamicina	5.369	Expresión de proteínas y clonado en general
pPZP-NPT	-Kanamicina en plantas -Espectinomicina en bacterias	8.000	Vector binario para transformación de plantas mediante <i>R. radiobacter</i> . Entre sus bordes izquierdo y derecho posee el promotor y terminador de la nopalina sintasa regulando la expresión de NPTII (R. a Kanamicina). Río abajo de esto y dentro de ambos bordes posee un sitio múltiple de clonado (MCS).
pBIN-B33 (Rocha-Sosa et al.1989)	-Kanamicina	13.400	Vector binario que contiene entre sus bordes derecho e izquierdo una resistencia a kanamicina para la selección de plantas, y el promotor de <i>Patatina</i> B33 río arriba del MCS.
pIINF	-Kanamicina en bacterias -Higromicina en plantas	15.943	Vector binario para expresar los genes <i>AtIRT1</i> , <i>AtNAS1</i> y <i>PvFER</i> .
pPZP-NPT-AtNAS1	-Kanamicina en plantas -Espectinomicina en bacterias	9.424	pPZP-NPT al que se le inserta el <i>cassette</i> de expresión 35S::AtNAS1-tNOS en el MCS.
pPZP-NPT-PvFER	- Kanamicina en plantas -Espectinomicina en bacterias	10.312	pPZP-NPT al que se le inserta el <i>cassette</i> de expresión pPAT::PvFER-tNOS en el MCS.

pPZP-NPT- AtNAS1- PvFER	-Kanamicina en plantas -Espectinomicina en bacterias	12.233	pPZP-NPT al que se le insertan los <i>cassettes</i> de expresión 35S::AtNAS1-tNOS y pPAT::PvFER-tNOS en el MCS.
-------------------------------	---	--------	---

Tabla 1. **Vectores utilizados en el desarrollo de esta tesis.**

1.8 Construcción de vectores:

El primer vector construido en este trabajo fue el pPZP-NPT-AtNAS1, que permite la expresión del gen *AtNAS1* de manera constitutiva bajo la regulación del promotor 35S del Virus del Mosaico del Tabaco (CaMV). Se realizó una PCR que utilizó como molde el vector IINF, y se utilizaron los oligonucleótidos FW-35S-NAS1 y RV-35S-NAS1. El producto de la PCR de 1832 pb se digirió con PstI y se insertó en el vector pZErO2 cortado con la misma enzima. Una vez obtenido el vector pZErO-NAS1 y chequeado por secuenciación, se realizó una digestión con las enzimas BamHI y XbaI y se purificó mediante gel de agarosa el fragmento de 1819 pb. El producto de la digestión purificado se insertó en el vector binario pPZP-NPT en su MCS digerido con las mismas enzimas, para formar el pPZP-NPT-35S::AtNAS1.

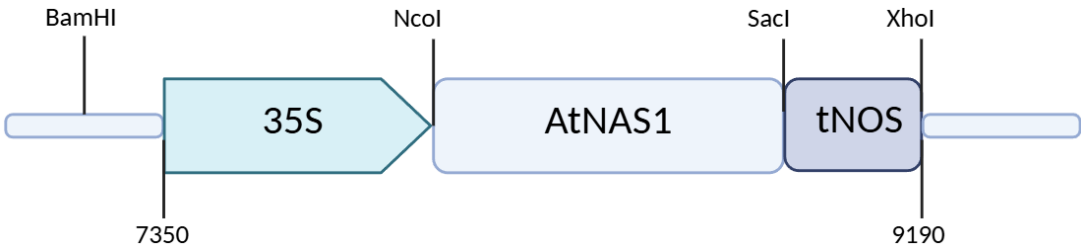


Figura 11. **Cassette de expresión del gen *AtNAS1* bajo la regulación del promotor 35S.**

El siguiente vector construido fue el pPZP-NPT-PvFER, para lo cual primero se cortó el vector pBIN-B33 con las enzimas EcoRI y HindIII, liberando un fragmento de aproximadamente 1700 pb correspondiente al promotor de *Patatina* B33 (pPAT) que se insertó en el vector pET28a-c(+) cortado con las mismas enzimas, para formar el vector pET28a-pPAT. En paralelo, se utilizó el vector IINF como molde para una PCR con los oligonucleótidos FW-KpnI-FER y RV-FER-PstI-XhoI, produciendo un producto de 1269 pb correspondiente al gen *PvFER*. Este amplicón y el vector pET28a- pPAT fueron digeridos con las enzimas de restricción KpnI y XhoI y ligados, generando el vector pET28a-pPAT-PvFER. Este último vector y el pPZP-NPT fueron digeridos con la enzima NheI

y ligados, dando origen al vector pPZP-NPT-PvFER, que permite la expresión en plantas del gen *PvFER* bajo el promotor pPAT.

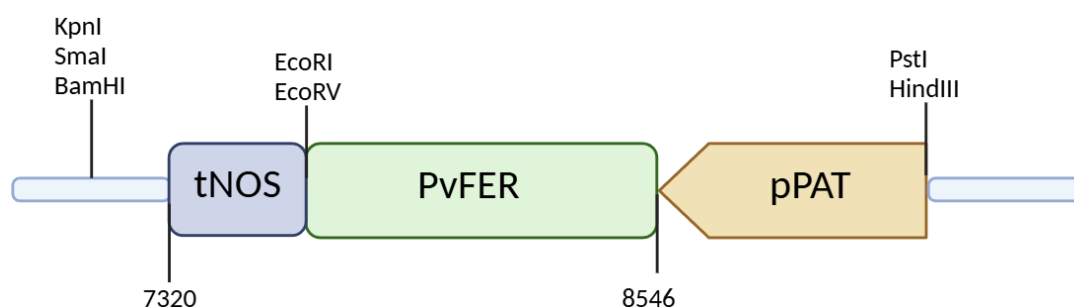


Figura 12. **Cassette de expresión del gen *PvFER* bajo la regulación de pPAT.**

El último vector binario en ser construido fue el pPZP-NPT-AtNAS1-PvFER, que permite combinar la expresión de ambos genes en plantas. Se realizó digestión del vector pET28a-pPAT-PvFER con la enzima NheI, y se purificó el fragmento liberado de 2800 pb mediante gel de agarosa (cassette de expresión pB33::PvFER::tNOS). El mismo se insertó mediante ligación en el vector pPZP-NPT-AtNAS1 digerido con la enzima XbaI y enviado a secuenciar.

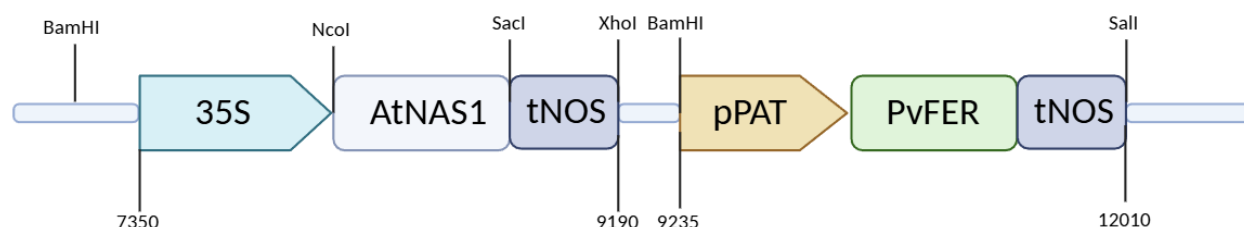


Figura 13. **Cassette de expresión del gen *AtNAS1* bajo la regulación del promotor 35S junto con *PvFER* bajo la regulación del promotor de *Patatina*.**

2. Técnicas de ADN recombinante

2.1 Amplificación por PCR

Se utilizaron distintos tipos de ADN molde para la amplificación de fragmentos por PCR: ADN genómico (100-300 ng), plásmidos (1-10 ng) o ADNc (entre 1 y 5 µL de la reacción de síntesis de ADNc a partir de ARN total). Para las reacciones de PCR se utilizaron 0.5-2 U de Taq polimerasa (Thermo Fisher). Para los clonados o secuenciaciones en los que se necesita una menor tasa de error, se utilizó enzima Phusion de alta fidelidad (New England BioLabs). En ambos casos se utilizó el buffer de reacción correspondiente 1X, adicionando MgCl₂ 2 mM en caso de que fuera necesario, 0.2 mM de cada dNTP (Inbio Higway o Genbiotech), 0.2-1 µM de cada oligonucleótido y H₂O ultrapura hasta llegar a volumen (20 a 50 µL finales).

El ciclado de cada reacción se ajustó en función de la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos utilizados y el número de ciclos varió entre 25-40 ciclos dependiendo de la abundancia del fragmento a amplificar y el objetivo final de la técnica. El ajuste del ciclado final se determinó experimentalmente. En todos los casos se realizaron controles negativos de reacción utilizando H₂O ultrapura en lugar del templado. En los casos en los que fue posible también se realizaron controles positivos de amplificación. Para evaluar el resultado de las reacciones, se sembraron 1-30 µl de la reacción (previo agregado de buffer de siembra con colorante) en geles de agarosa 0.5-2% (p/v). El buffer utilizado para las corridas electroforéticas fue TAE 1x con el agregado de bromuro de etidio a concentración final de 0.8 µg/mL (BioBasic), y se realizó la corrida a voltaje constante. Para determinar el peso de los productos de la PCR en los geles de agarosa, se utilizaron como marcadores de peso molecular los ladders de 100, 400 o 1000 pb (Productos Bio-Lógicos). Los geles fueron visualizados y fotografiados con un equipo transiluminador UV (Syngene).

2.2 Oligonucleótidos utilizados:

A continuación, se presenta una lista de los oligonucleótidos utilizados durante el desarrollo de la tesis. En todos los casos fueron sintetizados por IDT y obtenidos a través de Biodynamics:

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Características
EF1 FW	GTATGGTTGTGACCTTTGG	19	53.6	Amplifican 500 pb del gen <i>Elongation Factor 1</i> , utilizado como control de carga
EF1 RV	CAACATTCTTGACAACAC	18	49.3	

NPTII FW	ATGATTGAACAAGATGGATTG	21	51.6	Amplifican 791 pb del gen de la neomicina fosfotransferasa, basado en Brown et al. 1993. Utilizado para chequear plantas transgénicas.
NPTII RV	GAAGAACTCGTCAAGAAGGCG	21	52.4	
tNOS	CCCATCTCATAAATAACGTCATGC	24	58	Reverse del terminador de la Nopalina sintasa.
FW KpnI-FER	ATCGGTACCTCTCATGGCCCTCG	23	62.4	Amplifican el gen <i>PvFER</i> con el terminador tNOS agregando un sitio KpnI en el 5' y los sitios PstI y XhoI en el extremo 3'
RV FER-PstI-XhoI	CCAGTCTCGAGCTTGCATGCCTGC	24	64.4	
FW 35S-AtNAS1	GGTCTGCAGCTCGAATTCCCATGC	24	62.4	Amplifica el <i>cassette</i> 35S::AtNAS1-tNOS agregando un sitio PstI de ambos lados.
RV 35S-AtNAS1	TAACTGCAGAACTAGTGGATCAATTCCCG	29	59.8	
FW <i>PvFER</i> corto	AGATCGCAACAAAGACCCTC	20	57.9	Amplifican 173 pb de <i>PvFER</i> , para PCR de punto final semicuantitativa.
RV <i>PvFER</i> corto	CATATGATACTCGCTACCAC	20	52.8	
FWAtNAS1 corto	ACTCGTCTGATCTCAAAGGC	20	57.3	Amplifican 221 pb de <i>AtNAS1</i> para PCR de punto final semicuantitativa.
RV AtNAS1 corto	CTCGATGGCACTAAACTCCTCG	22	54.6	

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en el desarrollo de esta tesis.

2.3 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Para la purificación de fragmentos de ADN (productos de PCR o vectores digeridos)

resueltos en geles de agarosa se recortó la porción del gel que contenía el material a purificar y se procesó la muestra utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4 *Cuantificación de ADN.*

La cuantificación de las muestras de ADN se realizó mediante una estimación por comparación con un marcador Ladder de 100 pb (Productos Bio-Lógicos), en el cual las diferentes bandas tienen masas de ADN conocidas. Alternativamente, se utilizó un equipo Nanodrop (Nanodrop 1000, Thermo scientific).

2.5 *Digestión con enzimas de restricción*

En las reacciones de digestión de vectores (1-5 μg) o fragmentos amplificados por PCR (500 ng-1 μg) se utilizaron enzimas de restricción de New England Biolabs (1-5 U/ μg de ADN a digerir). Las reacciones se realizaron en buffer de reacción 1x (el recomendado por el fabricante para cada enzima). Las reacciones se incubaron entre 20 y 120 min, a la temperatura indicada por el fabricante para cada enzima, y el producto de las digestiones se analizó en geles de agarosa 1-2% (p/v).

2.6 *Eliminación de fosfatos en extremos 5'*

En los casos en que los vectores a utilizar durante el clonado hubieran sido digeridos con una sola enzima (clonado no direccionado) o con dos que dejaran extremos compatibles, fueron tratados con fosfatasa alcalina de camarón (SAP, Promega) luego de la digestión para evitar la re-ligación de los mismos. En este caso se utilizó 1 U de SAP por μg de ADN y el buffer provisto con la enzima. La reacción se incubó 15 min a 37 °C y luego se inactivó la enzima por calentamiento a 65 °C durante 15 min.

2.7 *Reacciones de ligación*

Las reacciones de ligación se realizaron utilizando la enzima T4 ADN Ligasa (New England BioLabs). Para esto se colocaron en tubos de 1.5 mL entre 30 y 60 ng de vector digerido, 400 U de enzima T4 ADN Ligasa, buffer de reacción de la enzima T4 ADN Ligasa 1x (provisto con la enzima) y distintas cantidades de inserto según la relación vector:inserto 1:3. La mezcla de reacción fue incubada a temperatura ambiente por 20 min o a 4 °C durante toda la noche (ON). En casos particulares en que las ligaciones no tenían un rendimiento aceptable, se realizaron ambas incubaciones de manera seriada. La mezcla de reacción se inactivó a 65 °C durante 10 min y se utilizó para transformar bacterias competentes como se indica en el punto 1.2. Se incluyó además un control de re-ligación de los vectores reemplazando el inserto por agua en las reacciones, y un control de digestión, que consiste en no agregar ligasa ni inserto.

2.8 *Chequeo de las construcciones recombinantes*

Las construcciones generadas fueron amplificadas por transformación de bacterias *E. coli* (ver punto 1.2). Los plásmidos aislados a partir de las diferentes colonias de bacterias (ver 1.6) fueron chequeados mediante reacciones de PCR y digestiones con enzimas de restricción, con posterior corrida en geles de agarosa para determinar el tamaño de las bandas obtenidas. Por otro lado, las secuencias fueron confirmadas por MacroGen Inc., Seoul, Corea. Las secuencias recibidas fueron analizadas con mediante dos programas informáticos, BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) y Benchling (2024) (<https://benchling.com>).

2.9 *Extracción de ARN total a partir de material vegetal*

El material vegetal cosechado fue congelado inmediatamente en nitrógeno líquido y guardado a -70°C hasta el momento de la extracción. Todo el material plástico y las soluciones empleadas en este procedimiento fueron previamente esterilizados en autoclave (1 atmósfera de presión durante 20 min) para eliminar fuentes de ARNasas. El procedimiento seguido para la extracción fue el siguiente:

- 2.9.1 En un mortero se disgregó el material hasta obtener un polvo fino.
- 2.9.2 Se agregaron 500 μL de TRIzol (Productos BioLógicos) por cada 150 mg de material.
- 2.9.3 La mezcla se centrifugó a 15.000 g durante 10 min a 4°C .
- 2.9.4 El sobrenadante se pasó a otro tubo y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 min para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos.
- 2.9.5 Se agregaron 150 μL de cloroformo por cada 500 μL de TRIzol inicial. A continuación, los tubos se agitaron durante 15 seg y se incubaron a temperatura ambiente 2-3 min.
- 2.9.6 La mezcla se centrifugó a 15.000 g durante 15 min a 4°C y la fase acuosa (superior) se transfirió a un nuevo tubo al que se le agregaron 200 μL de isopropanol y 200 μL de una solución citrato de sodio 0.8 M con NaCl 1.2 M.
- 2.9.7 La mezcla se incubó 1 h a 4°C ; luego se precipitó el ARN centrifugando a 15.000 g durante 30 min a 4°C y se descartó el sobrenadante.
- 2.9.8 Al pellet se le agregaron 250 μL de acetato de sodio 3 M pH 5.2. Se centrifugó a 15.000 g durante 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante.
- 2.9.9 El pellet se lavó con 1 mL de etanol 75% preparado con agua destilada estéril y se centrifugó a 15.000 g durante 10 min a 4°C . Luego de eliminar el sobrenadante, se centrifugó nuevamente a 15.000 g durante 5 min a 4°C para extraer el etanol remanente.
- 2.9.10 El pellet se secó y se resuspendió en 30-60 μL de agua destilada estéril. El ARN se guardó a -70°C hasta el momento de su utilización.

2.10 *Síntesis de ADNc por transcripción reversa*

En primer lugar, se realizó la cuantificación del ARN total extraído utilizando un equipo Nanodrop 1000 (ThermoFisher). A continuación, se sintetizó ADNc utilizando la enzima transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina (M-MLV RT, New England BioLabs). La síntesis se realizó según el siguiente protocolo:

2.10.1 2 µg de ARN, 0.5 µg de un oligonucleótido-(dT) 12-18 junto con 0.5 µg de hexámeros al azar (Productos BioLógicos) y 1 µL de una mezcla de los cuatro dNTPs (stock 10 mM) se llevaron a un volumen de 12 µL con agua destilada estéril.

2.10.2 Se incubó la mezcla de reacción a 65 °C durante 5 min y luego se enfrió en hielo. Este paso permite desnaturalizar la estructura secundaria del ARN.

2.10.3 Se agregaron 4 µL del buffer de reacción 5x provisto con la enzima y 0.5 µL (20 U) del inhibidor de RNasas RNaseOUT (Bioline).

2.10.4 Se incubó a 37 °C durante 2 min y se agregó 1 µL (200 U) de la enzima M-MLV RT (NEB).

2.10.5 Se incubó a 37 °C durante 1 h y se inactivó la enzima a 70 °C por 15 min. El ADNc obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso.

2.11 *Reacción de PCR semi-cuantitativa*

El ADNc generado fue diluido al ½ con agua destilada estéril y se utilizó como molde para una reacción de PCR con cebadores específicos para el gen de interés (ver tabla del punto 2.2). Las reacciones se llevaron a cabo empleando enzima Taq polimerasa con el protocolo descrito en 2.1, utilizando un volumen final de 20-50 µL. Para cada reacción se empleó como molde 1-5 µL del ADNc diluido (dependiendo de la abundancia del gen de interés y el volumen final de la reacción). Para cada conjunto de muestras se analizó también el nivel de expresión del gen *EF1α* como control de carga (Nicot et al. 2005), utilizando los oligonucleótidos EF1fw y EF1rv generándose un fragmento de 501 pb. En cada reacción se agregó un control negativo reemplazando el molde por agua destilada estéril. El número de ciclos utilizados durante la amplificación se eligió de modo que se encuentre en la fase exponencial de amplificación. Luego de la reacción se agregó a cada tubo buffer de siembra para ADN y los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa 1.5% (p/v) en TAE 1x con bromuro de etidio. En todos los casos se sembró la mitad de la reacción en un gel, y luego la mitad restante en otro gel, con el fin de obtener las cuantificaciones por duplicado.

2.12 *Densitometría de bandas*

La intensidad relativa de las bandas correspondientes a los ensayos de RT-PCR fue analizada con el programa ImageJ FIJI. Las bandas detectadas en los ensayos de RT-PCR fueron cuantificadas y normalizadas con respecto al control del EF1α.

3. Obtención de plantas transgénicas de *S. tuberosum* cv Spunta mediante transformación por *R. radiobacter*.

3.1 Reactivos utilizados para la transformación

Se preparan stocks 1000x de las soluciones y se esterilizan mediante filtrado por columnas Minisart (Sartorius):

Compuesto	Concentración final	Detalles
Acetosiringona (AS, PhytoTechnology Laboratories)	10 mg/L	Inductor de la virulencia de <i>R. radiobacter</i> para incrementar el rendimiento de la transformación
Ácido 3-Indol-Acético (IAA, PhytoTechnology Laboratories)	5 µM	Hormona tipo auxina
trans-Zeatin Ribósido (ZR, PhytoTechnology Laboratories)	5 µM	Hormona tipo citoquinina
Cefotaxima (Richet)	200 o 400 mg/L	Antibiótico que se utiliza para limitar el crecimiento de <i>R. radiobacter</i> luego de los cocultivos 1 y 2
Higromicina (Sigma)	5 mg/L	Agente selector para células vegetales
Kanamicina (Sigma)	50 mg/L	Agente selector para células vegetales
Rifampicina (Sigma)	50 mg/L	Agente selector para <i>R. radiobacter</i>

Tabla 3. Reactivos utilizados en la transformación de discos de tubérculo de *Solanum tuberosum* var Spunta.

3.2 Plantas utilizadas

Se utilizaron plantas de papa *S. tuberosum* ssp *tuberosum* var Spunta certificadas libres de virus (Diagnósticos Vegetales, Mar del Plata).

3.3 Preparación de inóculos de *R. radiobacter*

5-10 ml de LB líquido (con el agregado de los correspondientes selectores) fueron inoculados con *R. radiobacter* transformadas con el vector de interés. El cultivo se creció a 28 °C

en oscuridad por 16-24 h con agitación. Se prepararon diluciones de este cultivo de entre 1/1000 a 1/100 y se incubó a 28 °C en oscuridad con agitación hasta que su densidad óptica a 600 nm fuera de entre 0.6-0.8. Este cultivo en fase exponencial de crecimiento fue usado como inóculo para la transformación.

3.4 Preparación de los explantos:

Se utilizaron como explanto discos de tubérculos de *S. tuberosum* cv Spunta que no estuvieran brotados. Estos tubérculos a su vez fueron certificados como libres de virus, y fueron comprados a la empresa Diagnósticos Vegetales. Los tubérculos fueron lavados con agua y detergente, luego se les extrajo la peridermis y fueron nuevamente lavados de la misma manera. A continuación, fueron sumergidos en etanol 70% (v/v) por 3 min y pasados a una solución de hipoclorito de sodio 20% (v/v) en agua estéril, en la que se incubaron por 20 min. Luego, fueron lavados con agua estéril bajo un flujo laminar (3 x 5 min, 1 x 45 min, 2 x 15 min, en al menos 1 L de agua estéril) para remover toda la lavandina. Por último, se cortaron discos de 1mm de grosor con bisturí, que fueron colocados en una caja de Petri con medio MS líquido 2% sacarosa.

3.5 Transformación:

La transformación de estos discos se realizó en dos etapas consecutivas:

3.5.1 Co-cultivo I: Se colocaron 200 µL del inóculo del punto 3.2 en una placa de Petri que contenía 20 mL de MS líquido con AS 10 mg/L. En esta misma placa se colocaron los discos de tubérculo y se incubó a temperatura ambiente por 5 min con agitación manual. Los discos fueron secados a continuación sobre papel de filtro esterilizado por autoclave.

Para los controles de regeneración, se realizaron los mismos pasos sin el agregado de *R. radiobacter*.

3.5.2 Co-cultivo II: Todos los explantos fueron colocados en placas de Petri con medio MS-agar 0.7% (p/v) con AS 10 mg/L e incubados 30 h a 28 °C en oscuridad. A continuación, fueron lavados con una solución de cefotaxima 200 mg/L en agua estéril y secados sobre papel de filtro estéril.

Al finalizar ambos co-cultivos, los discos fueron mantenidos en frascos que contenían medio MS con la siguiente composición:

3.5.3 Control de regeneración: cefotaxima 400 mg/L + IAA 5 µM + ZR 5 µM

3.5.4 Control de selección y transformantes: cefotaxima 400 mg/L + IAA 5 µM + ZR 5 µM + Kanamicina 50 mg/L o Higromicina 5mg/L (agente selector).

3.6 Repique de explantos:

Los explantos fueron repicados a un medio fresco cada 14 días. Al cabo de varias semanas los primeros nódulos meristemáticos verdes aparecieron, y en algunos casos exitosos estos

nódulos diferenciaron a brotes (Figura 14). Una vez estos brotes crecieron 2-3 cm fueron separados del explanto y sus ápices fueron pasados a tubos con 10 mL de medio MS-agar 0.7% (p/v) con 20 g/L de sacarosa y 200 mg/mL de cefotaxima. Las plantas se mantuvieron en este medio durante 2 repiques a tubos frescos (8 semanas) y luego se les sacó la cefotaxima.



Figura 14. **Regeneración de una planta transgénica a partir de un disco de papa.**

3.7 *Enraizamiento en Kanamicina:*

Los ápices de plantas transformadas y controles de regeneración fueron repicados a tubos conteniendo MS-agar 0.7% (p/v) sacarosa 2% (p/v) y kanamicina 50 mg/L, y se evaluó su capacidad de enraizar luego de 2 semanas.

3.8 *Extracción de ADN a partir de material vegetal*

Este protocolo permite extraer ADN genómico a partir de muestras de hojas:

3.8.1 100 mg de hojas frescas de plantas de papa fueron molidos en mortero con N₂ líquido.

3.8.2 Se añaden 500 µL de buffer CTAB precalentado a 65 °C y se transfirió a un tubo de polipropileno.

3.8.3 Se incubó a 65 °C durante 60 min, agitando cada 10 min.

3.8.4 Se le agregaron 500 µL de cloroformo y se agitó durante 5 min. A continuación, se centrifugó durante 10 min a 5.000 g (a 4 °C).

3.8.5 Se transfirió la fase superior (acuosa) a un nuevo tubo y se repitió la extracción con cloroformo como en 3.8.4

3.8.6 Se agregaron 5 μL del stock de RNAsa A 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se incubó 30 min a 37 °C para degradar el ARN presente.

3.8.7 Se agregaron 300 μL de isopropanol frío y se mezcló por inversión.

3.8.8 Se centrifugó 20 min a 10.000 g (a 4 °C). El sobrenadante fue descartado y el pellet lavado con 1 mL de etanol 70%.

4. Manejo del material vegetal

4.1 Micropropagación de plantas *in-vitro*

Las plantas fueron micropropagadas *in-vitro* en medio Murashige-Skoog (MS, Murashige y Skoog, 1962) 1X con agar 0.7% (p/v) y sacarosa 2% (p/v), en tubos de vidrio cilíndricos autoclavados de 15x3 cm (alto x diámetro) tapados con una torunda de algodón. Para amplificar la cantidad de plantas se utilizaron porciones de tallo de 1 cm que contuviesen una yema meristemática, realizando cortes con bisturí en los entrenudos. Una vez se obtiene la cantidad deseada de plantas, las mismas se repican cada 21 días a medio fresco, cortando 15 mm desde el ápice. Se mantuvieron en cuartos de cultivo a 25 °C con un fotoperiodo de 16 h luz - 8 h oscuridad.

4.2 Tuberización *in-vitro*

Segmentos nodales de 1 cm provenientes de plantas crecidas *in-vitro* son colocados en frascos estériles conteniendo medio MS 1X con agar 0.7% (p/v) y sacarosa 8% (p/v), sellados con papel film, y se colocan en oscuridad. Cada 3 semanas, se calcula el porcentaje de estolones que tuberizaron para cada línea transgénica.

4.3 Rusticado

Plantas provenientes de ápices *in-vitro* de 7 días fueron pasadas a medio MS sacarosa 2% (p/v) líquido durante otra semana. Una vez que las plantas ya tenían 2 semanas creciendo *in-vitro*, fueron colocadas de a tres en macetas de 1 litro conteniendo 200 g de sustrato Klamann TS-1 y crecidas en invernadero hasta su cosecha.

4.4 Condiciones del invernadero

El invernadero se mantiene con temperatura entre 20-25 °C y un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Las plantas crecidas en invernadero en todos los casos fueron medidas a los 28 días desde su siembra o rusticado, y cosechadas a los 2-3 meses de edad (senescencia). El riego se realizó con agua corriente.

4.5 Plantas de tubérculo

Tubérculos provenientes de plantas rusticadas fueron almacenados a 18 °C hasta su brotación, y fueron colocados de a tres en macetas de 1 L conteniendo 200 g de sustrato Klasman TS1, seleccionando tubérculos de entre 1.5-4 g para su siembra.

Una vez que se seleccionó la línea transgénica FN4 como la mejor candidata, se realizaron dos experimentos en macetas de 3 L, utilizando como sustrato tierra común (HI-SOIL, mezcla de tierra y compost orgánico). Se sembraron tubérculos wt y de la línea FN4 de tamaños similares de a dos por maceta (figura 15).



Figura 15. Tubérculos utilizados en la siembra del primer experimento en tierra común.

4.6 Crecimiento en diferentes tratamientos de Fe.

Se prepararon macetas de 1 L con 200 g sustrato Klasman TS-1 y agregando 0, 1, 5 o 10 g de Fe-EDDHA (Basafer Plus, Alemania). 3 plantas fueron rusticadas en cada maceta como se detalla en 4.4, y se realizó la medición de altura, número de hojas y contenido de clorofila a los 28 días. Los tubérculos fueron cosechados luego de la senescencia y se analizó la productividad de las plantas, junto con el contenido de Fe como se explica en 6.2.

5. Mediciones de parámetros morfológicos y fisiológicos

5.1 *Mediciones en invernadero*

A las plantas crecidas en invernadero, se les midió la altura y el número de hojas a los 28 días de rusticado. Además, se midieron las unidades SPAD de la 3er hoja desplegada, utilizando un equipo Clorofilio (CavaDevices) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Al momento de la cosecha se determinó el número de tubérculos por maceta, y se midió su largo, ancho y peso, con el objetivo de determinar variaciones en su forma o en su tamaño.

5.2 *Deshidratación de hojas*

Se cortó la segunda hoja desplegada de plantas de 28 días en invernadero, y se colocaron en recipientes rotulados. Las hojas fueron fotografiadas para determinar su área en cm² y su forma con el uso del software ImageJ Fiji (Schindelin et al. 2012), y se dejaron sobre mesada a Temperatura ambiente. Se midió su peso cada 60 minutos hasta las 8 h, y nuevamente a las 24 h. A continuación, las hojas fueron rehidratadas hasta peso constante, y puestas en estufas a 60 °C durante 48 h para determinar su peso seco.

5.3 *Contenido relativo de agua (CRA)*

La segunda hoja desplegada de plantas de 28 días en invernadero fue fotografiada y colocada en un recipiente con agua corriente. Luego de 12 h se determinó su peso (Peso de turgencia), y se dejó a temperatura ambiente en la mesada, determinando el peso a las 2, 4, 8 y 24 h. Las hojas fueron rehidratadas para determinar el porcentaje de supervivencia de las mismas a la deshidratación, y luego se secaron durante 48 h en estufa a 60 °C para determinar su peso seco.

$$\text{CRA (\%)} = 100 * ((\text{Peso tiempo X} - \text{Peso seco}) / (\text{Peso turgencia} - \text{Peso seco}))$$

5.4 *Tamaño de las hojas*

La segunda o tercera hoja desplegada de plantas de papa crecidas durante 28 días en invernadero fueron cortadas y fotografiadas junto a una regla. Utilizando el software ImageJ FIJI se determinó el área de las mismas. Para esto en las fotografías se calibró a cuantos píxeles equivalían 5 cm de la regla y luego se utilizó la herramienta de dibujo libre para delimitar el perímetro de las hojas. A continuación, se utilizó la herramienta medir y se anotaron los valores obtenidos para las hojas de cada línea.

Para determinar el peso seco (biomasa) de las hojas, las mismas fueron colocadas en recipientes en estufa a 60 °C durante 48 h y pesadas en balanza analítica.

5.5 *Preparación de impresiones de hoja para microscopia*

Se realizó una impresión de la cara abaxial de hojas de plantas de papa crecidas en invernadero durante 28 días mediante el uso de silicona por adición (Densell A+). Se mezclaron partes iguales de base y catalizador sobre un portaobjetos, y cuidadosamente se aplicó la mezcla con espátula sobre la zona central de la cara abaxial de las hojas. Se dejó secar durante 5 min y se separó la impresión de la hoja, que fue cortada y utilizada para determinar su tamaño como se detalla en 5.3. Sobre estas impresiones se aplicó una capa de esmalte de uñas transparente de secado rápido, que fue colocada sobre un portaobjetos junto con una fina capa de agua. Se selló la muestra con un cubreobjetos y esmalte, y se tomaron capturas utilizando un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-E. Por cada muestra (representando la zona central de una hoja) se tomaron capturas de 2 campos que fueron posteriormente promediados.

5.6 *Determinación de la densidad estomática, tamaño de los estomas e índice estomático*

Las imágenes obtenidas en 5.4 fueron analizadas mediante el software ImageJ FIJI. Se calibró la relación píxel-micrómetro, y se recortó la imagen a un área de 200x200 μm^2 . Sobre esta nueva imagen, se determinó en primer lugar el número de estomas presentes en esta superficie (densidad estomática) y, utilizando la herramienta de dibujo libre, se determinó su tamaño. Finalmente, se contabilizó el número de células no estomáticas, con el fin de calcular el Índice estomático.

Índice estomático = número de estomas / (número de estomas + número de células no estomáticas)

5.7 *Determinación del contenido de pigmentos en hojas*

La segunda hoja desplegada de plantas crecidas en invernadero fue cortada, molida en N_2 líquido en un mortero y resuspendida en 1 mL de acetona 80% por cada 10 mg de muestra. Se pasó todo el volumen a un tubo de 15 mL que fue centrifugado a 2.000 g durante 10 min a 4 °C. Se midió la absorbancia a 663, 645 y 480 nm. El contenido de clorofila a, b y total fue calculado de acuerdo a Arnon (1949). El contenido de carotenoides se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{A}480 + (0.114 \text{ A}663) - (0.638 \text{ A}645)] \text{ V}/1000 \text{ PF}$$

Donde V es el volumen total de extracción y PF es el peso fresco de la muestra en mg.

5.8 *Actividad catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX) en hojas*

200 mg de hoja fueron molidos en un mortero con N_2 líquido, y se agregaron 2 mL de buffer acetato de potasio 0.2 M pH = 7. Se centrifugó a 15.000 g durante 20 min a 4 °C, y el sobrenadante fue utilizado para medir actividad CAT y APX. Se determinó la concentración de proteínas mediante el ensayo de Bradford (Bradford 1976). La actividad CAT fue determinada midiendo el descenso en la absorbancia del H_2O_2 a 240 nm, por unidad de tiempo (Aebi 1984). La actividad de APX fue medida mediante el monitoreo del descenso en la absorbancia del ascorbato a 290 nm por unidad de tiempo (Kwon et al. 2002).

6. Determinación del contenido de Fe y Zn

6.1 *Contenido de Fe y Zn en tubérculos mediante absorción atómica*

Tubérculos recién cosechados de entre 2.5 y 8 g obtenidos de plantas crecidas en invernadero fueron almacenados individualmente en bolsas de papel y debidamente rotulados. A continuación, fueron enviados al Laboratorio de Servicios Analíticos Especiales (LabFAUBA) para su análisis. El protocolo utilizado consistió en calcinar en mufla a 500 °C por 5 h aproximadamente 2 g de muestra. La ceniza fue levantada con 5 mL de HCl 20% y completado a volumen (50 mL) con agua destilada. Luego, las muestras fueron filtradas y cuantificadas por espectrometría de Absorción Atómica en un equipo Perkin Elmer AAnalyst 200.

6.2 *Contenido de Fe en tubérculos mediante el método de o-fenantrolina*

Se tomaron tubérculos de entre 1 y 10 g con menos de 2 semanas de cosechados, y se extrajeron muestras de menos de 500 mg que fueron molidas en mortero. Esto se debe a que limitando el tamaño de la muestra a 500 mg, se puede trabajar con tubos tipo Eppendorf de 1.5 mL, lo cual facilita y acelera la manipulación de los mismos. El protocolo fue adaptado de Manzanares et al. 1990 y de Köseoğlu y Açıkgöz 1995. Luego del agregado de 3 mL de HCl 1 M por cada gramo de muestra, se traspasó el volumen de los morteros a tubos de 1.5 mL que fueron incubados 16 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 5000 g durante 10 min, y 85.7 µL de muestra fueron colocados por triplicado en una placa de 96 pocillos. Se agregan 114.3 µL de hidroxilamina 10% p/v en buffer acetato:acético pH = 4 en cada pocillo y se incuba 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 100 µL de solución de o-fenantrolina 1.5% (p/v) pH = 3. Luego de una incubación de 5 min, la placa fue revelada en un lector de Elisa Synergy HTX (BioTek) configurando la absorbancia a 510 nm. Se realizó además una curva de calibración utilizando nitrato de Fe (III) para poder realizar la cuantificación (Figura 16).

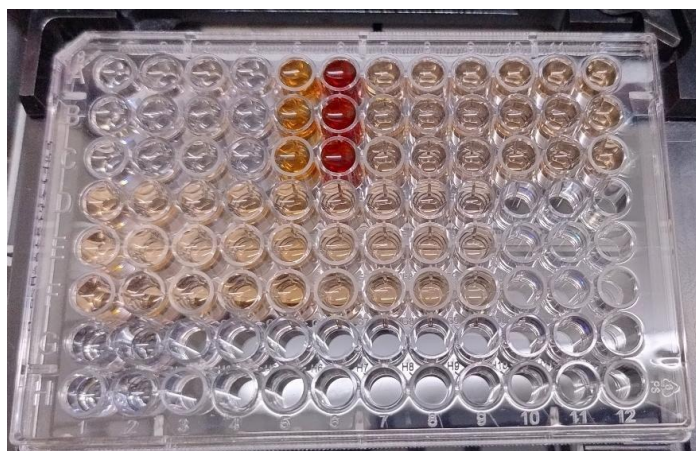


Figura 16. **Cuantificación del Fe en muestras de tubérculo.** Los primeros 6 pocillos corresponden a la curva de calibración con nitrato de Fe, mientras que el resto corresponden a muestras de tubérculo.

7. Caracterización de los tubérculos

7.1 *Preparación de los tubérculos*

Tubérculos con una semana de cosechados fueron cortados en cuatro partes iguales de manera longitudinal y pesados en balanza analítica. Uno de los cuartos se almacenó a -70 °C como backup. El segundo cuarto se utilizó para la determinación de contenido de agua (7.2), el tercero para el contenido de hidratos de carbono (7.3) y el último cuarto se utilizó para la determinación del contenido de proteínas (7.4).

7.2 *Determinación del contenido de agua*

La muestra preparada como se detalla en el punto anterior y pesada fue cortada en pequeños trozos y colocada en un recipiente plástico de un volumen de 6 mL (realizado mediante impresión 3D). Se mantuvo a 60 °C en horno hasta que se logró peso constante (peso seco). El contenido de materia seca (%) se determina como la relación entre peso seco (PS) / peso fresco (PF) x 100.

7.3 *Contenido de hidratos de carbono*

Se utilizó una muestra preparada como en 7.1, que fue molida en mortero y resuspendida en 10 mL de etanol 80% por cada gramo de tubérculo.

7.3.1 Se calentó a 70 °C durante 90 min, invirtiendo cada 15 min para asegurar homogeneidad.

7.3.2 Se centrifugó a 2500 g por 15 min, y se guardó el sobrenadante (esta fracción corresponde a los azúcares solubles). Se continuó con los lavados sobre el pellet.

7.3.3 Se repitió el procedimiento de extracción utilizando el pellet, de manera de realizar dos lavados con 1 mL de etanol 80%, calentando a 70 °C durante 30 min y centrifugando otros 15 min a 2500 g.

7.3.4 El pellet (que contiene el almidón de la muestra) fue secado durante 36 h a temperatura ambiente y resuspendido en 500 µL de HCl 1M.

7.3.5 Para realizar la hidrólisis del almidón, se colocó en agua hirviendo durante 60 min. Se neutralizó el sobrenadante con igual volumen de NaOH.

7.3.6 Se realizó la medición de glucosa mediante el kit de glicemia enzimática (Wiener Lab, Argentina), realizando una curva de calibración. El contenido de almidón se estimó multiplicando el contenido de glucosa por el equivalente de 0.9. Los resultados se expresan como gramos de almidón cada 100 g de peso fresco.

7.3.7 El sobrenadante obtenido en 7.3.2 fue utilizado para medir directamente el contenido de glucosa, mediante el kit mencionado en 7.3.6. Además, se analizó el contenido de sacarosa mediante el método de la glucosa oxidasa/invertasa descrito en

Teixeira et al. (2012), con la diferencia de que la glucosa se estimó utilizando el kit de glicemia enzimática y la sacarosa se calculó como la diferencia en el contenido de glucosa antes y después del tratamiento con invertasa.

7.4 *Contenido de proteínas*

Para analizar el contenido de proteínas totales en tubérculos, se utilizaron las muestras preparadas en 7.1, las cuales fueron pesadas y molidas en mortero. A continuación, se agregó 1 mL de buffer de proteínas por cada gramo de muestra, y se centrifugó a 10.000 g durante 10 min. Se determinó el contenido de proteínas del sobrenadante mediante el método de Bradford (1976). Para esto se utilizó una microplaca de 96 pocillos y se realizaron las siguientes mezclas por triplicado:

- Muestras: 200 μ L de reactivo de Bradford + 10 μ L de la dilución de la muestra.
- Curva Patrón: 200 μ L de reactivo de Bradford + 10 μ L de soluciones de BSA de concentración conocida (0.05 – 0.1 – 0.2 – 0.3 – 0.4 – 0.5 μ g/ μ L).
- Blanco de Lectura: 200 μ L de reactivo de Bradford + 10 μ L de agua o buffer de extracción.

Las lecturas de absorbancia se hicieron a 580 nm en un equipo lector de ELISA. A continuación, se construyó una curva de Absorbancia a 580 nm versus masa (μ g) de BSA, y a partir de ella se obtuvo el valor de μ g de proteínas presentes en los 10 μ L de la dilución de la muestra.

8. Soluciones empleadas

8.1 *Soluciones empleadas en técnicas relacionadas con bacterias*

- 8.1.1 Buffer TB (Inoue et al. 1990): MOPS 10 mM, CaCl_2 15mM, MnCl_2 55mM. KCl 250 mM. Se ajustó a pH 6.7 con KOH y se esterilizó por filtración.
- 8.1.2 Solución P1 (Buffer TGE): Tris-HCl 25 mM pH 8.0, glucosa 50 mM y EDTA 10 mM en agua. Se prepara 1 L de solución y se autoclava.
- 8.1.3 Solución P2: NaOH 0.2 M y SDS 1% (p/v) en agua. Se preparó al momento del uso a partir de una solución NaOH 1 M y una de SDS 10%.
- 8.1.4 Solución P3: Acetato de sodio 3 M pH 4.8 en agua.
- 8.1.5 Medio de cultivo LB líquido: Peptona de carne 1% (p/v), NaCl 1% (p/v) y extracto de levadura 0.5% (p/v), se prepara 1 L de solución y se autoclava.

8.1.6 Medio de cultivo LB sólido: Se prepara igual que el LB líquido, con el agregado de 15 g de agar por cada litro de medio.

8.2 Soluciones empleadas en técnicas relacionadas con ADN, ARN y proteínas.

8.2.1 TAE 50x: Disolver 242 g de Tris Base, 57.1 mL de ácido acético glacial y 100 mL de EDTA 0.5 M pH 8 en 1 L de agua destilada.

8.2.2 Buffer de siembra para ADN 6x: Azul de bromofenol 0.25% (p/v) o xilencianol 0.25% (p/v) y glicerol 30% (v/v) en agua. En un gel de agarosa 1% (p/v) en TAE 1x, el azul de bromofenol migra como un fragmento de ADN de aproximadamente 300 pb y el xilencianol lo hace como un fragmento de 4000 pb.

8.2.3 Buffer de Edwards: Mezclar 10 mL de Tris-HCl 1 M pH 8, 2.5 mL de NaCl 5M, 2.5 mL de EDTA 5 M y 1.25 mL de SDS 20% (p/v). Llevar a un volumen final de 50 mL con agua destilada.

8.2.4 Buffer CTAB: Tris-HCl 100 mM pH 8.0, CTAB 2% (p/v), NaCl 1.4 M y EDTA 20 mM. Al momento de usar, se agregó beta-mercaptoetanol 0.2% (v/v).

8.2.5 Buffer de extracción de proteínas: Tris HCl 50 Mm pH = 7.5, β -mercaptoetanol 2 mM, EDTA 1mM y glicerol 20%.

9. Análisis estadístico

Para todos los experimentos aquí realizados se utilizó el software Prism Graphpad en su versión 10.4. Las pruebas estadísticas utilizadas dependen del diseño experimental y se indica en cada experimento particular.

9.1 Prueba *t* de Student

En los análisis de la línea FN4 contra la wt, se utiliza prueba *t* de Student (Figuras 54, 55 y 56)

9.2 ANOVA de 2 vías

Se utilizó este análisis estadístico con Tukey post hoc para los análisis de las Figuras 57 y 58.

9.3 ANOVA de 1 vía

Todos los análisis fueron realizados por este método, incluyendo un análisis post hoc Bonferroni, excepto aquellos enumerados en los puntos 9.1 y 9.2.

9.4 Consideraciones

Se consideró significativo siempre que $p < 0.05$, aplicando una cantidad de asteriscos diferentes dependiendo del p valor. En los casos en que $p < 0.05$ se muestra como “*”. Si $p < 0.01$ se muestra “**”, si $p < 0.005$ se muestra “***” y si $p < 0.001$ se muestra “****”.

Resultados y discusión

*“En el conuco creciste bajo el sol del mediodía,
con lluvia te nutriste y tierra que te cubría.
Alimento de mi tierra, tesoro del campesino,
en la mesa o en la guerra, marcaste nuestro destino.
Del suelo fértil surgiste, raíz de pueblo y nación,
en cada mesa existe tu humilde bendición.
En el caldero hirviendo o frita en la sartén,
eres el alimento que nos hace bien...”*

Canción de la malanga, José Tallet

Capítulo I: Diseño y construcción de los vectores pPZP-NPT-35S::AtNAS1, pPZP-NPT-pPAT::PvFER Y pPZP-NPT-AtNAS1-PvFER

Ferritina y NAS en la planta de papa

Como fuera mencionado con anterioridad, en los últimos años diversas estrategias fueron utilizadas en la biofortificación de cultivos. Algunas de las más exitosas involucran la utilización de los genes *Ferritina* y *NAS*. El principal objetivo de la tesis fue generar plantas de papa transgénicas que sobreexpresan de manera heteróloga el gen *NAS1* de *A. thaliana* (*AtNAS1*) constitutivamente, y el gen *Ferritina* de *Phaseolus vulgaris* (*PvFER*) de manera específica en tubérculos. A la hora de elegir una estrategia que involucre una mejora en la captación, transporte y acumulación de Fe y Zn, es importante considerar el metabolismo endógeno de la planta de papa. Por este motivo se decidió hacer un análisis preliminar de los homólogos en papa de los genes a utilizar como herramienta biotecnológica. Se realizó un análisis filogenético de *StFER1-3* y *StNAS* en papa (Legay et al. 2012) incluyendo otras plantas modelo como arroz (*O. sativa*) y Arabidopsis. De este análisis surge que *PvFER* se encuentra más emparentada con las proteínas *OsFER1*, *OsFER2*, *AtFER1* y *StFER1*, mientras que las ferritinas endógenas de papa *StFER2* y *StFER3* se encuentran más cercanamente emparentadas a *AtFER2-4* que a *PvFER* (Figura 17 a). En el caso de *S. tuberosum*, solo hay una proteína *NAS* (Figura 17 b) que presenta mayor similitud en su secuencia a las 3 variantes presentes en *O. sativa* (*OsNAS1-3*), que con *AtNAS1*.

Los niveles de expresión de los genes *StFER1-3* y *StNAS* fueron analizados en los distintos tejidos y bajo diferentes tratamientos. El análisis se realizó utilizando bases de datos públicas (<https://spudb.uga.edu/>). Se observa que *StFER1* presenta sus niveles máximos de expresión en tubérculos, donde también se expresa altamente *StFER3* y en menor medida *StFER2*, mientras que *StNAS* presenta niveles mínimos de expresión, indicando baja presencia del transportador dentro del tubérculo (Figura 18). En el resto de la planta, la variante de mayor expresión es *StFER3*, mientras que *StFER1* muestra sus mayores niveles de expresión (fuera del tubérculo) en tallo y ápice. El gen *StFER2* presenta sus mayores niveles de expresión en raíces, y *StNAS* en plantas enteras *in-vitro*. Estos perfiles de expresión, confirmarían que en plantas de papa *StNAS* estaría asociado al transporte y distribución de metales, mientras que las Ferritinas ejercerían su función durante el almacenamiento. La expresión heteróloga de *PvFER* y *AtNAS1*, es una interesante estrategia a desarrollar en plantas de papas ya que podría incrementar la eficiencia del mecanismo basal endógeno de acumulación de Fe de la planta.

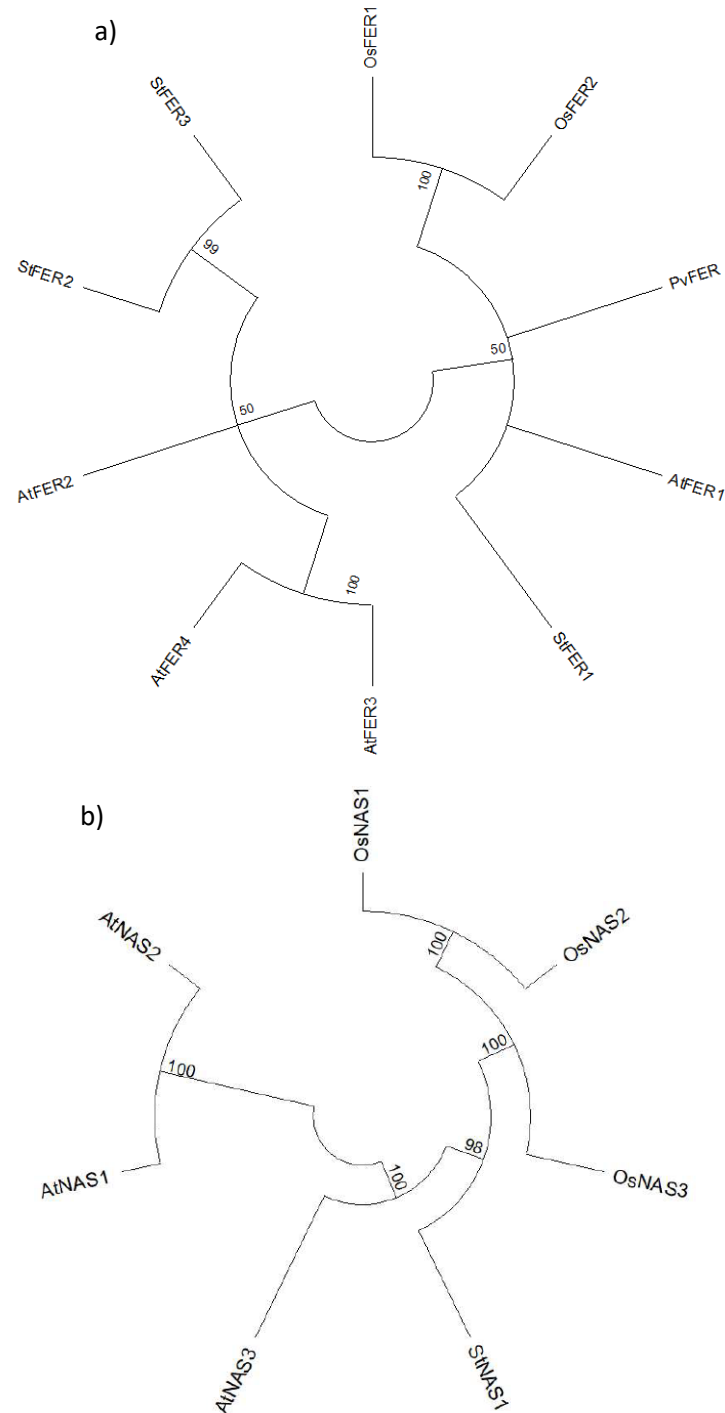


Figura 17. **Árbol filogenético de proteínas NAS y FERRITINA de diversas especies.** a) Ferritinas de *S. tuberosum* StFER1 (CV472653), StFER2 (BG889577), StFER3 (BQ112376), *A. thaliana* AtFER1 (AT5G01600), AtFER2 (AT3G11050), AtFER3 (AT3G56090) y AtFER4 (AT2G40300), *O. sativa* OsFER1 (AF519570) y OsFER2 (AF519571), y *P. vulgaris* PvFER (P25699). b) NAS de *S. tuberosum* StNAS1 (KAH0766745), *A. thaliana* AtNAS1 (AB021934), AtNAS2 (AB021935) y AtNAS3 (AB021936), y *O. sativa* OsNAS1 (AB021746), OsNAS2 (AB023818), OsNAS3 (AB023819). Estas secuencias fueron obtenidas de

Gross et al. 2003, Higuchi et al. 2008, Legay et al. 2012. Construido utilizando el programa MEGA 12, mediante el método *Neighbor-Joining*. Los números corresponden a los valores *bootstrap*.

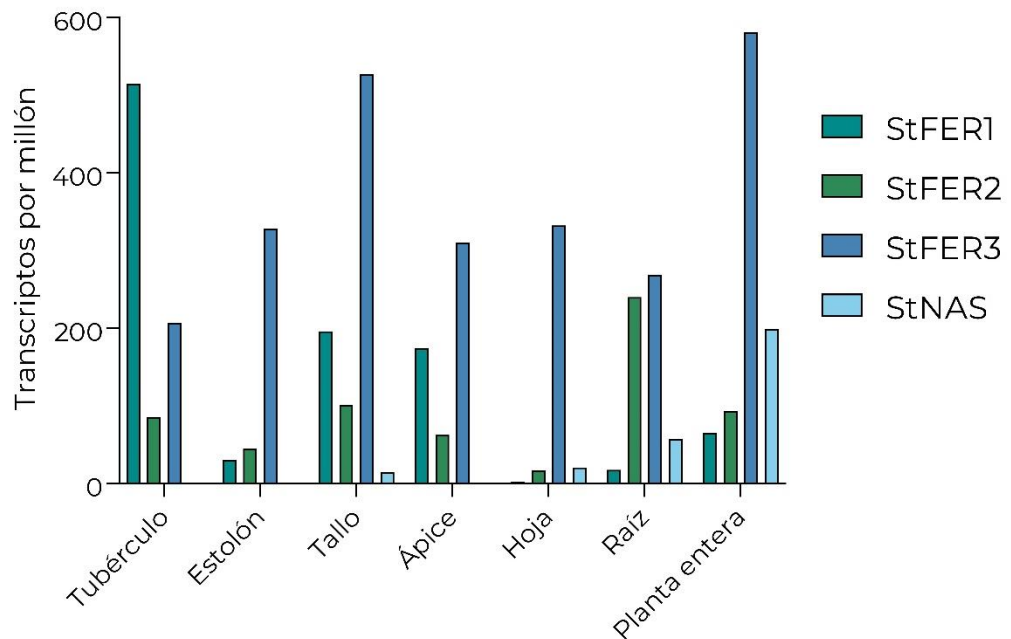


Figura 18. **Expresión de los genes endógenos de Ferritina y Nicotianamina Sintasa.** Expresión en diversos tejidos en valores absolutos.

Es interesante notar en este punto, que la sobreexpresión heteróloga de *PvFER* y *AtNAS1* en papa podría implicar el reacomodamiento de la expresión de los genes endógenos *StFER1*, *StFER2*, *StFER3* y *StNAS*. Sería interesante analizar los niveles de expresión de estos genes para estimar posibles efectos en la modulación de la homeostasis del metabolismo endógeno de la planta que podrían ejercer un efecto en el resultado final de la estrategia.

Diseño y construcción de los vectores binarios

Con el fin de optimizar tiempo y reactivos en la construcción de los vectores, se solicitó una copia del plásmido IINF (Boonyaves et al. 2017) que fue amablemente donado por la Dra. Navreet Bhullar del *Swiss Federal Institute of Technology*. El vector IINF (Figura 19 a) es un vector binario que permite la expresión de tres genes asociados al metabolismo del Fe: el transportador *AtIRT* (bajo la regulación de su propio promotor), *AtNAS1* (bajo la regulación del promotor CaMV 35S) y *PvFER* (bajo la regulación del

Construcción del vector pPZP-NPT-35S::AtNAS1

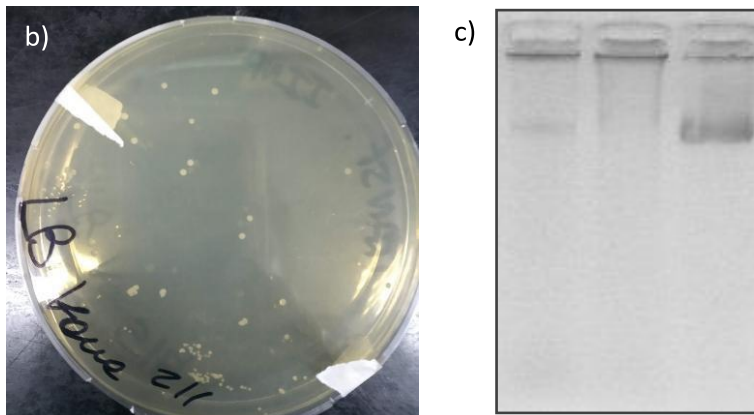
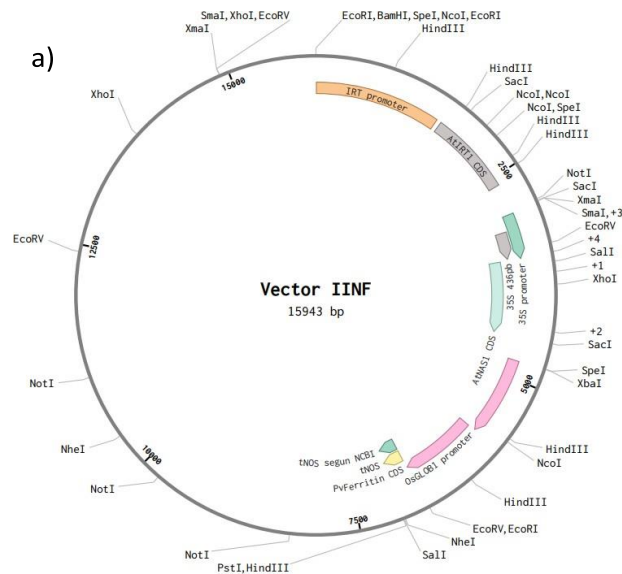


Figura 19. **Esquema y preparación del vector IINF.** a) Esquema del plásmido IINF según sus autores. b) Colonias obtenidas de la transformación con IINF en *E. coli*. c) Plásmido IINF purificado a partir de *R. radiobacter* (calles 1 y 2) y de *E. coli* (calle 3).

Se diseñaron y sintetizaron los oligonucleótidos FW 35S::AtNAS1 y RV 35S::AtNAS1, que permiten amplificar el *cassette* 35S::AtNAS1-tNOS del IINF agregando el sitio PstI al inicio y al final del amplicón. Si

bien la estrategia original consistía en el clonado no direccionado de este *cassette* de expresión en el sitio PstI del pPZP-NPT, debimos modificarla debido a la aparición de un sitio de corte alternativo (ver los detalles al final del capítulo). Al *cassette* 35S::AtNAS1-tNOS amplificado (Figura 20 b), digerido con PstI y purificado, se lo insertó en el sitio homónimo del vector pZErO2. El vector obtenido fue corroborado por digestión (Figura 20 c) y por secuenciación. Una vez chequeado, fue digerido con BamHI y XbaI, liberando el *cassette* de interés que se ligó en pPZP-NPT. Se seleccionó el vector binario pPZP-NPT para realizar las transformaciones, dado que ya fue utilizado en el laboratorio con éxito en la transformación de tubérculos de papa (Muñiz García et al. 2014, Muñiz García et al. 2017, Stritzler et al. 2017). El clonado se corroboró mediante digestión (Figura 20 d) y secuenciación, generando el vector pPZP-35S::AtNAS1-tNOS. Esta construcción se transfirió a *R. radiobacter* para realizar la transformación de discos de papa.

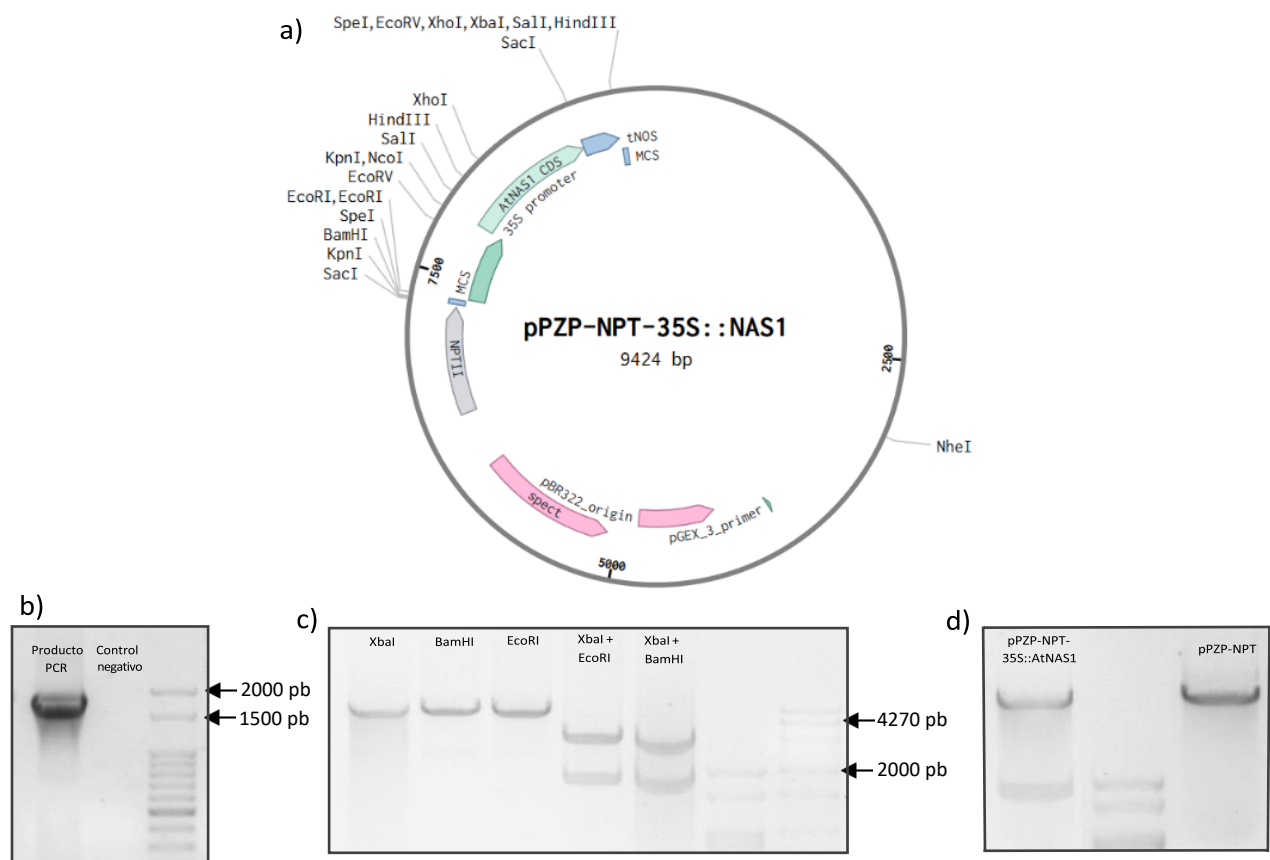


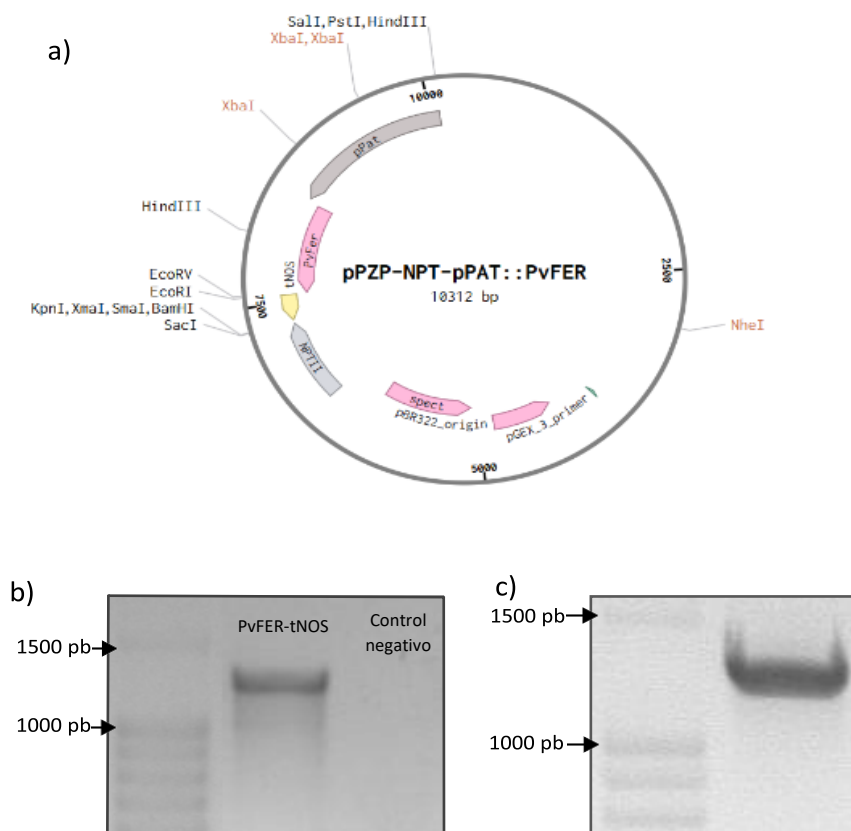
Figura 20. **Construcción y digestión del vector pPZP-NPT-35S::AtNAS1.** a) esquema del vector construido. b) Amplificación del *cassette* 35S::AtNAS1-tNOS a partir de IINF. c) Digestiones para corroborar al vector pZErO2-35S::AtNAS1. d) Digestión para chequear al vector pPZP-NPT-35S::AtNAS1.

Construcción del vector pPZP-NPT-pPAT::PvFER

Para dar inicio a la construcción del vector pPZP-NPT-pPAT::PvFER se diseñaron los oligonucleótidos específicos FW KpnI-Fer y RV Fer-PstI-XhoI que permiten amplificar *PvFER* con su terminador tNOS a partir de IINF, agregando un sitio KpnI y XhoI río arriba del gen y abajo del terminador respectivamente. El vector esperado se muestra en la Figura 21 a. El fragmento de interés se amplificó a partir del vector IINF utilizando la enzima Phusion (Figura 21 b), se digirió (utilizando KpnI y XhoI) y se purificó (Figura 21 c).

Se realizó digestión del vector pBIN-B33 (Rocha-Sosa et al. 1989) con las enzimas EcoRI y HindIII, liberando un fragmento de unas 1700 pb correspondiente al promotor de *Patatina* B33 (pPAT, Figura 21 d), que fue insertado en los sitios homónimos del vector pET28a(+) mediante digestión y ligación. Esto generó el vector pET28a-pPAT, en cuyos sitios KpnI y XhoI se insertó el amplicón PvFER-tNOS.

La digestión de este vector intermedio (pET28a-pPAT::PvFER-tNOS) con la enzima de restricción NheI, liberó el *cassette* pPAT::PvFER- tNOS de unas 2700 pb (Figura 21 e). Este *cassette* se ligó en el pPZP-NPT digerido con XbaI, dado que los extremos generados por NheI y XbaI son compatibles, obteniendo la construcción pPZP-NPT-pPAT::PvFER-tNOS. La correcta formación de este vector fue corroborada tanto por digestión (Figura 21 F), como por secuenciación (Macrogen Inc.). Una vez generado este vector y revisada su correcta construcción mediante secuenciación, se transfirió a *R. radiobacter* para dar comienzo a las primeras transformaciones de tubérculos.



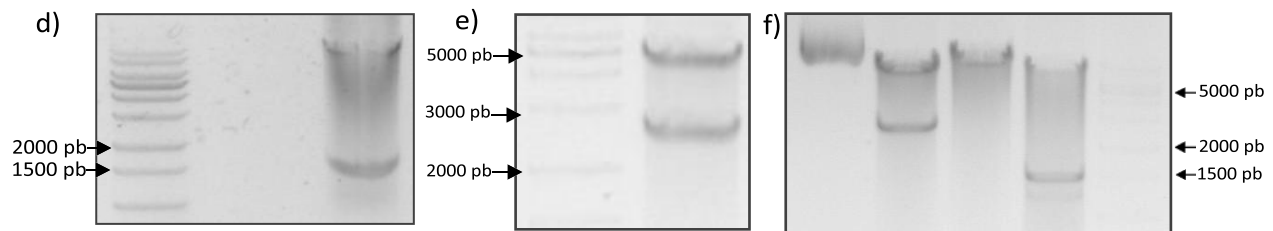


Figura 21. **Construcción del vector pPZP-NPT-pPAT::PvFER-tNOS.** a) Esquema del vector diseñado y construido. b) Producto de PCR obtenido que contiene el gen PvFER-tNOS. c) Digestión del producto de PCR de (b) para la purificación del *cassette* PvFER-tNOS. c) Producto de PCR del punto anterior, digerido con las enzimas KpnI y XhoI. d) Digestión del vector pBIN-B33 con EcoRI y HindIII, liberando el pPAT. e) Digestión del vector pET28a-pPAT::PvFER-tNOS con la enzima NheI, de la cual se purifica la banda de aproximadamente 2700 pb. f) Digestión del vector binario pPZP-NPT-pPAT::PvFER-tNOS para corroborar su correcto ensamblado. Calle 1: vector sin digerir, calle 2: digestión con BamHI, calle 3: digestión con KpnI, calle 4: digestión con BamHI y KpnI y calle 5: Ladder 1 kb.

Construcción del vector pPZP-NPT-35S::AtNAS1-pPAT::PvFER

La tercera y última construcción que se generó fue el vector doble, que contiene tanto el *cassette* para la expresión constitutiva de *AtNAS1*, como el de pPAT::PvFER. Para esto, el vector pET28-pPAT::PvFER-tNOS previamente descrito fue digerido con la enzima de restricción NheI, liberando el *cassette* de expresión de *PvFER*. El producto de esta digestión fue purificado y ligado en el vector pPZP-NPT-35S::AtNAS1 previamente digerido con XbaI (enzima compatible con NheI), obteniéndose finalmente el tercer vector binario, llamado pPZP-NPT-AtNAS1-PvFER (Figura 22) que fue chequeado por secuenciación e inmediatamente utilizado para transformar *R. radiobacter*.

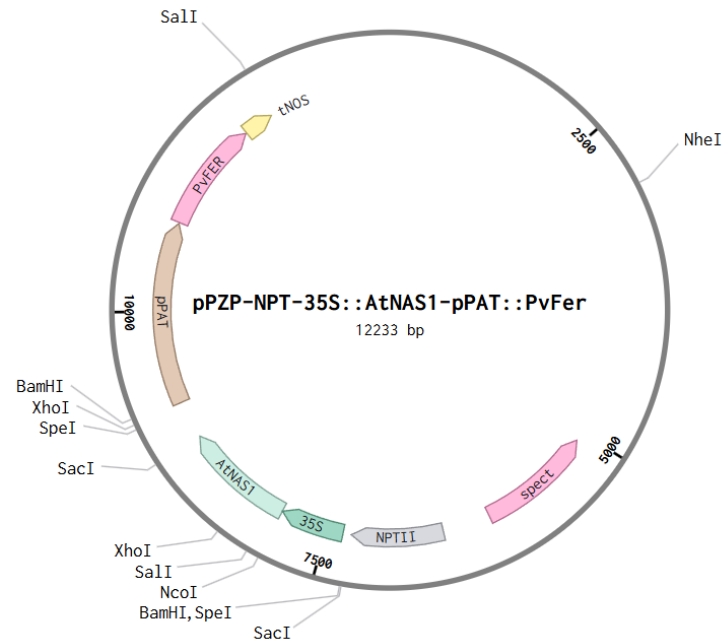


Figura 22. Esquema del vector pPZP-NPT-AtNAS1-PvFER.

Dificultades encontradas

Desde el inicio de los clonados, encontramos un problema que generó un significativo retraso en el desarrollo del trabajo, que fue diseñar la estrategia de clonado y dar inicio a las digestiones y ligaciones sin antes haber corroborado el correcto ensamblado del vector IINF por parte de los autores.

Al comenzar los clonados, la combinación de las enzimas PstI y BamHI donde se esperaba la liberación de dos fragmentos de 7022 y 8921 pb respectivamente, liberó un fragmento de unas 4000 pb (Figura 23 a). En la digestión con XbaI, PstI y BamHI solo se puede distinguir un fragmento de aproximadamente 4100 pb (Figura 23 b calle 3) aunque se esperaban obtener 3 fragmentos de 8921, 4777 y 2245 pb. La digestión con XbaI y BamHI debía liberar un fragmento de 4777 pb que no se observó en el gel (Figura 23 b calle 4).

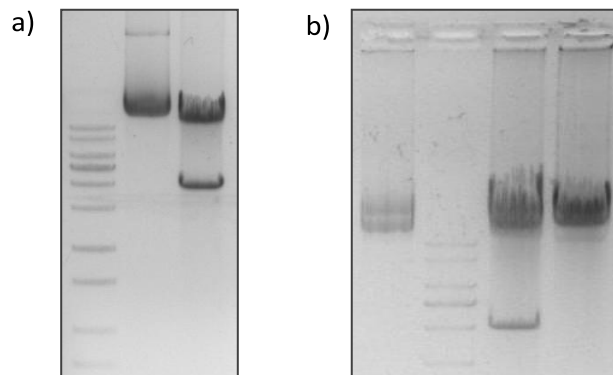


Figura 23. Digestión del vector IINF con diversas enzimas a) Plásmido IINF purificado de *E. coli* y sembrado (calle 2) o digerido con PstI y Bam-HI y sembrado (calle 3) y ladder 1Kpb (calle 1). b) Plásmido IINF purificado a partir de *E. coli* (calle 1), ladder 1Kb Plus (calle 2), digestión con las enzimas de restricción XbaI, PstI y BamHI del vector IINF (calle 3) y con las enzimas XbaI y BamHI (calle 4).

Visto que la secuencia declarada del vector IINF no se corresponde con el patrón observado en las digestiones, se procedió a realizar una reconstrucción del vector para intentar determinar su secuencia correcta y el error cometido en su ensamblado. Como puede verse en la Figura 24, el patrón obtenido en las sucesivas digestiones se corresponde al esperado solo en algunos casos.

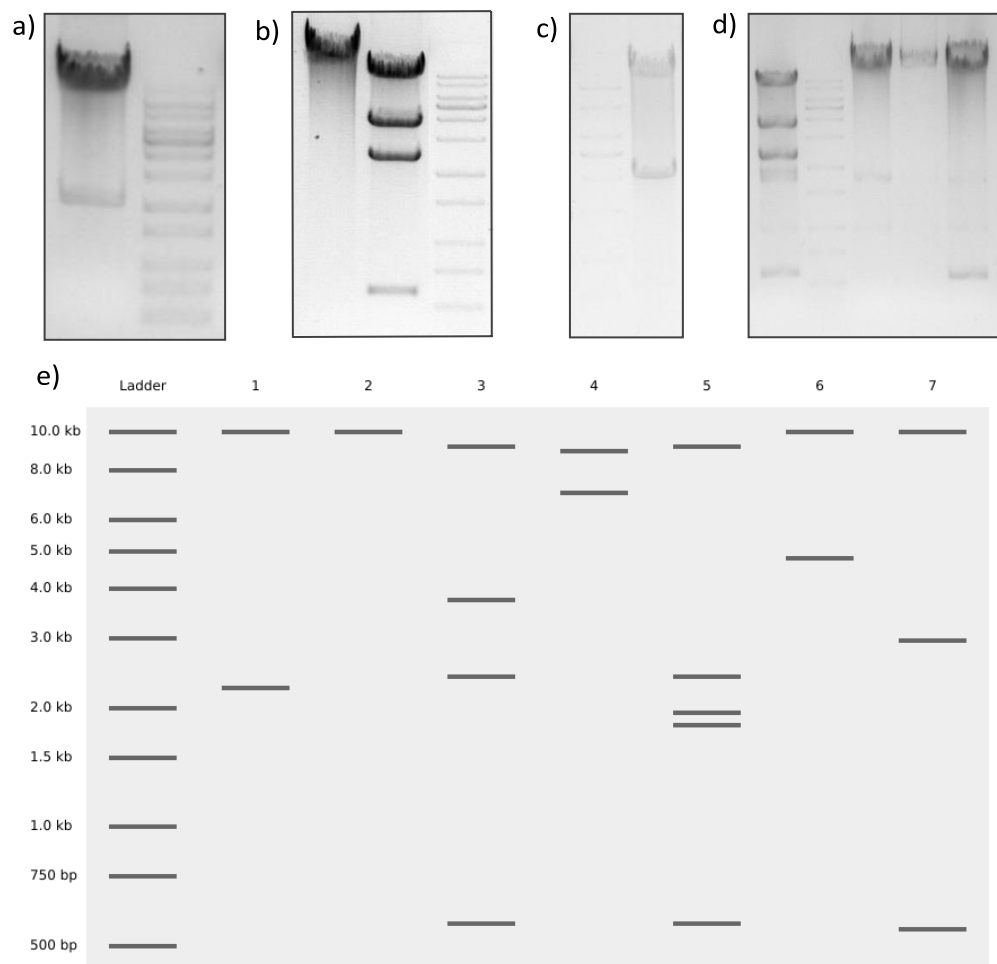


Figura 24. Diferencias entre los fragmentos liberados por digestiones de IINF y los esperados. a) Digestión de IINF con XbaI + PstI. b) Digestión de IINF con PstI (calle 1) o con EcoRI (calle 2). c) Digestión del vector IINF con PstI + BamHI. d) Digestión de IINF con EcoRI y XbaI (calle 1), BamHI y XbaI (calle 3) o BamHI y KpnI (calle 5), mientras que la calle 4 corresponde al IINF sin digerir. e) Patrón de bandas esperado para el vector IINF de acuerdo con la secuencia reportada. La codigestión con Xba I + PstI presentó el

patrón de bandas esperado, al igual que la digestión con PstI sola o con EcoRI sola. Al digerir con PstI y BamHI, se obtiene una banda de aproximadamente 4100 pb, mientras que la banda esperada era de unas 8000 pb. Lo mismo sucede en la digestión con XbaI y BamHI, donde se espera una banda de 4777 pb y se obtiene una banda de unas 1800 pb. Finalmente, en el caso de la codigestión con BamHI y KpnI se espera una banda de 2960 pb que no se visualiza en el gel.

En el trabajo en que se publicó el vector IINF (Boonyaves et al. 2017) no se hicieron mayores aclaraciones sobre su construcción, la cual se encuentra basada en un vector pIRT preexistente sobre el que no se encontró la publicación original, y la única información disponible es que se construyó a partir del vector pCambia1300 colocando a *AtIRT1* bajo su promotor endógeno. La hipótesis que aquí se plantea es que utilizaron los sitios EcoRI y KpnI del pCambia1300 para hacer esta primera construcción llamada pIRT. Finalmente, para armar el IINF tomaron el *cassette* de Wirth et al. 2009 (Figura 25 a) digerido con BamHI y PstI, y lo insertaron en los sitios homónimos del pIRT, dejando una construcción similar a la mostrada en la Figura 25 b. La principal diferencia es la ubicación de los sitios BamHI y KpnI que iban a ser utilizados en la estrategia inicial de clonado para la construcción de los diferentes vectores a utilizar en la tesis, lo que nos obligó a modificar la estrategia original.

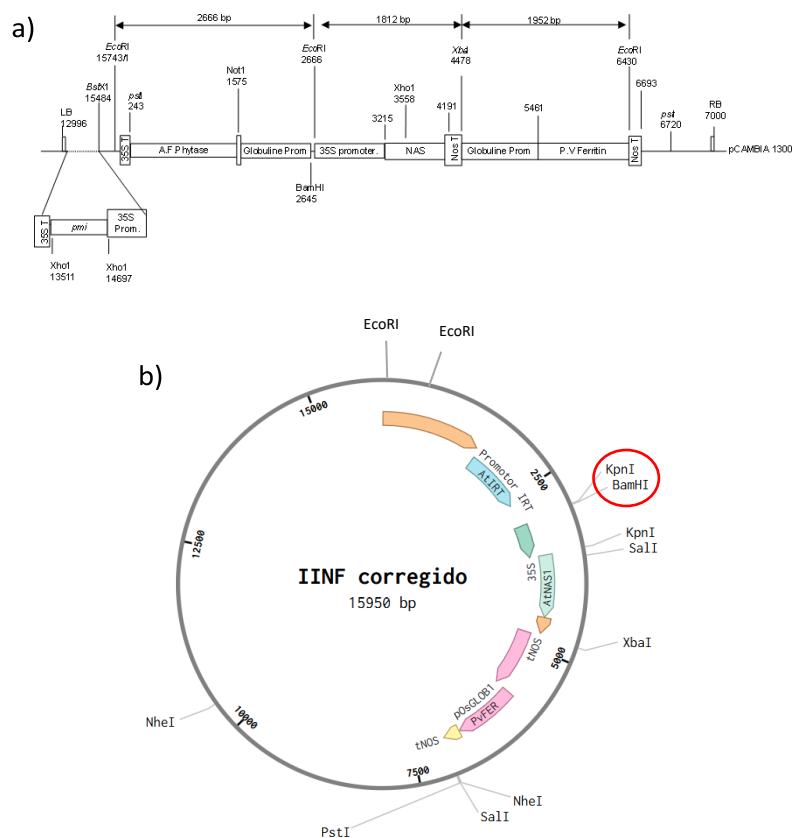


Figura 25. **Reconstrucción del vector IINF y corrección en su esquema.** a) Vector a partir del cual se tomaron los *cassette* de 35S::AtNAS1 y pOsGLOB::PvFER para la construcción del vector IINF, sacado de Wirth et al. 2009. b) Esquema propuesto para IINF, con los sitios corregidos de acuerdo con las

digestiones realizadas en este trabajo y al historial de construcción del mismo.

Durante la construcción de los vectores binarios de interés utilizando pPZP-NPT, la estrategia original iba dirigida al uso del sitio PstI, el cual aparece como un sitio de corte único en el vector, ubicado en su sitio múltiple de clonado (MCS). El problema que surgió fue que al digerir el vector pPZP-NPT con PstI, el mismo liberó un fragmento de unas 600 pb que no debería encontrarse de acuerdo a su secuencia reportada en Romano et al 2001. Corroborado que no se trataba de un error de manipulación (Figura 26 a), y confirmada la presencia del gen NPT en el vector (Figura 26 b) recurrimos nuevamente a la reconstrucción bibliográfica de la estrategia original para el armado del vector. En Romano et al. 2001, los autores declaran que para la construcción del vector pPZP-NPT utilizaron el vector pJJ2525 (Jones et al. 1992) digerido con ClaI y Sall, relleno con la enzima Klenow y ligado en el sitio EcoRI del vector pPZP200 (Hajdukiewicz et al. 1994) (Figura 26 c). Del análisis de las secuencias utilizadas en la construcción del vector, surge que en realidad hay dos sitios PstI en el vector en lugar de uno, y que al utilizar esta enzima de restricción se pierde parte del gen de resistencia a kanamicina. Es por esto la estrategia diseñada para la construcción del vector que permita la expresión de *AtNAS1* debió modificarse.

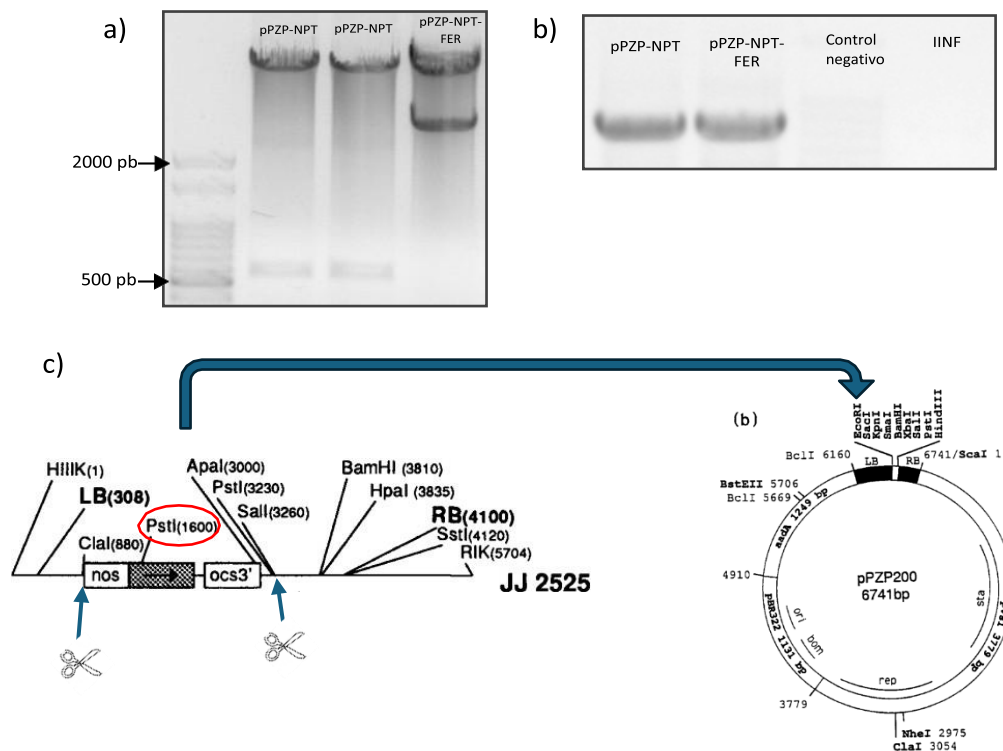


Figura 26. **Reconstrucción del vector pPZP-NPT.** a) Digestion con la enzima PstI de los vectores pPZP-NPT (calles 2 y 3) y pPZP-NPT-pPAT::PvFER-tNOS (calle 4). c) Presencia de NPT tanto en pPZP-NPT (calle 1) como en pPZP-NPT-pPAT::PvFER-tNOS (calle 2), demostrada mediante PCR. Como control negativo se utilizó como templado agua estéril (calle 3) o un preparado del vector IINF (calle 4). d)

Esquema de la construcción de pPZP-NPT, de acuerdo a Romano et al. 2001. En rojo, el sitio PstI no declarado en el vector pPZP-NPT, pero que se encuentra presente.

Capítulo II: Generación de las plantas 35S::AtNAS1, pPAT::FER y 35S::NAS1-pPAT:FER

Transformación de discos de papa

Con las tres construcciones generadas (pPZP-NPT-35S::AtNAS1, pPZP-NPT-pPAT::PvFER, pPZP-NPT-35S::AtNAS1-pPAT::PvFER) se dio inicio a las transformaciones de discos de papa y, luego de múltiples intentos, se logró obtener 1 línea transgénica para 35S::AtNAS1 (simple) llamada N1, dos líneas transgénicas para pPAT::PvFER (simples) llamadas F1 y F2, y 5 líneas transgénicas dobles, que expresan tanto AtNAS1 bajo la regulación del 35S como PvFER bajo la regulación del pPAT llamadas FN1 a FN5. A su vez se obtuvieron diversos controles de regeneración, agrupados con el nombre de wt, ya que no presentaron diferencias significativas entre sí para ninguno de los parámetros analizados. Es importante notar que todas las líneas generadas provienen de discos transformados de manera independiente, para asegurar la independencia de los eventos de inserción de los transgenes.

Además de las construcciones generadas, se decidió utilizar el vector IINF (que posee un marcador de selección de resistencia a higromicina) en ensayos de transformación de discos de papa. Si bien se realizaron múltiples intentos de transformación, en ninguno de los casos se logró regenerar plantas transgénicas. Como se describe en Barrel et al. 2002, los mejores resultados para la transformación y regeneración en papa los hemos obtenido utilizando kanamicina como agente selector.

Presencia de los transgenes

Como primer *screening* para corroborar que las plantas generadas fueran efectivamente transgénicas, se realizó un chequeo que consistió en inhibir el enraizamiento de las plantas *in-vitro* mediante el agregado de kanamicina 50 µg/mL. Esto permite que solo aquellas plantas que hayan incorporado el transgén cuenten con la resistencia a kanamicina otorgada por el gen *NPT*, permitiéndoles enraizar sin dificultades. Se observó que todas las líneas transgénicas generadas fueron capaces de generar raíces, mientras que las plantas de la línea wt no enraizaron en medio selector (Figura 27 a). Este análisis es necesario pero no suficiente para confirmar la presencia de los transgenes, ya que debe corroborarse la inserción correcta del mismo en el ADN de las plantas.

Se realizó una extracción del ADN genómico total de todas las líneas obtenidas *in-vitro*, y una amplificación por PCR tanto del gen *NPT*, como de *AtNAS1* y *PvFER*. Se observa que todas las líneas obtenidas contienen los transgenes esperados, utilizando *EF1α* como control de la calidad del ADN (Figura 27 b).

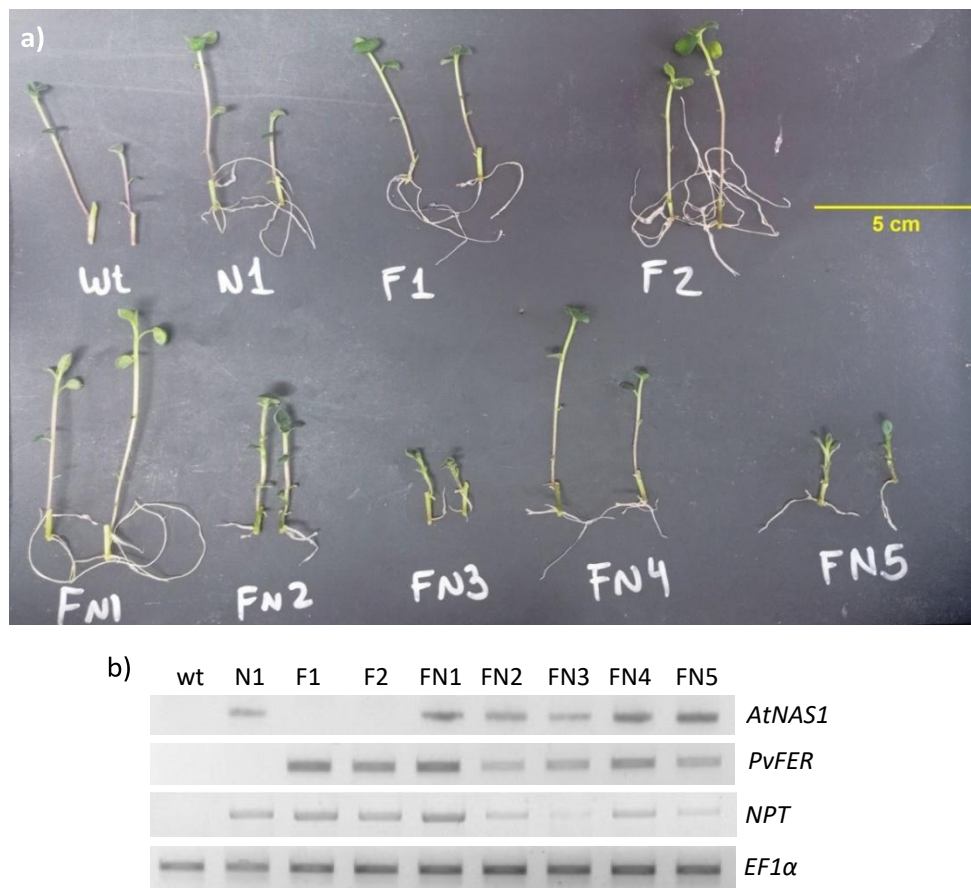


Figura 27. **Verificación de la presencia de las construcciones en las líneas obtenidas.** a) Desarrollo de raíces de plantas crecidas *in-vitro* durante 15 días en presencia de kanamicina. b) Geles de agarosa mostrando la presencia de los transgenes, utilizando como molde ADN de las líneas enumeradas arriba. Oligonucleótidos para *AtNAS1* (primera fila), *PvFER* (fila 2), *NPT* (fila 3) o *EF1α* (fila 4).

Expresión de los transgenes

Hasta aquí se ha demostrado que se obtuvieron 8 líneas transgénicas en total, las cuales cuentan con las inserciones de los genes esperados. Sin embargo, la inserción del transgén en el ADN nuclear de las plantas no garantiza su expresión, ya que puede estar siendo silenciado por diversos factores. Para determinar la expresión de los genes, se realizó una extracción del ARN total de hojas y tubérculos de plantas sembradas en invernadero, se lo retrotranscribió a ADNc y fue utilizado como molde PCR de punto final. Mediante esta técnica se determinó la correcta expresión de los genes en hojas y tubérculos de plantas rusticadas (Figura 28 a y b).

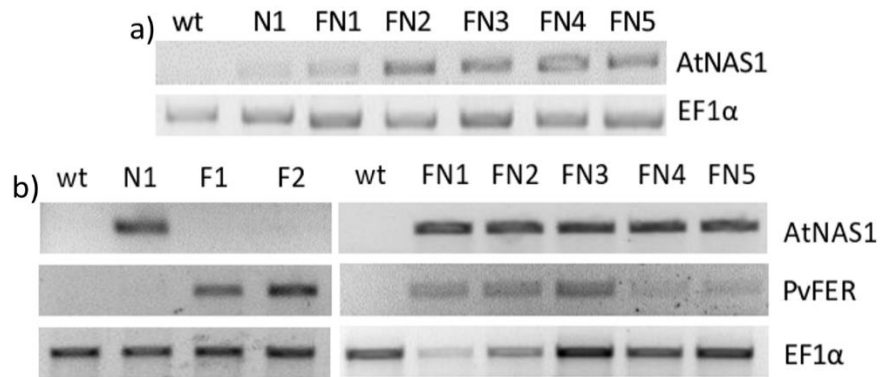


Figura 28. **Expresión de *AtNAS1* y *PvFER***. a) Expresión de *AtNAS1* y de *EF1α* en hojas de plantas crecidas en invernadero. b) Expresión de *AtNAS1*, *PvFER* y *EF1α* en tubérculos. Tanto las hojas como los tubérculos provienen de plantas *ex-vitro* crecidas en invernadero.

Una vez confirmada la correcta expresión de los genes, se realizó una cuantificación de la expresión relativizando los niveles de intensidad de *AtNAS1* o *PvFER* a los de *EF1α* en hojas o en tubérculos de plantas rusticadas (Figura 29). Estos resultados son preliminares y debe incrementarse el número de mediciones para poder sacar conclusiones, debido a que la variabilidad de los datos es muy alta.

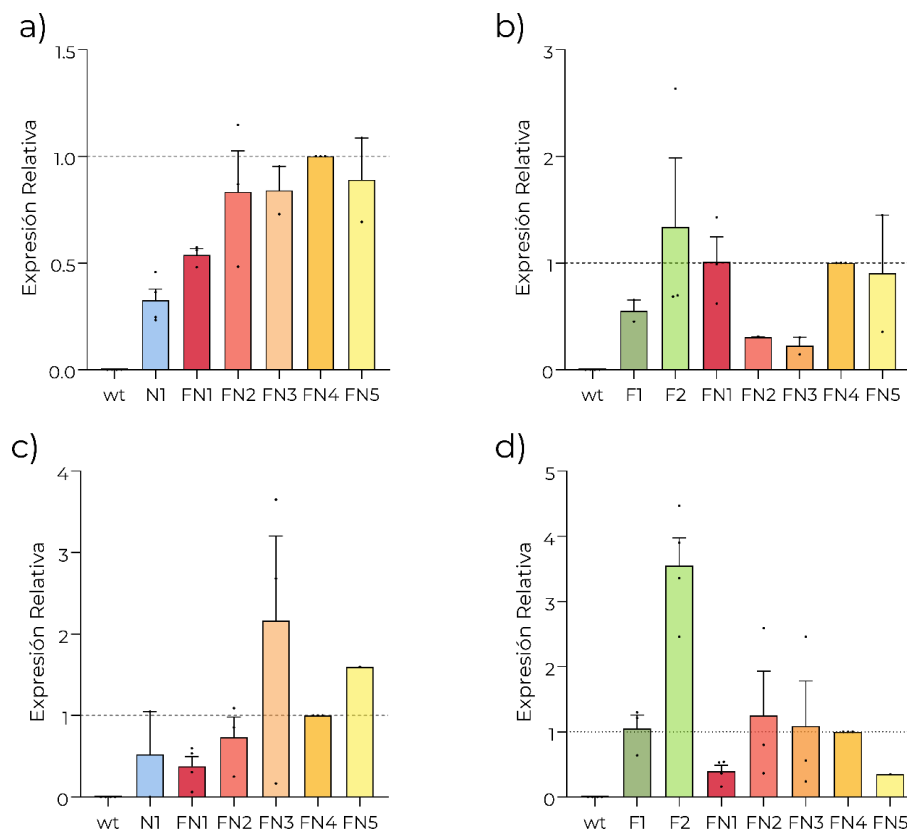


Figura 29. **Niveles de expresión de los transgenes en las líneas**. Expresión de *AtNAS1* en hojas (a),

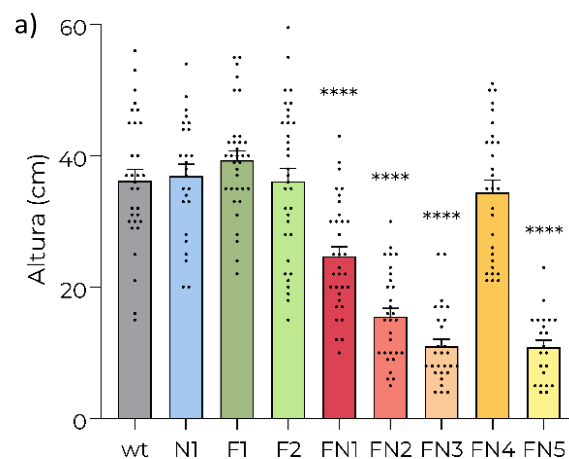
PvFER en hojas (b), *AtNAS1* en tubérculos (c) y *PvFER* en tubérculos (d). En todos los casos, cada punto corresponde a una hoja o a un tubérculo según corresponda. Los datos provienen de 3 cosechas independientes para la expresión en hojas, y 2 cosechas independientes para la expresión en tubérculo (excepto para la línea FN5, donde la expresión de *AtNAS1* corresponde a una sola cosecha en ambos tejidos).

Capítulo III: Análisis del fenotipo de las plantas de papa 35S::NAS1, pPAT::PvFER y 35S::AtNAS1-pPAT::PvFER

Demostrada la correcta expresión de los genes, se procedió a caracterizar el fenotipo de todas las líneas transgénicas obtenidas. Para esto se analizó en primera instancia el crecimiento y la tuberización de las plantas *in-vitro* a forma de estudio preliminar, que luego fueron rusticadas en macetas en invernadero (*ex-vitro*) para determinar su crecimiento en invernáculo. Como forma de validación final de los resultados obtenidos para plantas *ex-vitro* se realizó la siembra de tubérculos de todas las líneas con el fin de obtener plantas crecidas a partir de los mismos.

Crecimiento y tuberización *in-vitro*

Se analizó la altura de las plantas *in-vitro* a los 15 días de cada repique de ápice, con el objetivo de determinar si alguna de las líneas presentaba defectos en su crecimiento. Además, entrenudos de estas mismas plantas fueron colocados en frascos estériles en oscuridad con medio MS 8% (condiciones inductoras de la tuberización) y se analizó su capacidad de tuberizar *in-vitro*.



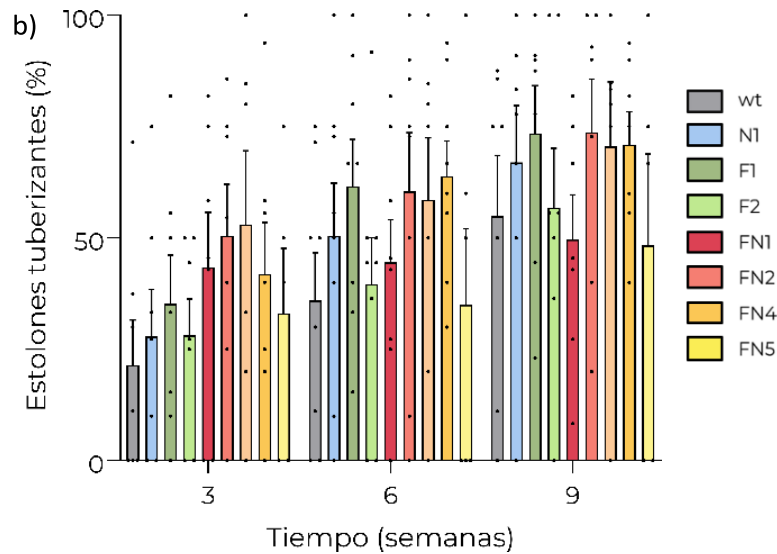


Figura 30. **Desarrollo de las plantas *in-vitro*.** a) Altura de las plantas a los 15 días del repique. Cada punto corresponde a una planta, de 3 repiques independientes. b) Porcentaje de estolones tuberizantes generados a partir de entrenudos crecidos *in-vitro*. Cada punto corresponde a un promedio de los estolones colocados en cada frasco. Los datos de ambas figuras fueron analizados por ANOVA de 1 vía.

No se registraron diferencias significativas en la altura de todas las plantas con construcciones simples (N1, F1 y F2) y de la línea doble FN4 con respecto al wt (Figura 30 a). El resto de las líneas dobles presentan un menor crecimiento que la wt, siendo las líneas FN3 y FN5 las más afectadas. Este resultado muestra que la combinación de ambos genes puede tener un impacto negativo en el crecimiento de las plantas, pero no así la expresión de estos por separado. A su vez, no se observaron diferencias significativas en la capacidad de tuberización *in-vitro* de las plantas de ninguna de las líneas transgénicas (Figura 30 b).

Rusticado de plantas transgénicas

Los ápices de plantas *in-vitro* son colocados en tubos con medio MS 2% fresco, y luego de 15 días se pasan a tierra en macetas en invernadero, pasando a ser consideradas plantas *ex-vitro*. Luego de 28 días se analiza su crecimiento vegetativo junto a diversos parámetros fisiológicos, y una vez que las plantas entran en senescencia (aproximadamente 2 meses más tarde) se realiza la cosecha y se analizan los tubérculos y parámetros relacionados al rendimiento.



Figura 31. **Diseño experimental para la obtención de plantas *ex-vitro*.** Los ápices se colocan en medio MS 2% sacarosa, se crecen durante 15 días, y son sembradas de a 3 plantas en cada maceta de 1 L conteniendo sustrato Klasmann TS-1. 28 días después se realizan las mediciones correspondientes y luego de otros 60 días, cuando la planta ya se encuentra senescente, se cosechan los tubérculos.

Caracterización de las hojas de plantas rusticadas

En primer lugar, se tomó el folíolo apical de la segunda hoja desplegada de plantas de 28 días y se determinó su tamaño, peso seco y forma (Figura 32 a, b y c respectivamente). Cabe recordar que las plantas de papa poseen hojas compuestas, contando con un folíolo apical y varios folíolos secundarios. Con el fin de estandarizar las mediciones, en todos los casos se analiza solamente el folíolo apical de cada hoja. De este resultado surge que las líneas simples (N1, F1 y F2) y la línea FN4 no presentaron diferencias significativas con la wt en ninguno de los parámetros analizados, mientras que el resto de las plantas con construcciones dobles presentaron hojas de menor tamaño y/o menor peso seco (Figura 32). En ninguna de las líneas se observa una diferencia en la forma del folíolo apical, entendiéndose a la misma como la relación entre el diámetro mayor y el diámetro menor. Una menor superficie fotosintética puede tener consecuencias negativas en el crecimiento y desarrollo de las plantas, lo que puede tener un impacto negativo en el crecimiento y el rendimiento productivo de estas líneas transgénicas.

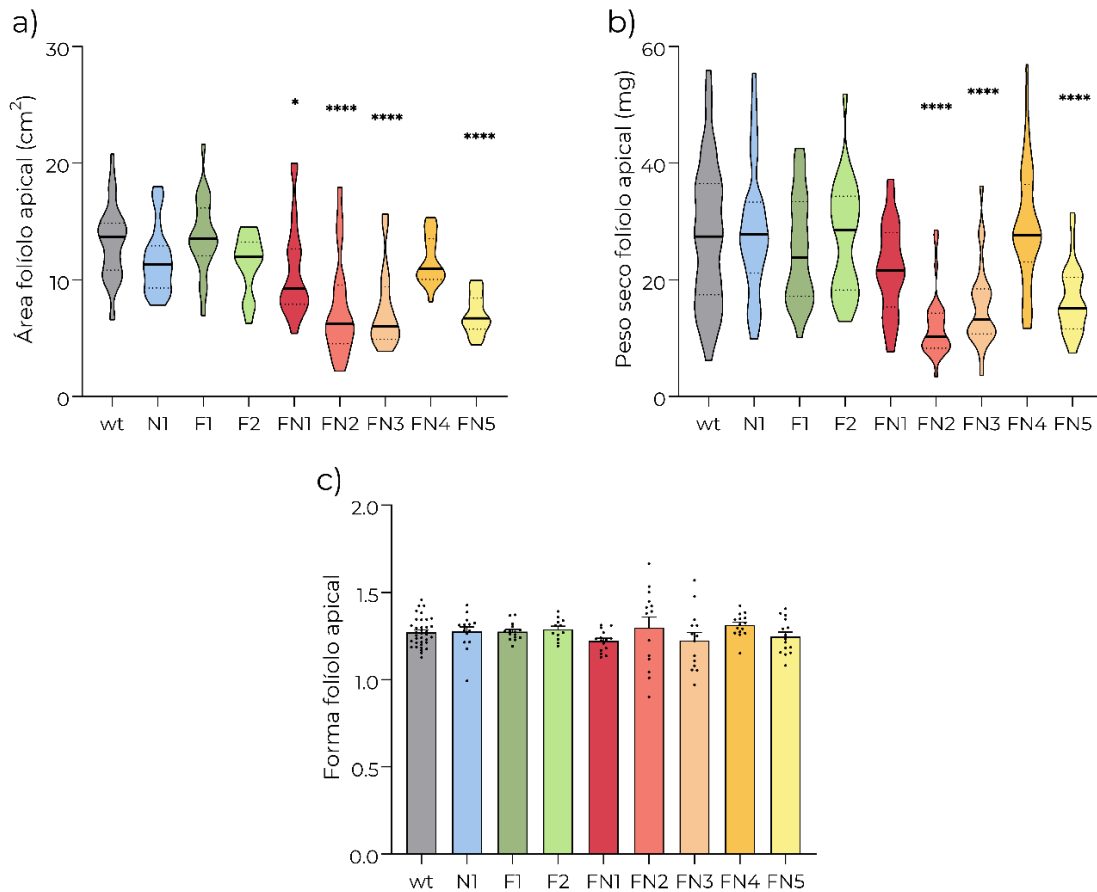


Figura 32. **Análisis del tamaño de las hojas.** a) Área del folíolo apical. b) Peso seco del folíolo apical. c) Forma del folíolo apical (diámetro mayor / diámetro menor). En todos los casos los resultados provienen de 3 cosechas independientes y cada n corresponde a un folíolo de una planta, analizados por ANOVA de 1 vía.

Crecimiento de plantas rusticadas

El siguiente parámetro morfológico que se determinó fue la altura y el número de hojas de las plantas de las líneas obtenidas. Se observó que, en concordancia con los resultados obtenidos *in-vitro*, las plantas con construcciones simples y las de la línea FN4 no presentan diferencias significativas de altura o número de hojas respecto a la wt, mientras que la línea FN2 presenta menor altura, y las líneas FN1, FN3 y FN5 no solo tienen menor altura, sino además un menor número de hojas por planta (Figura 33 a y b). Llama la atención que un 80% de las líneas transgénicas obtenidas presenten diferencias significativas en el crecimiento, mientras que una de las líneas (FN4) no presenta esas diferencias. La búsqueda de una respuesta a esta diferencia entre líneas con una misma construcción va a ser tratada a lo largo la tesis, aunque creemos que la cuantificación precisa de los niveles de expresión de los transgenes en los

diferentes tejidos de las plantas generadas aportaría valiosa información en este sentido.

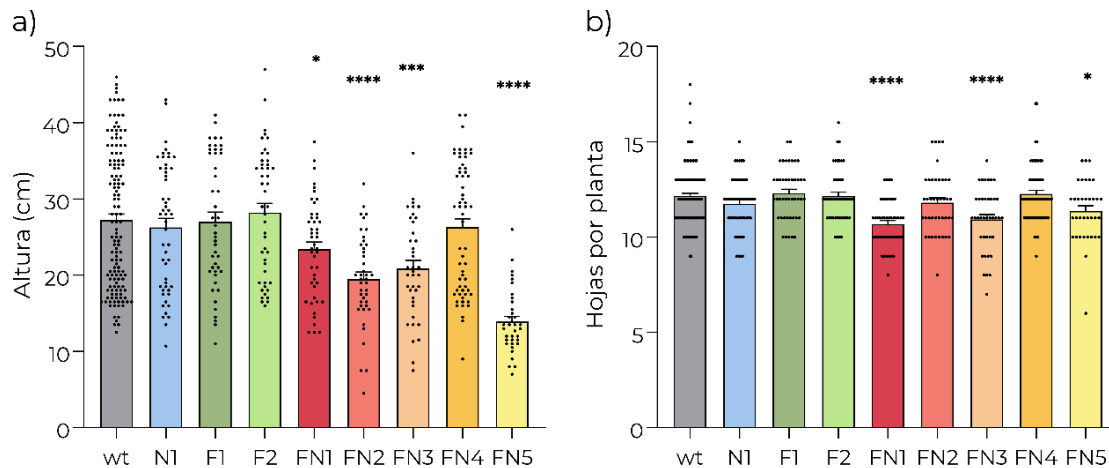


Figura 33. **Crecimiento vegetativo de las plantas rusticadas.** a) Altura a los 28 días. b) Número de hojas por planta. En todos los casos, cada n corresponde a una planta, ubicadas de a 3 por maceta. Los resultados corresponden a 5 cosechas independientes analizados por ANOVA de 1 vía.

Contenido de pigmentos en hojas de plantas rusticadas

Dado que los genes utilizados están involucrados en el transporte y almacenamiento del Fe, y que el mismo se encuentra involucrado en la biosíntesis de clorofila, se analizó el contenido de pigmentos en las hojas. Mediante el uso de un medidor de SPAD, se obtuvieron valores relativos del contenido de clorofila en las hojas de las plantas de todas las líneas (Figura 34 a), indicando un mayor contenido de clorofila en las líneas FN1, FN2, FN3 y FN5, las cuales (como se mostró con anterioridad) presentan hojas de menor tamaño (Figura 32). Para validar este resultado, se realizó una extracción de los pigmentos presentes en las hojas en acetona 80%, y se cuantificó su contenido mediante el uso de un espectrofotómetro (Figura 34 b-f). Los resultados obtenidos de estas mediciones se contradicen con los de SPAD, dado que las líneas FN1, FN2, FN3 y FN5 presentan una tendencia de disminución en el contenido de clorofila a y b, siendo significativa solo para FN1 y FN5. Cabe destacar que la relación entre clorofila a y b y el contenido de carotenoides no varían en ninguna de las líneas transgénicas respecto de la wt. Una posible explicación para el hecho de que las líneas que poseen hojas más chicas y menor contenido de clorofila por gramo presenten niveles elevados de unidades SPAD, es que el grosor de las hojas sea mayor en estas líneas, incrementando así la absorbancia medida por el aparato. El grosor de las hojas no fue analizado experimentalmente, aunque se planea realizar a futuro para poder dar explicación a este fenómeno.

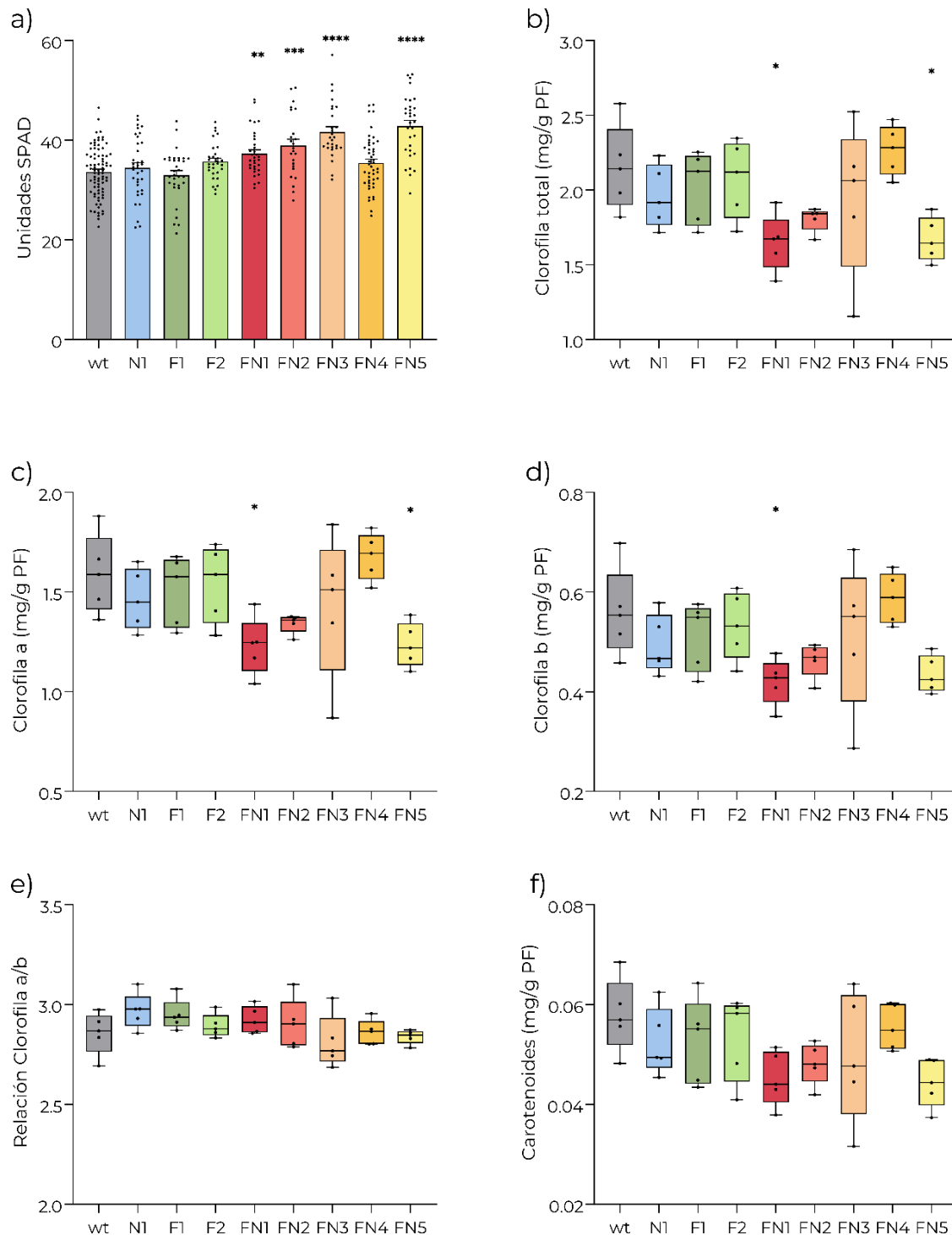
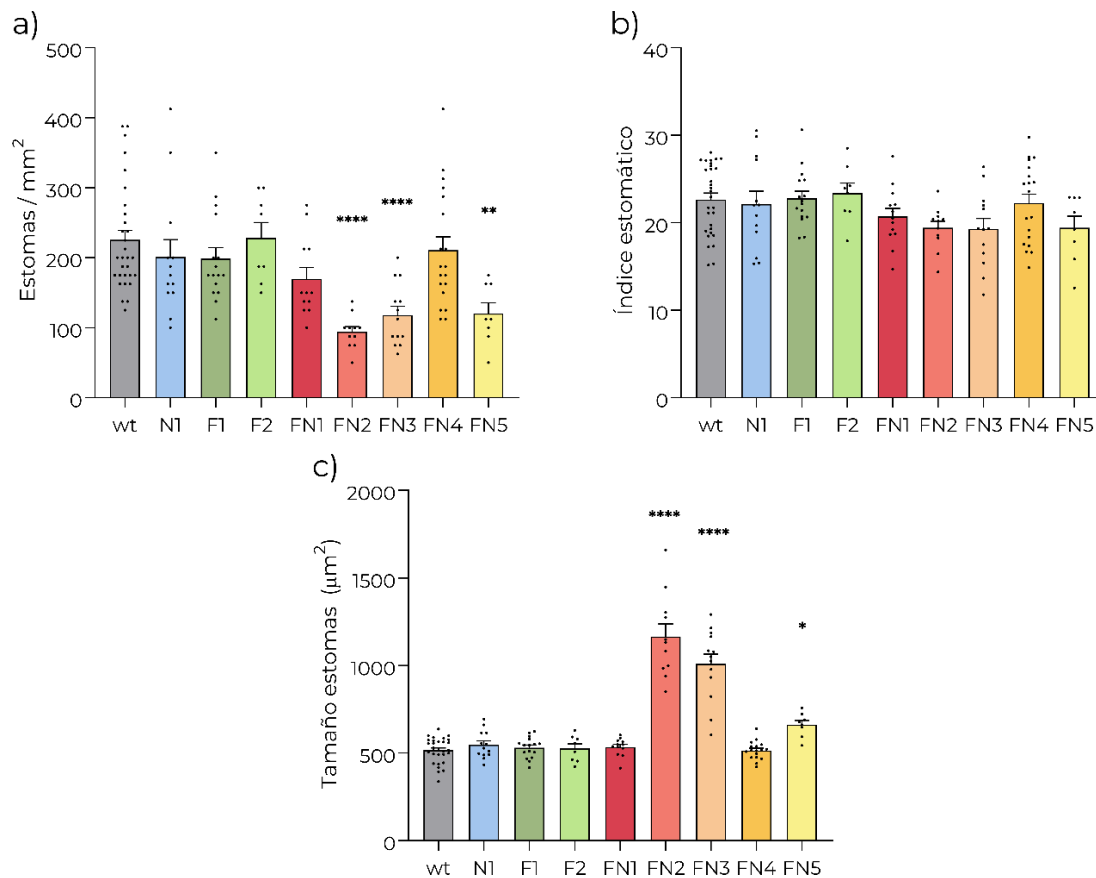


Figura 34. **Contenido de pigmentos en hojas de plantas *ex-vitro*.** a) Se estima el contenido de clorofila total mediante el uso de SPAD. Se analiza el contenido de clorofila total (b), clorofila a (c), clorofila b (d), carotenoides (f) y la relación entre clorofila a y b (e) por método espectrofotométrico. Cada punto representa una hoja, para 3 cosechas independientes en (a) y 1 cosecha en (b-f); los datos fueron analizados por ANOVA de 1 vía.

La disminución del tamaño y el contenido de clorofila de las hojas de las líneas dobles FN1, FN2, FN3 y FN5 podría explicar al menos parcialmente el menor tamaño de las plantas, ya que tendrían limitada su capacidad de generar fotosintatos.

Caracterización de los estomas de plantas rusticadas

Dado que la generación de los fotosintatos se encuentra afectada no solo por la cantidad de pigmentos sino también por la obtención de CO₂ de la atmósfera a través de los estomas, el siguiente paso fue caracterizar a los mismos en todas las líneas transgénicas.



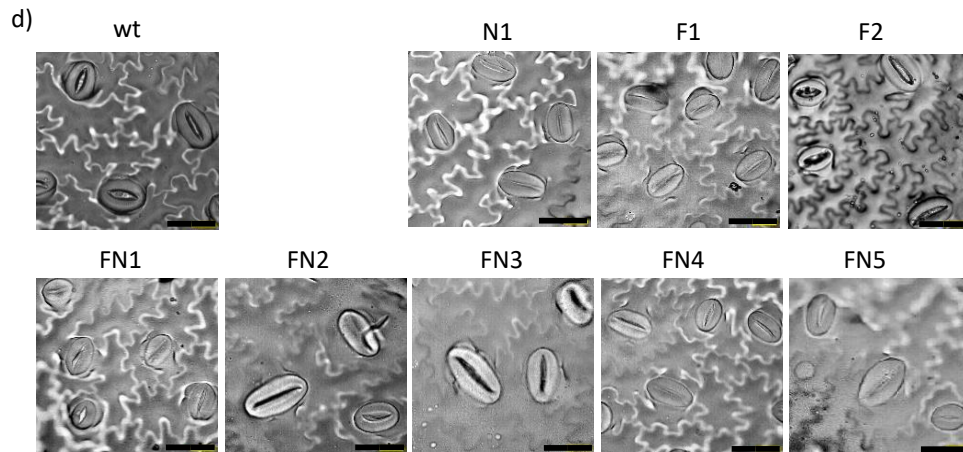


Figura 35. **Análisis de los estomas de la cara abaxial de hojas.** a) Densidad de estomas, entendida como el número de estomas por mm^2 . b) Índice estomático, entendido como el número de estomas sobre el número total de células en el campo analizado. c) Tamaño de los estomas, entendido como su área. d) Imagen representativa de un campo, mostrando los estomas y otras células epidérmicas presentes. En todos los casos, cada punto representa el promedio de dos campos obtenidos de una misma hoja, en 3 cosechas independientes; los datos fueron analizados por ANOVA de 1 vía.

Las líneas FN2, FN3 y FN5 presentaron una menor densidad de estomas, junto con un mayor tamaño de los mismos (Figura 35 a y c). La línea FN1 presentó una tendencia hacia una menor densidad de estomas, sin significancia estadística. Nuevamente las líneas simples no presentan diferencias respecto a la wt en el desarrollo de sus estomas, como así tampoco los presenta la línea FN4. De acuerdo con la bibliografía (Franks & Farquhar 2007), poseer una menor cantidad de estomas de mayor tamaño está relacionado con una mayor pérdida de agua en las hojas, ya que estos controlan el 95% del intercambio de gases entre la hoja y el ambiente (Lawson & Blatt 2014). Por esto se procedió a analizar la capacidad de retención de agua de las hojas. Una menor capacidad de retener agua se espera en las líneas FN2, FN3 y FN5, mientras que para las líneas simples y la línea FN4 se espera que no presenten diferencias respecto a la wt, ya que sus hojas y estomas son de un tamaño y cantidad similar. Se cortó la segunda hoja desplegada de plantas rusticadas de 28 días y se analizó la variación en su masa a lo largo de 24 h.

Retención de agua en hojas de plantas rusticadas

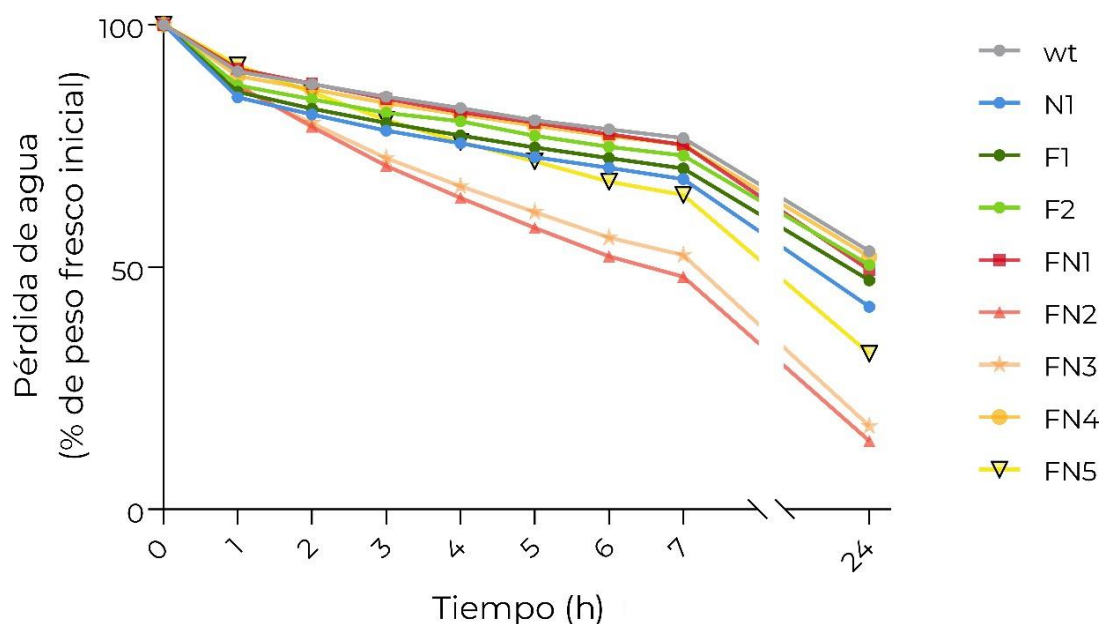
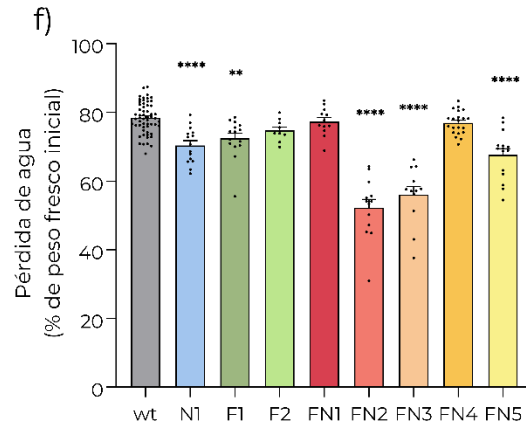
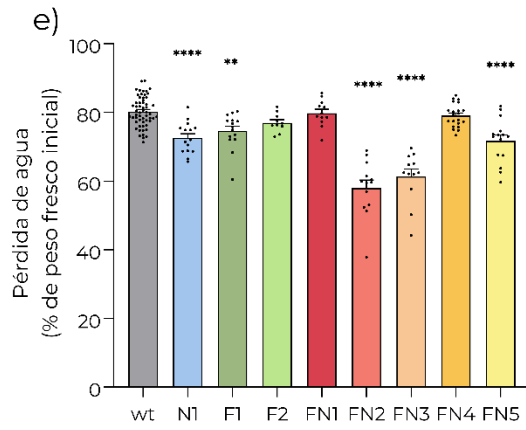
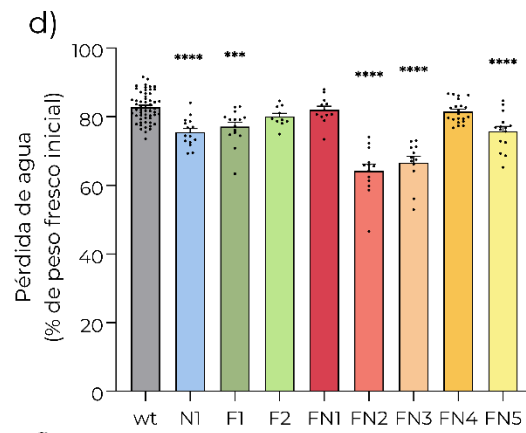
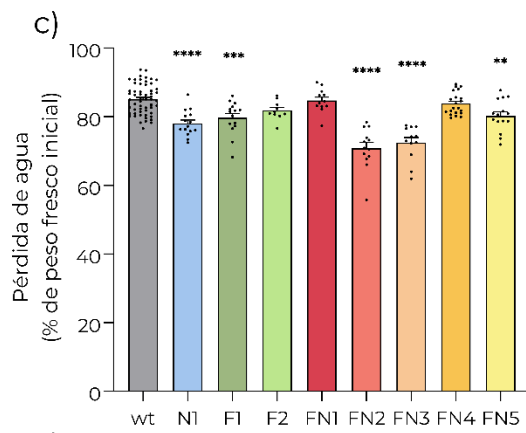
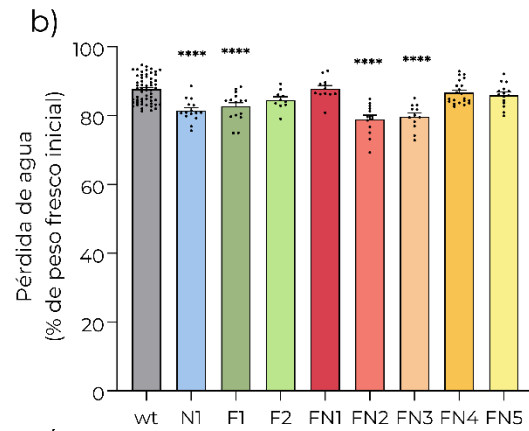
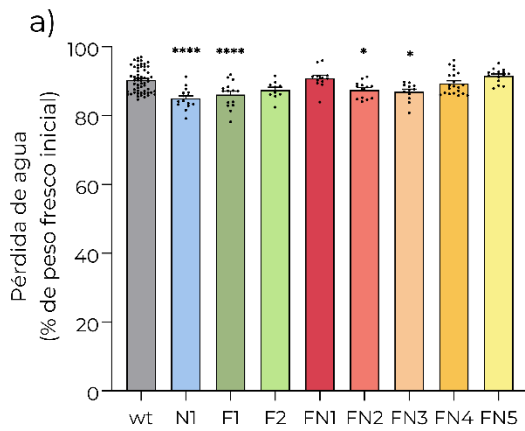


Figura 36. **Pérdida de agua de hojas cortadas a temperatura ambiente.** Se analizó la variación en el contenido de agua cada una hora durante 7 h, y luego a las 24 h. El gráfico corresponde al análisis de 3 experimentos independientes. Para una mejor visualización el desvío y la significancia se muestran por separado en la Figura 37.

Si se analiza la pérdida de agua a tiempos cortos, se observa que las líneas N1, F1, FN2 y FN3 presentan una mayor pérdida que la wt desde la primera hora hasta las 7 h (Figura 37 a-g). Resulta inesperada la mayor pérdida de agua en estas líneas simples, dado que no se registraron diferencias ni en sus hojas, ni en sus estomas. Entre las 3 y las 7 horas también se vuelve significativa la mayor pérdida en la línea FN5. Luego de 24 h, las hojas de las líneas FN2, FN3 y FN5 presentaron una mayor pérdida de agua que las hojas de la línea wt (Figura 37 h). Este resultado es consistente con lo observado en los estomas de estas plantas, que al ser de mayor tamaño y menor número, disminuyen la capacidad de retención del agua. También resulta significativa la mayor pérdida de agua de la línea N1 desde la primera hora y hasta las 24 h de tratamiento. La línea F1 presenta mayor pérdida de agua al inicio del tratamiento, pero esa diferencia deja de ser significativa para 24 h de tratamiento. El resto de las líneas no presentaron diferencias en cuanto a la retención de agua bajo este tratamiento. En este experimento, la variación inicial depende del contenido de agua que tuvieran las plantas al momento de ser cortadas, lo cual puede estar aportando error al experimento y generando falsos positivos.



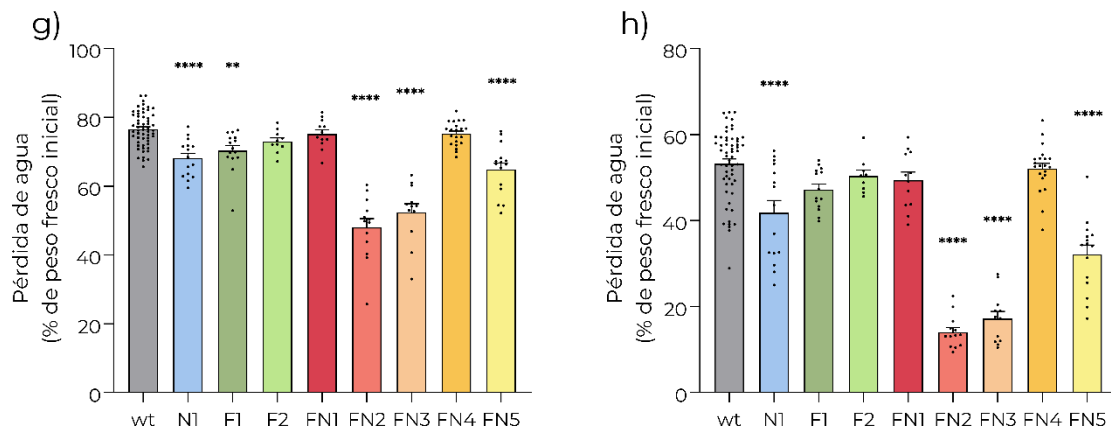


Figura 37. **Análisis de la pérdida de agua de hojas durante 24 h.** Se expresa como porcentaje de peso fresco comparado al peso fresco inicial a 1 h (a), 2 h (b), 3 h (c), 4 h (d), 5 h (e), 6 h (f), 7 h (g) y 24 h (h). En estos gráficos se muestra el resultado de 3 cosechas independientes, donde cada punto corresponde al folíolo apical de una hoja de plantas *ex-vitro* en invernadero; los datos fueron analizados por ANOVA de 1 vía.

Con el objetivo de disminuir el error que puede generar el estado de hidratación de las plantas al momento de ser cortadas, se realiza un estudio del contenido relativo de agua (CRA), en el cual las hojas una vez cortadas se colocan en agua durante 12 h, para homogeneizar la hidratación de las hojas al inicio del experimento.

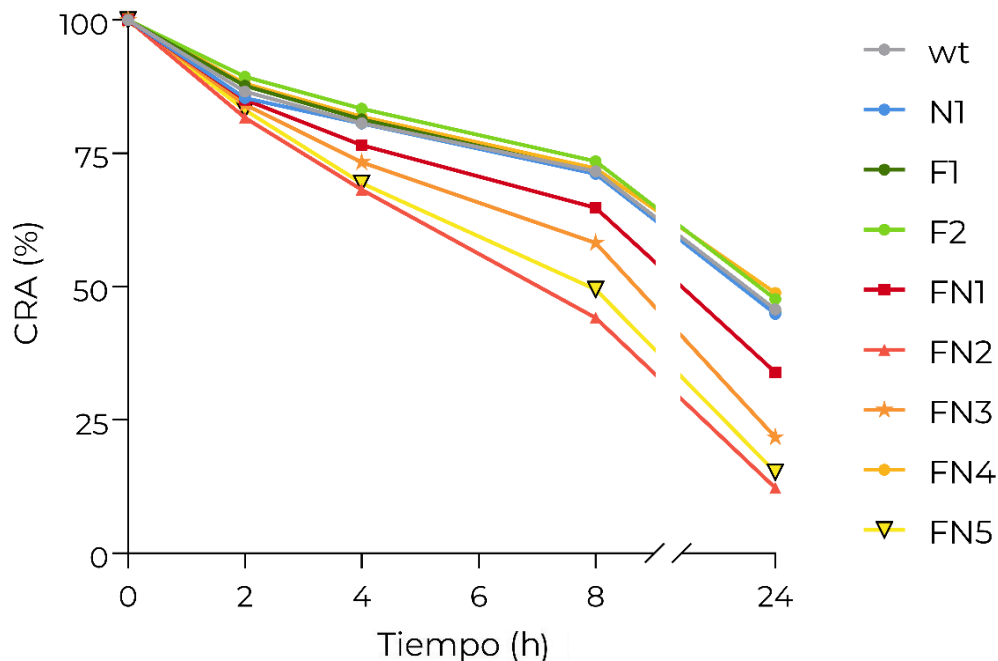


Figura 38. **Contenido relativo de agua de las hojas**, medidas cada 2 h hasta las 8 h, y luego a las 24 h. El resultado corresponde al promedio de 4 experimentos independientes. Nuevamente, el análisis estadístico y el desvío se encuentran en una figura aparte (Figura 39), para facilitar la visualización.

La línea FN2 presentó un menor CRA desde las 2 h y hasta el final del tratamiento, mientras que las líneas FN1 y FN5 recién mostraron diferencias significativas a partir de las 4 h de tratamiento (Figura 39 a-d). La línea FN3 solo presentó diferencias significativas a las 24 h. Bajo este nuevo tratamiento, solo las hojas de las líneas FN1, FN2, FN3 y FN5 presentaron un menor contenido relativo de agua que la wt, mientras que ninguna de las líneas simples ni la FN4 presentaron diferencias significativas en ninguno de los tiempos estudiados. Este resultado va de la mano con los anteriores, donde se observaron deficiencias en el crecimiento de estas líneas dobles y en el desarrollo de sus estomas. También resulta interesante comparar estos resultados con los obtenidos en las Figuras 36 y 37, donde las líneas N1 y F1 habían presentado menor retención de agua. Al saturar de agua las hojas antes de dejarlas deshidratar, se homogeneiza el estado de hidratación de las hojas, mejorando el resultado obtenido.

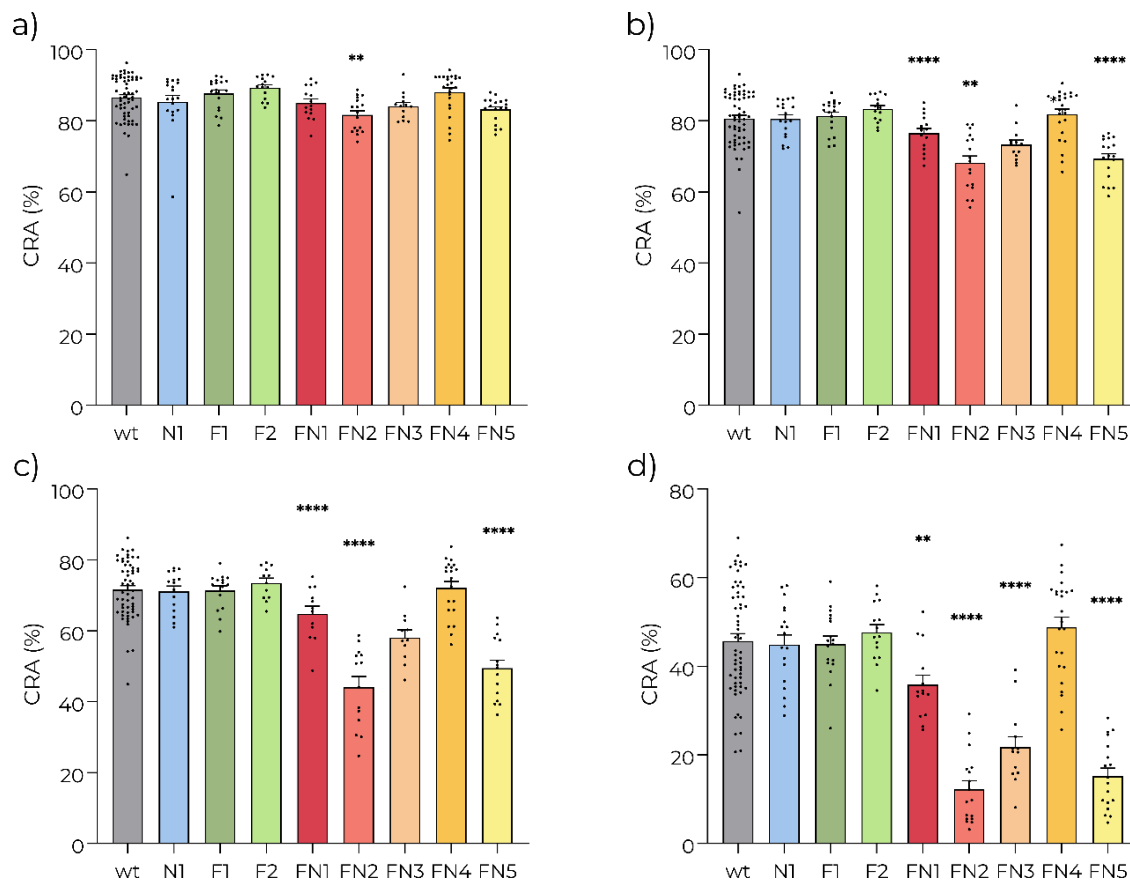
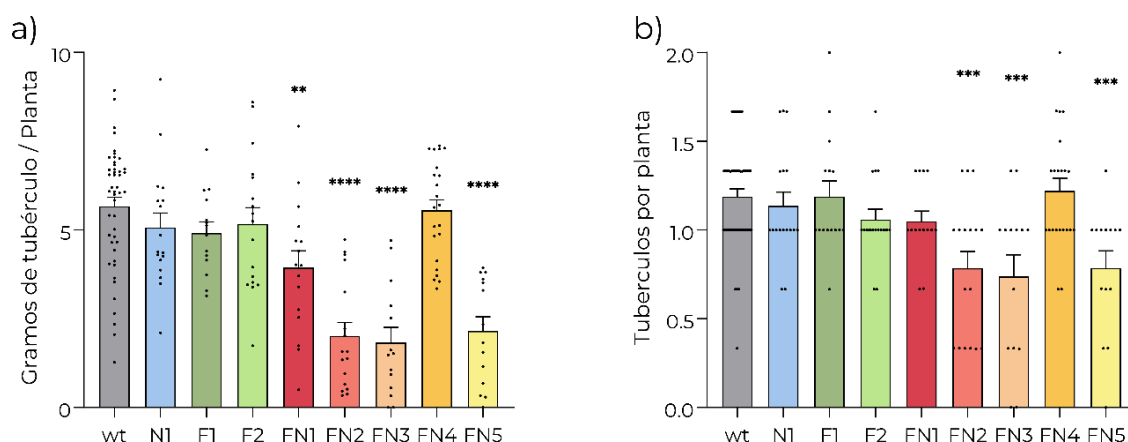


Figura 39. **Variación en el contenido relativo de agua de hojas de plantas *ex-vitro***. El análisis se realiza a las 2 (a), 4 (b), 8 (c) y 24 (d) h de tratamiento. El resultado corresponde a 4 cosechas

independientes, y los datos fueron analizados en cada caso por ANOVA de 1 vía, donde cada punto corresponde a una hoja.

Producción de tubérculos en plantas rusticadas

Una de las variables deseables a la hora de desarrollar un cultivo biofortificado, es que su rendimiento no se encuentre afectado negativamente, ya que esto disminuye el interés de los productores en el mismo y aumenta el costo del producto final. Por esto, se determinó la capacidad de producir tubérculos de todas las líneas transgénicas en el invernadero a partir de plantas rusticadas (Figura 40 a), observándose que las líneas simples y la línea doble FN4 no poseen diferencias significativas con la wt en cuanto a los gramos de tubérculo producidos por planta. A su vez, el resto de las líneas dobles (FN1-3 y FN5) presentan un rendimiento significativamente disminuido. Este resultado es esperable visto las diversas alteraciones morfo-fisiológicas que presentan las plantas de estas líneas transgénicas. Debemos tener en cuenta que las hojas de estas plantas son más chicas, que presentan un contenido igual o menor de clorofila y una menor capacidad de retención de agua junto con una menor altura total de la planta. El menor rendimiento observado podría deberse a que estas plantas producen menos tubérculos, a que los mismos son de menor tamaño, o una combinación de ambas. Un análisis de estas variables permitió determinar que en la línea FN1 esto se explica por un menor tamaño de los tubérculos (Figura 40 c), mientras que el resto de las líneas no solo se debe al menor tamaño, sino también a un menor número de tubérculos producidos por planta (Figura 40 b y c). Se analizó también la forma de los tubérculos, entendiendo a la misma como el diámetro del lado mayor dividido su diámetro menor. Se observó que los tubérculos de la línea F1 fueron más alargados que los de la wt, mientras que los tubérculos de las líneas FN1 y FN5 fueron más esféricos.



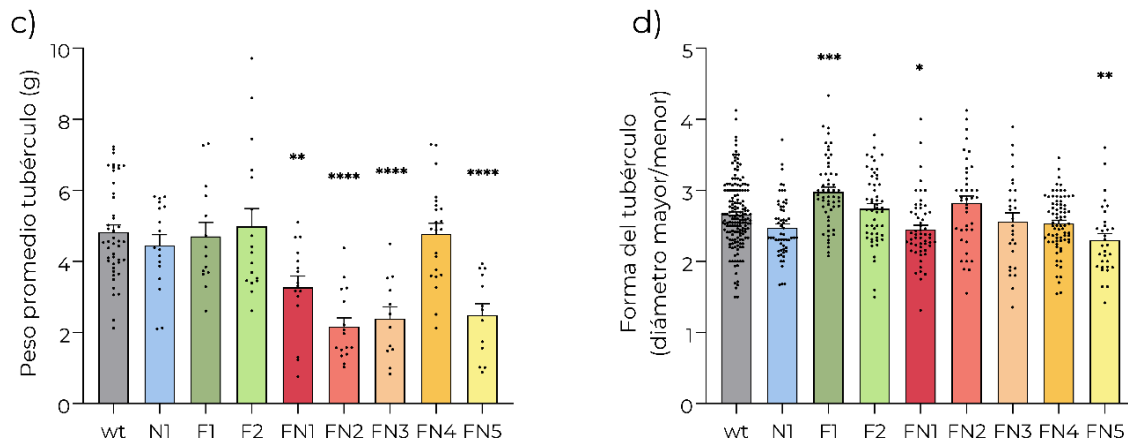


Figura 40. **Análisis de los tubérculos producidos por las plantas *ex-vitro*.** a) Rendimiento productivo de las plantas, entendido como gramos de tubérculo producido por planta. b) Número de tubérculos producidos por cada planta. Cada punto corresponde al número total de tubérculos presentes en una maceta, dividido por la cantidad de plantas presentes en la maceta. c) Tamaño de los tubérculos producidos, cada punto corresponde al peso promedio de todos los tubérculos presentes cada maceta. d) Forma de los tubérculos, entendida como su diámetro mayor sobre su diámetro menor, donde cada punto corresponde a un tubérculo. En todos los casos los datos corresponden a 5 cosechas independientes, analizados por ANOVA de 1 vía.

Calidad de procesamiento de los tubérculos de plantas rusticadas.

Si bien las líneas simples y la FN4 no presentan diferencias en el rendimiento ni tamaño de los tubérculos, existen diversos parámetros relacionados con la calidad de los mismos que deben ser analizados. Es deseable que la biofortificación de los tubérculos no implique una baja en su calidad culinaria, ni que aumentar el contenido de un mineral tenga un impacto negativo en el contenido de otros nutrientes. El peso seco es importante, ya que un menor porcentaje de peso seco indica que los tubérculos tienen mayor contenido de agua, lo cual baja su valor nutricional y su calidad culinaria. Lo mismo sucede con los niveles de proteína y almidón, lo deseable sería obtener niveles similares o superiores a los de la línea wt. Por otro lado, el alto contenido de azúcares puede generar amarronamiento de los tubérculos al cocinarse, lo cual baja su calidad de procesamiento. Del análisis de todos estos parámetros, surge que no hay diferencias significativas en ninguna de las líneas respecto a ninguno de estos parámetros, siendo los tubérculos de una calidad similar a los de la línea wt (Figura 41 a-g).

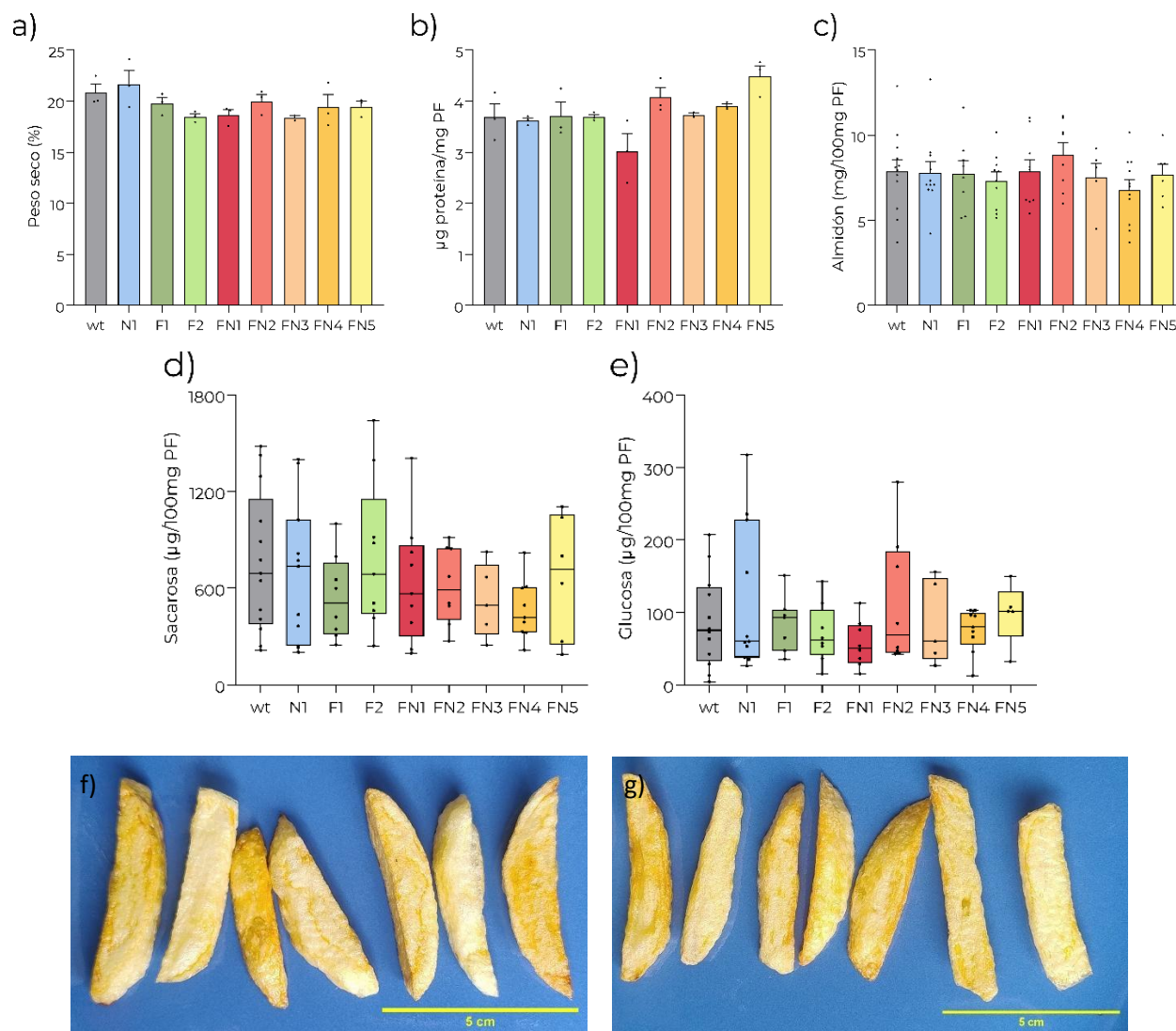


Figura 41. Análisis de parámetros de calidad de los tubérculos. Se determina el peso seco de los tubérculos (a), su contenido de proteínas (b), almidón (c), sacarosa (d) y glucosa (e). Se muestra un ejemplo de papas fritas a partir de tubérculos wt (f) y FN4 (g) (pertenecientes a la cosecha mostrada en la figura 58) mostrando un color similar. En ninguno de los casos se observan diferencias significativas. Cada punto graficado corresponde a un tubérculo. El análisis surge de 1 experimento independiente para las figuras a y b. Para las figuras c, d y e, las líneas F1, FN2, FN3 y FN5 son resultado de 2 cosechas independientes, mientras que para la wt y el resto de las líneas se grafican 3 cosechas independientes. El análisis estadístico se realizó por ANOVA de 1 vía.

Contenido de Fe y Zn en los tubérculos de plantas rusticadas

Habiendo realizado una caracterización de las diferentes líneas transgénicas obtenidas, tanto a

nivel de su desarrollo, como de su productividad y la calidad de sus tubérculos, se procedió a determinar el contenido de Fe y Zn de los tubérculos, dado que este es el objetivo de nuestra estrategia de biofortificación. Para esto se cosecharon los tubérculos luego de la senescencia de las plantas y se determinó el contenido de Fe y Zn mediante absorción atómica, o alternativamente por el método de o-fenantrolina para el contenido de Fe. Los resultados obtenidos se grafican en la Figura 42.

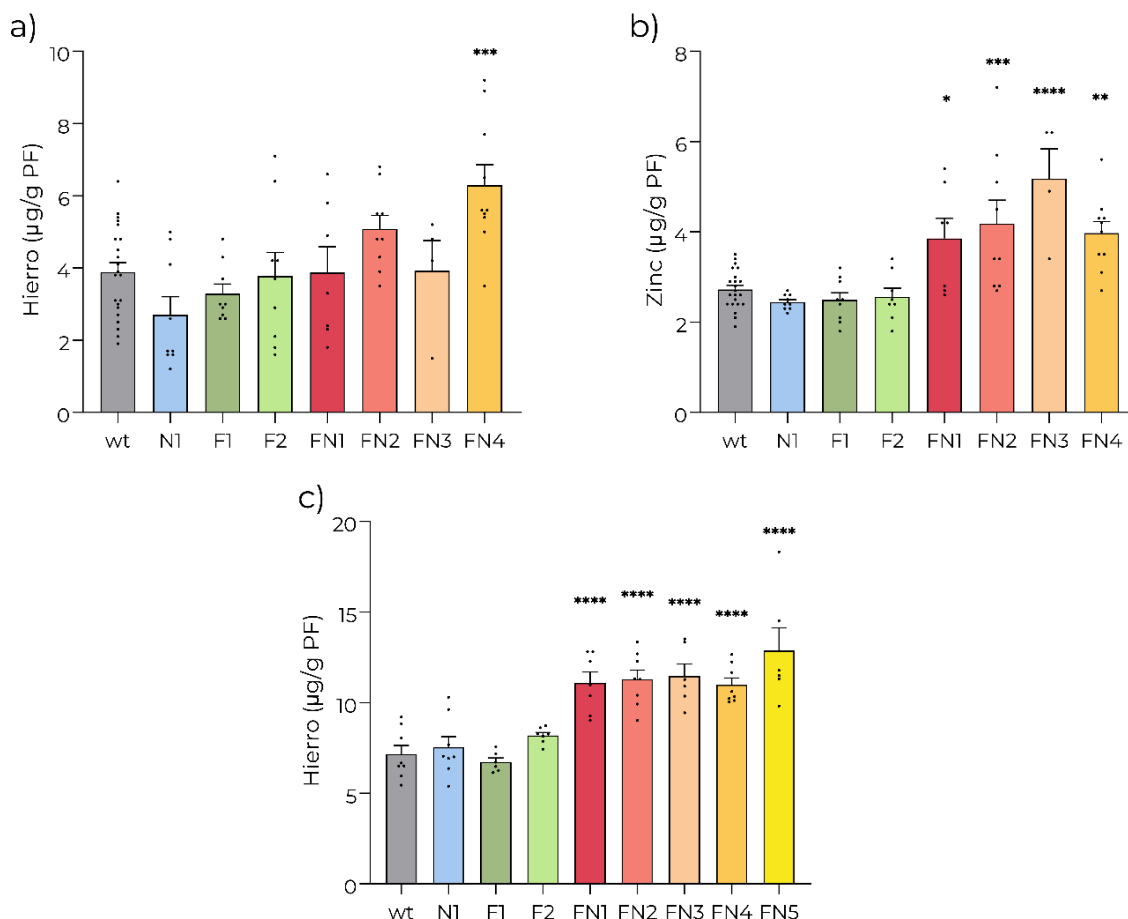


Figura 42. **Contenido de Fe y Zn en tubérculos de todas las líneas de plantas *ex-vitro*.** a) Contenido de Fe analizado por absorción atómica. b) Contenido de Zn determinado por absorción atómica. c) Contenido de Fe en tubérculos analizado por el método de o-fenantrolina. Los resultados graficados en a y b corresponden a 3 cosechas independientes, excepto para la línea FN3 donde solo se trata de 1 cosecha. La figura (c) corresponde a 2 cosechas independientes. En las 3 figuras, el análisis estadístico utilizado fue ANOVA de 1 vía.

En este trabajo se concluye que en ninguno de los casos las líneas simples presentaron un incremento en su contenido de Fe ni de Zn, por lo tanto, esta estrategia sería insuficiente para la biofortificación de los tubérculos. De acuerdo con Zha et al. 2022, la sobreexpresión constitutiva de

AtNAS1 en plantas de papa sería suficiente para incrementar el contenido de Fe en los tubérculos. Visto que en este trabajo se cuenta con solo 1 línea para esta construcción (N1), se debe a futuro realizar más transformaciones para obtener más líneas transgénicas y poder concluir si esta construcción simple basta para incrementar el contenido de Fe y Zn en tubérculos.

Según el análisis por absorción atómica, todas las líneas dobles incrementaron su contenido de Zn entre un 42-90%, pero solo la línea FN4 presenta un aumento significativo del contenido de Fe del 62% (Figura 42 a). En este caso, no se pudo analizar a la línea FN5 debido a que presentaba pocos tubérculos, que no alcanzaban el tamaño de muestra necesario para medirse por este método. Algo similar sucede con la línea FN3, donde solo se pudo obtener tubérculos del tamaño necesario en 1 cosecha, por lo que el número de muestras es menor. En el laboratorio no se cuenta con el equipamiento necesario para realizar estas mediciones, por lo que las muestras fueron analizadas por el laboratorio de servicios analíticos especiales (LabFAUBA). El costo de estas mediciones era elevado, y el contexto de desarrollo de esta tesis no permitió seguir procesando las muestras de esta manera, por lo que se procedió a utilizar el método de o-fenantrolina, una reacción colorimétrica. Este método suele utilizarse para procesar muestras de gran tamaño, utilizando grandes volúmenes de reactivos dificultando su uso con muchas muestras e incrementando su costo (Gupta 1968, Köseoğlu & Açıkgöz 1995, Manzanares et al. 1990, Ibrahim & Yusuf 2015). Es por esto que se realizó una adaptación para poder realizar las mediciones en placa de 96 wells, acelerando los tiempos y mejorando la reproducibilidad de los datos. A través de la medición por el método de o-fenantrolina, se demostró el incremento de Fe de manera significativa en los tubérculos todas las líneas dobles, mientras que las líneas simples permanecieron en niveles similares a la wt (Figura 42 c). El incremento respecto a la wt fue de un 54% para FN4, destacándose la FN5 con un incremento del 80% en su contenido de Fe.

De la misma manera en que se determinó el contenido de Fe en tubérculos, es interesante analizar el contenido de Fe en hojas de las plantas generadas. Si bien la estrategia utilizada dirige el almacenamiento de Fe al tubérculo, el nivel de Fe acumulado en hojas es uno de los parámetros que resta estudiar en detalle. Se intentó evaluar el contenido de Fe en hojas, sin embargo, durante las mediciones no se tuvo en cuenta que los pigmentos de las hojas resultan ser una interferencia en la medición, por lo que la determinación requiere realizar una corrección con el blanco de extracción. Entre los experimentos que resultan de alto interés para entender los mecanismos que subyacen a la restricción del crecimiento en las plantas dobles, creemos que esta determinación es uno de ellos.

Los resultados hasta aquí mostrados provienen de plantas *in-vitro* (Figuras 27 y 30) o *ex-vitro* (Figuras 28, 29 y de la 32 a la 42), pero en todos los casos las plantas estuvieron al menos 15 días creciendo en medio de cultivo MS, donde la velocidad de crecimiento de algunas líneas transgénicas es menor (Figura 30 a). Esto genera que su tamaño sea menor al momento del rusticado, lo que puede estar afectando a los resultados finales ya que no parten de las mismas condiciones iniciales. Asimismo, si bien este modelo de trabajo permite analizar de manera exacta múltiples respuestas fisiológicas de la planta de papa, no es el mecanismo de reproducción que se utiliza en el cultivo de papa, donde el uso de tubérculo semilla es el mecanismo de reproducción utilizado por excelencia.

Análisis de plantas obtenidas a partir de tubérculo

Para evaluar la validez de los datos obtenidos *ex-vitro*, se realizó la siembra de tubérculos en macetas, igualando las condiciones iniciales para las plantas de todas las líneas.

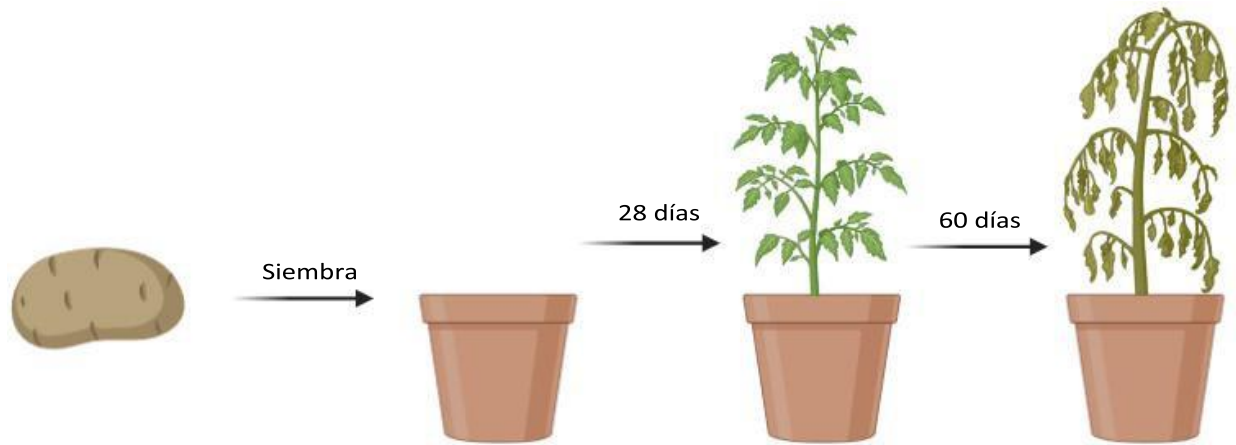


Figura 43. **Diseño experimental para las plantas obtenidas a partir de tubérculos.** Se siembran 3 tubérculos que no se encuentran en dormición profunda en macetas de 1 L con sustrato Klasmann. A los 28 días se analizan diversos parámetros, y luego de su senescencia (aproximadamente 60 días) se cosechan los tubérculos.

En primer lugar, se determinó la altura y el número de hojas de las plantas provenientes de tubérculo a los 28 días del sembrado. Se observó que nuevamente las líneas simples y la FN4 no presentan diferencias respecto de la wt en cuanto a la altura, mientras que las líneas dobles restantes tienen una menor altura (Figura 44 a). Llamativamente, la línea FN4 presentó un mayor número de hojas que las plantas wt mientras que la línea FN1 presentó un menor número de hojas (Figura 44 b). El resto de las líneas transgénicas no presentaron diferencias significativas en cuanto al número de hojas.

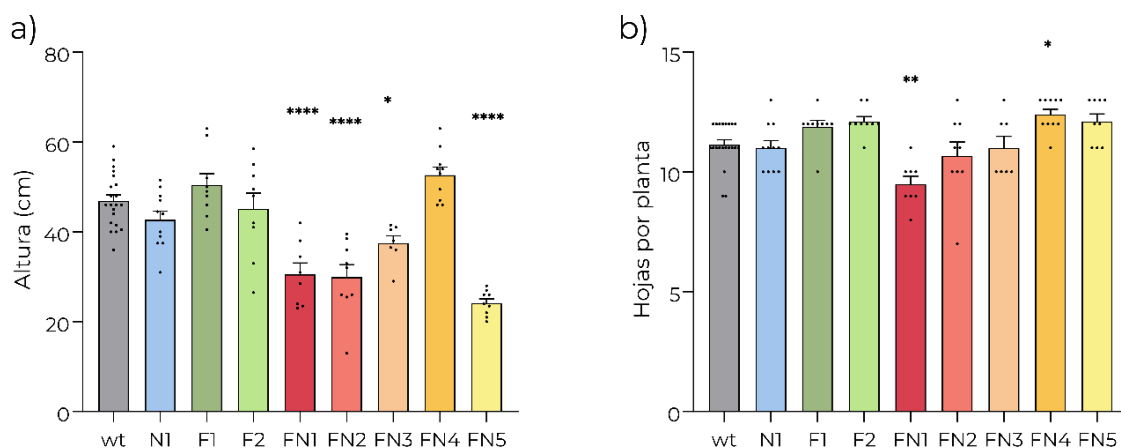


Figura 44. **Análisis del crecimiento del vástago aéreo de plantas obtenidas de tubérculo a los 28 días post sembrado.** a) Altura de las plantas. b) Número de hojas por planta. Los resultados corresponden a 1 cosecha, donde cada punto corresponde a una planta. Los datos fueron analizados por ANOVA de 1 vía.

En el caso de las plantas *ex-vitro*, la menor altura de las plantas de las líneas dobles (excepto FN4) se manifestó acompañada de un menor tamaño de las hojas (Figura 30 a). Con el objetivo de comparar si esto se mantenía en plantas crecidas de tubérculo, se tomó la segunda y tercera hoja desplegada y se cuantificó su tamaño y forma. Nuevamente, las hojas de las líneas FN2, FN3 y FN5 mostraron un menor tamaño (Figura 45 a) y una forma más redondeada (Figura 45 b). Esto último también se observó para la línea FN1.

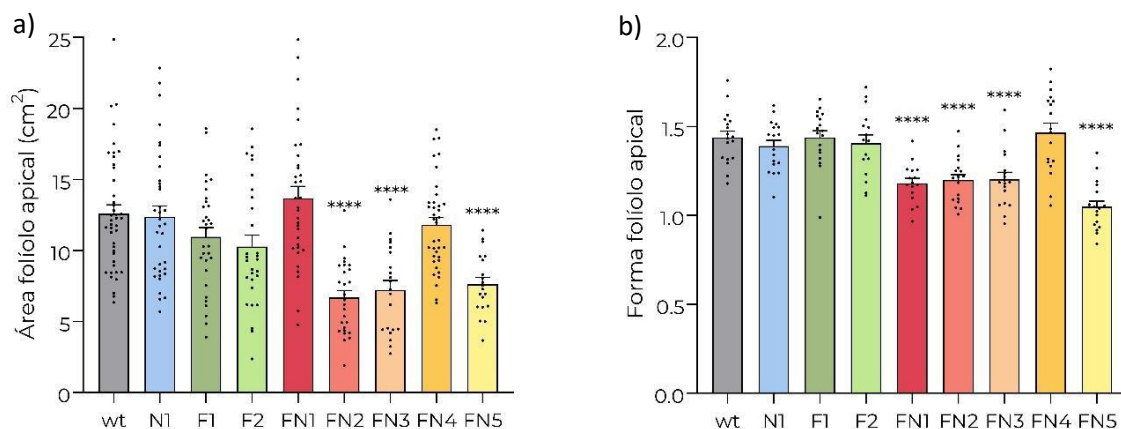


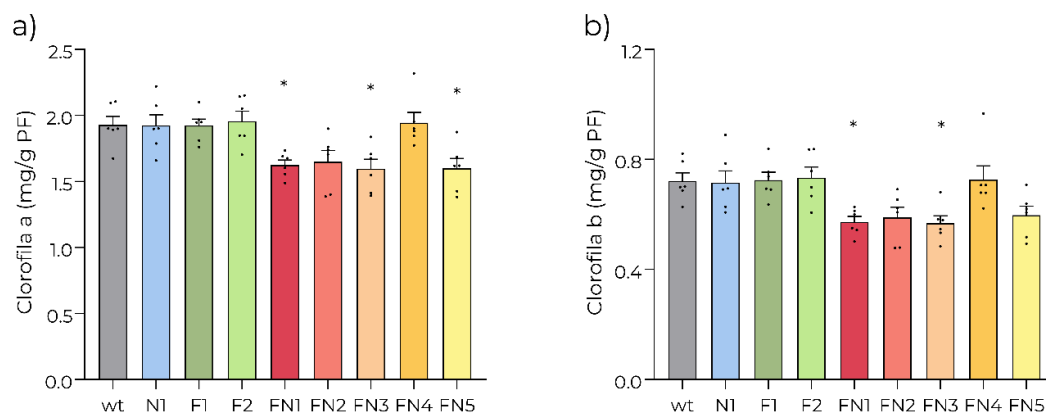
Figura 45. **Tamaño y forma de las hojas de plantas obtenidas a partir de tubérculo.** a) Área del folíolo apical, resultado de 3 cosechas independientes b) Forma del folíolo apical, entendida como el diámetro mayor sobre el diámetro menor, de 2 cosechas independientes. En todos los casos, un punto corresponde a una hoja. Los valores en ambas figuras fueron calculados a través del software ImageJ y analizados estadísticamente mediante ANOVA de 1 vía.

Dado que las diferencias en la altura son similares a las observadas para las plantas *ex-vitro*, podemos decir que este fenotipo no es un artefacto generado por el primer crecimiento *in-vitro* de las plantas o por una diferencia en la altura al momento del rusticado, sino que se debe a que las líneas transgénicas dobles FN1, FN2, FN3 y FN5 presentan un menor crecimiento. De esto se desprende que incorporar una sola de estas construcciones no tendría un impacto en los parámetros morfo-fisiológicos de las plantas o en su contenido de Fe y Zn, mientras que la incorporación de ambas construcciones aumenta el contenido de Fe y Zn en tubérculos en todos los casos, con un impacto negativo en el desarrollo de las plantas y el rendimiento productivo en la mayor parte de los casos. El por qué una de las

cinco líneas dobles no presenta este fenotipo alterado es una respuesta que resulta elusiva, ya que no se encontró relación entre los niveles de expresión de los genes o los niveles de contenido de Fe y los resultados observados, sin embargo, es un experimento que resta encarar con exactitud. Con este fin, se planea a futuro realizar la cuantificación de la expresión en hojas y tubérculos mediante qPCR. Además, se planea cuantificar el contenido de Fe en las hojas, ya que puede haber una alteración en la distribución del Fe en la planta, que podría generar este fenotipo.

Contenido de pigmentos en hojas de plantas de tubérculo

Al igual que con las plantas *ex-vitro*, se procedió a cuantificar el contenido de clorofila en hojas de plantas de 28 días de crecimiento en invernadero. Lo que en las plantas *ex-vitro* era una tendencia no significativa de menor contenido de clorofila, ahora se convirtió en una diferencia estadísticamente significativa para las líneas FN1, FN3 y FN5 en cuanto al menor contenido de clorofila a y total (Figura 46 a y c), siendo además significativo el menor contenido de clorofila b para las líneas FN1 y FN3 (Figura 46 b). En el caso de FN2 la tendencia a menor contenido de pigmentos se mantiene, aunque de manera no significativa respecto a la wt. Nuevamente las líneas simples y la FN4 son similares al control. La relación entre clorofila a y b se mantiene cercana a 2.5 en todos los casos, no viéndose afectada por ninguna de las construcciones utilizadas. Finalmente, el contenido de carotenoides demostró ser significativamente menor solo en el caso de la línea FN5, mientras que en las líneas FN1, FN2 y FN3 presenta una tendencia a un menor contenido, pero que no demostró significancia estadística.



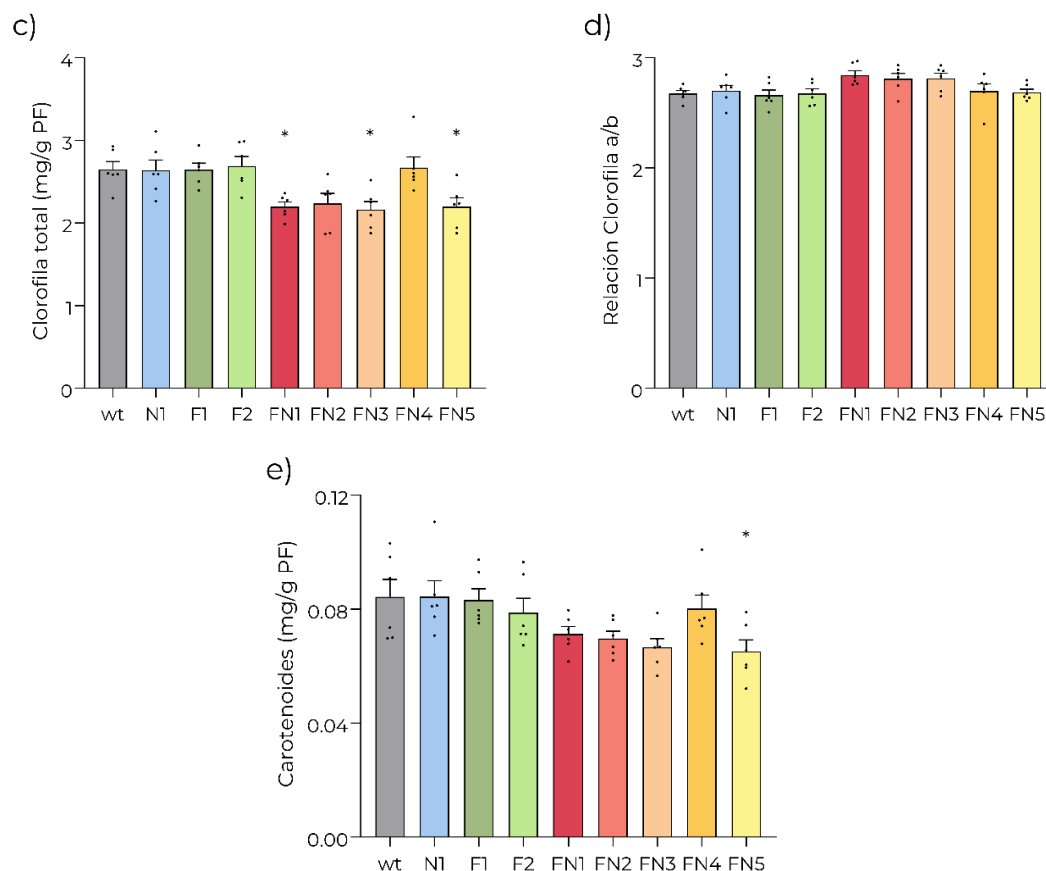


Figura 46. Análisis del contenido de pigmentos en hojas de plantas de tubérculo. Contenido de clorofila a (a), clorofila b (b), clorofila total (c), relación entre clorofila a y b (d), y carotenos (e) en mg/g de peso fresco. En todos los casos los resultados corresponden a plantas de una misma cosecha, y cada punto representa una hoja. El análisis estadístico utilizado fue ANOVA de 1 vía.

Estrés oxidativo en hojas de plantas de tubérculo

Un mayor contenido de Fe en las células puede significar un mayor nivel de estrés oxidativo en las plantas, generado por radicales libres (Connolly & Guerinot 2002, Li et al. 2024). Con el fin de evaluar los niveles de estrés oxidativo, se midieron los niveles de actividad de enzima catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX) en hojas. La CAT se encarga de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, disminuyendo así el estrés oxidativo generado por esta molécula. APX también descompone el peróxido de hidrógeno, pero utilizando como sustrato al ascorbato, generando agua y deshidroascorbato. No se detectaron diferencias significativas en los niveles de actividad de ninguna de las 2 enzimas en ninguna de las líneas, aunque la variabilidad observada es muy alta, en particular en APX (Figura 47).

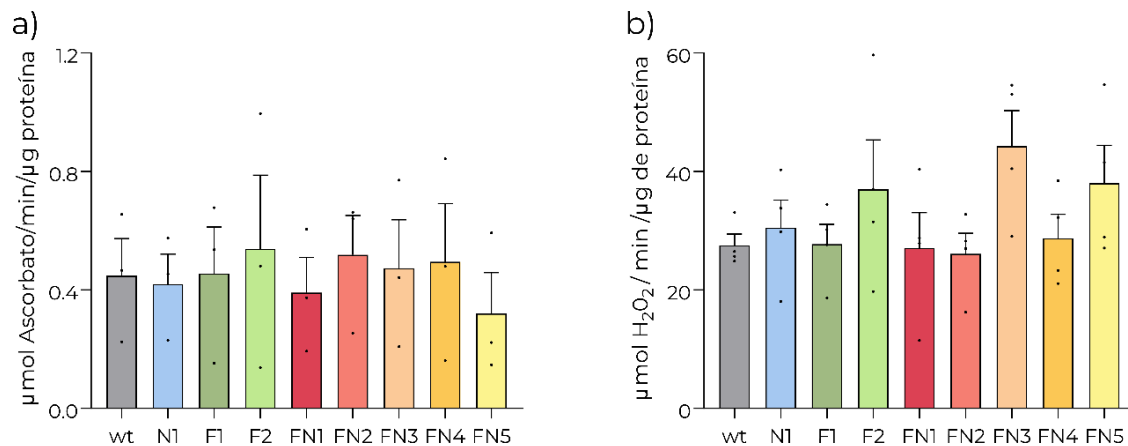


Figura 47. **Actividad de APX y CAT en hojas de plantas de tubérculo.** a) Actividad de APX. b) Actividad de CAT. Se grafican los resultados correspondientes a una misma cosecha, donde cada punto corresponde a una hoja. El análisis estadístico utilizado fue ANOVA de 1 vía.

Retención de agua en hojas de plantas de tubérculo

En plantas *ex-vitro* se observó una mayor pérdida de agua de las hojas de las líneas N1, FN2, FN3 y FN5. Al realizar el mismo experimento utilizando hojas de plantas de tubérculo, no se observaron diferencias entre ninguna de las líneas y la wt (Figuras 48 y 49). Esto se debe probablemente al bajo número de hojas muestreadas, dado que se priorizó su uso para el análisis de CRA, que ya demostró ser más informativo que el de deshidratación en las plantas *ex-vitro*.

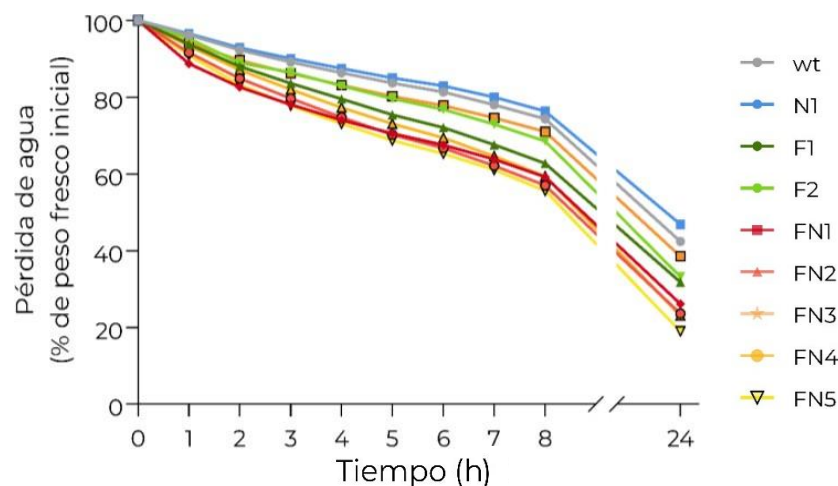
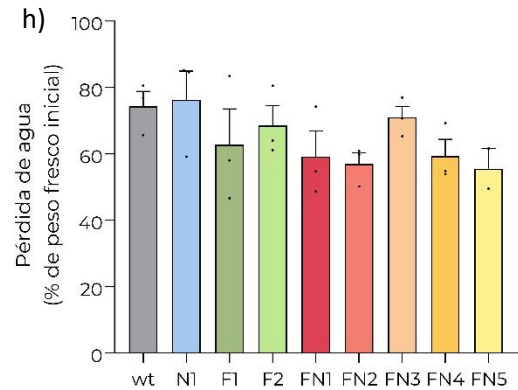
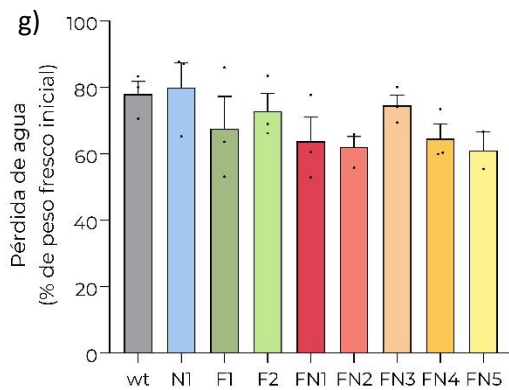
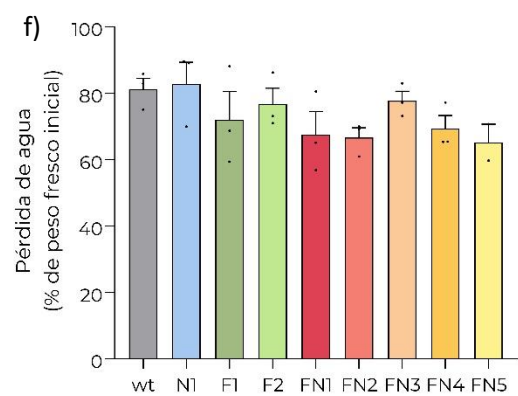
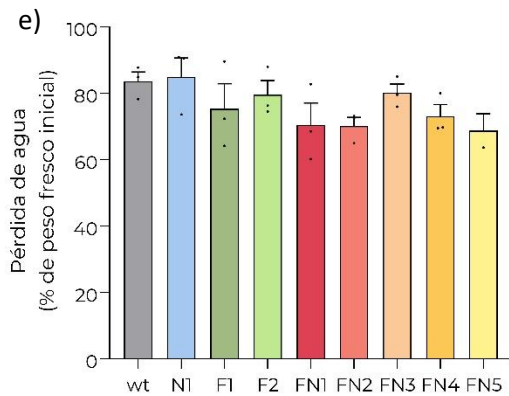
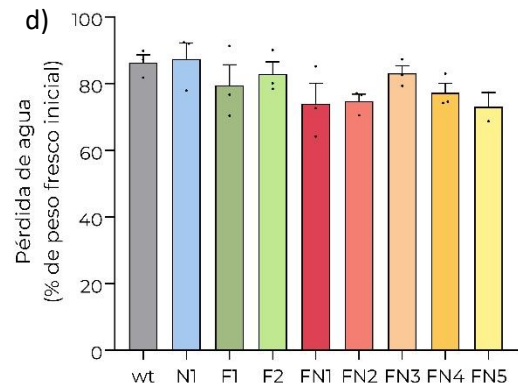
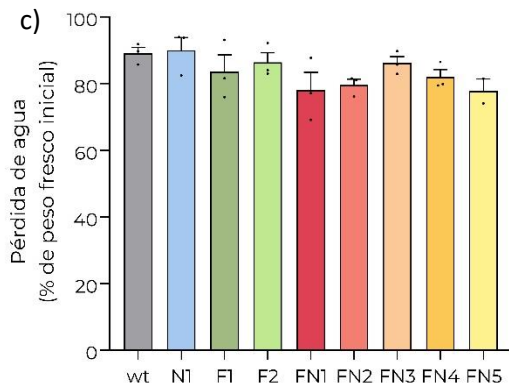
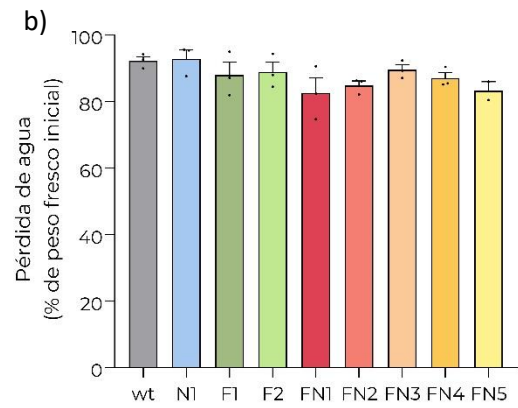
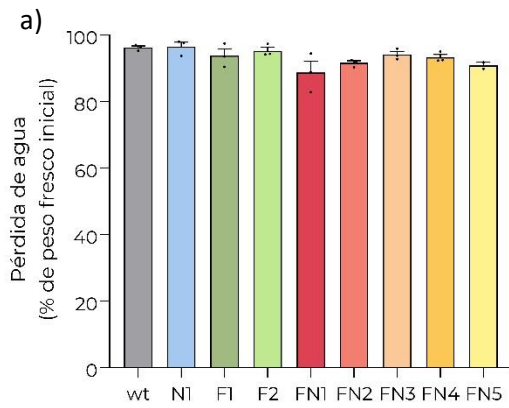


Figura 48. **Pérdida de agua a lo largo del tiempo para hojas de plantas de tubérculo.** El análisis estadístico y el desvío en cada uno de los puntos se encuentran en la figura 49 para una mejor visualización.



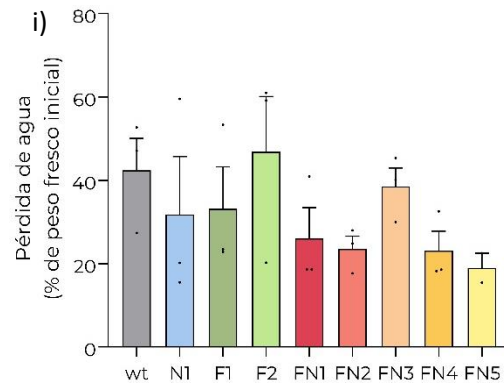


Figura 49. **Pérdida de agua a lo largo del tiempo para hojas de plantas de tubérculo.** Las figuras representan el porcentaje de peso respecto al inicial entre 1 y 8 h (Figuras a-h respectivamente) y a las 24 h (i). Cada punto corresponde a una hoja, proveniente de una sola cosecha, y el análisis estadístico realizado fue ANOVA de 1 vía.

Se observó que a tiempos cortos (Figura 50 y 51 a-c) solo las líneas FN1, FN2 y FN5 presentan un CRA significativamente menor, mientras que a 24 h son las líneas FN1, FN2, FN3 y FN5 las que presentan un menor CRA. Este experimento sugiere que las diferencias en la deshidratación de las líneas N1 y F1 observadas en hojas de plantas *ex-vitro* (Figuras 36 y 37), se deben a un error propio del experimento y no a una alteración en su capacidad de retención de agua.

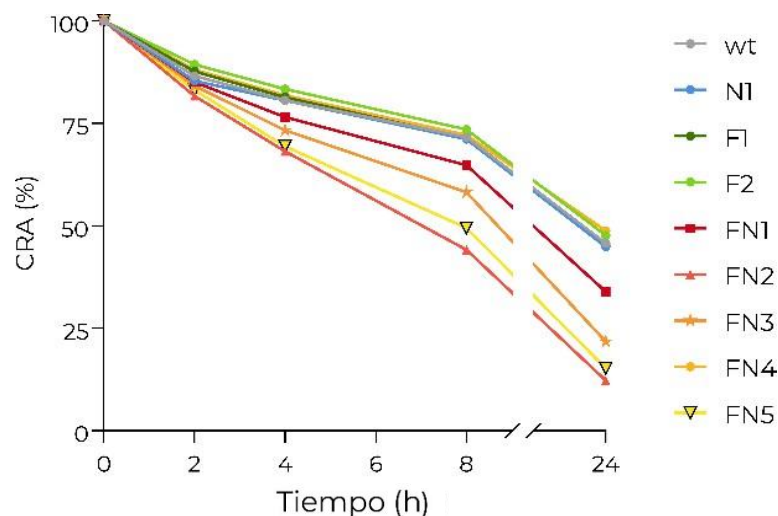


Figura 50. **CRA de hojas de plantas de tubérculo.** Variación en el contenido relativo de agua de hojas a lo largo del tiempo. Por motivos de visualización, el análisis estadístico y el desvío se muestran en la Figura 51. Los datos provienen de 3 cosechas independientes, excepto para 8 h donde se trata de 2 cosechas independientes por un error al momento de la medición.

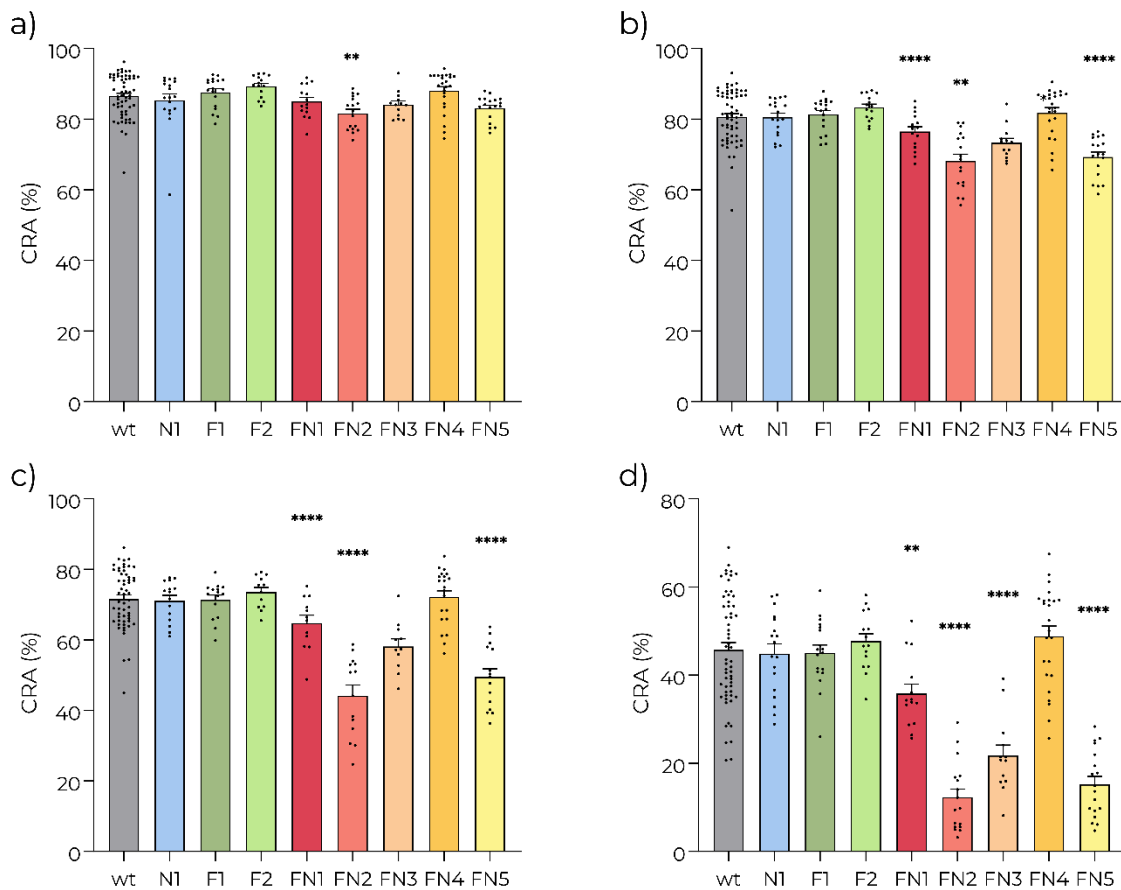


Figura 51. **Contenido relativo de agua de hojas de plantas de tubérculo.** El mismo se determina a las 2 (a), 4 (b) 8 (c) y 24 h (d). Cada punto corresponde a una hoja, basado en 3 cosechas independientes, excepto en (c) que se grafican 2 cosechas independientes. Los datos fueron analizados por ANOVA de 1 vía.

Caracterización de los estomas de plantas obtenidas de tubérculo

Visto que en las plantas *ex-vitro* la mayor pérdida de agua pudo explicarse en parte por la diferencia en el tamaño y distribución de estomas, se procedió a caracterizar a los mismos en plantas de tubérculo. Se observó que las líneas FN2, FN3 y FN5 presentaron un menor índice estomático y estomas de mayor tamaño, y que las últimas dos presentaron además una menor densidad de estomas (Figura 52). Esto permite explicar por qué estas tres líneas pierden una mayor cantidad de agua incluso a tiempos cortos (Figura 51 b), pero no explica las diferencias en el CRA observadas para la línea FN1, ya que esta presenta una mayor pérdida de agua, con características estomáticas similares a la wt.

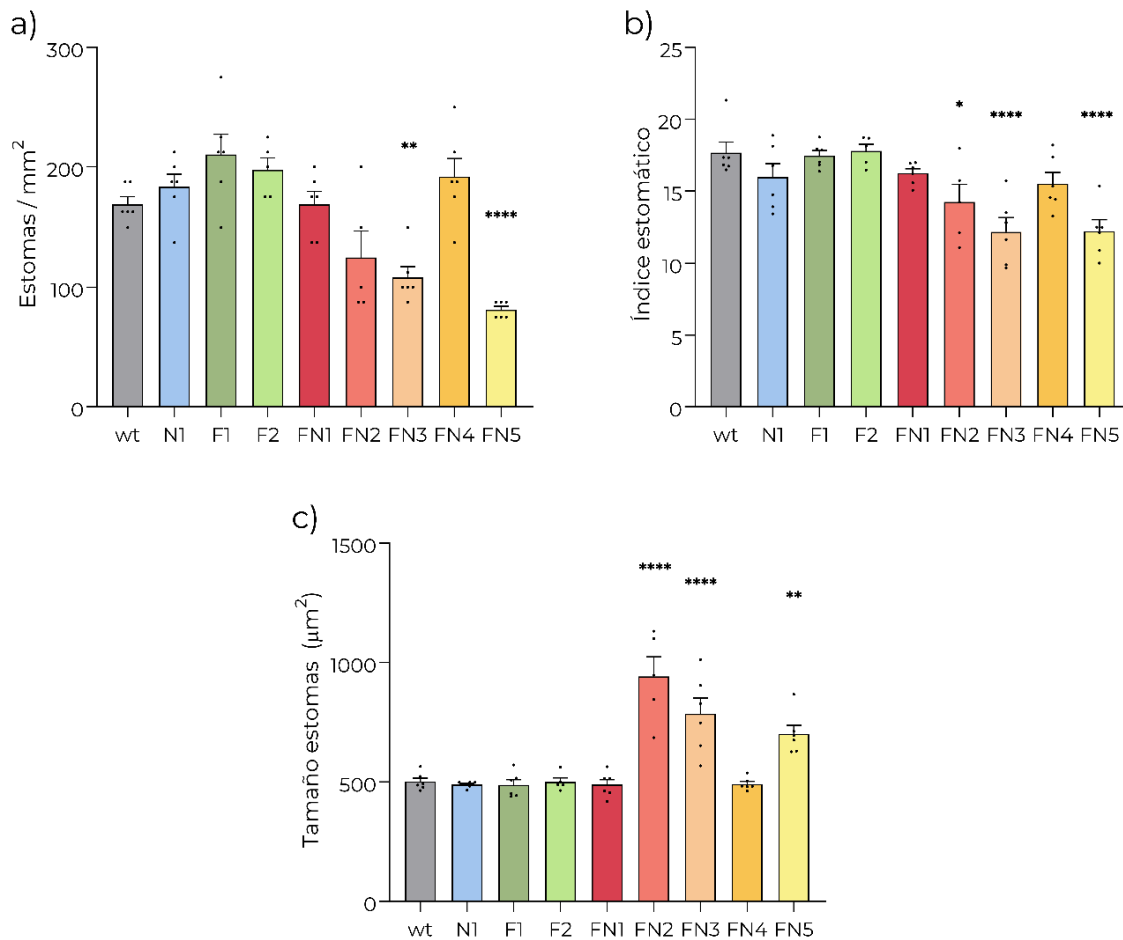


Figura 52. **Caracterización de los estomas de hojas de plantas de tubérculo.** a) Densidad de estomas, entendida como el número de estomas por unidad de área. b) Índice estomático (número de estomas por campo dividido por el total de células). c) Tamaño de los estomas. Los resultados corresponden a 1 cosecha, donde cada punto representa una hoja; datos analizados mediante ANOVA de 1 vía.

Producción de tubérculos de plantas obtenidas de tubérculo

Las líneas FN1, FN2, FN3 y FN5 presentaron diferencias en su crecimiento comparadas a la wt, tanto *ex-vitro*, como en plantas obtenidas a partir de tubérculo. En el primer caso, esto tuvo un esperado impacto en la productividad de estas líneas, por lo que se analizó el rendimiento y las características morfológicas de los tubérculos obtenidos a partir de plantas de tubérculo en invernadero. En estas condiciones se mantuvo la menor productividad de las líneas FN3 y FN5 (Figura 53 a), posiblemente debido a un menor número de tubérculos por planta, ya que ambas líneas presentan menor número de tubérculos que la wt aunque esta diferencia no fue significativa (Figura 53 b). Llamativamente, la forma

de los tubérculos fue diferente del control en las líneas F2, FN1-3 y FN5, a diferencia de lo observado de tubérculos de plantas *ex-vitro*.

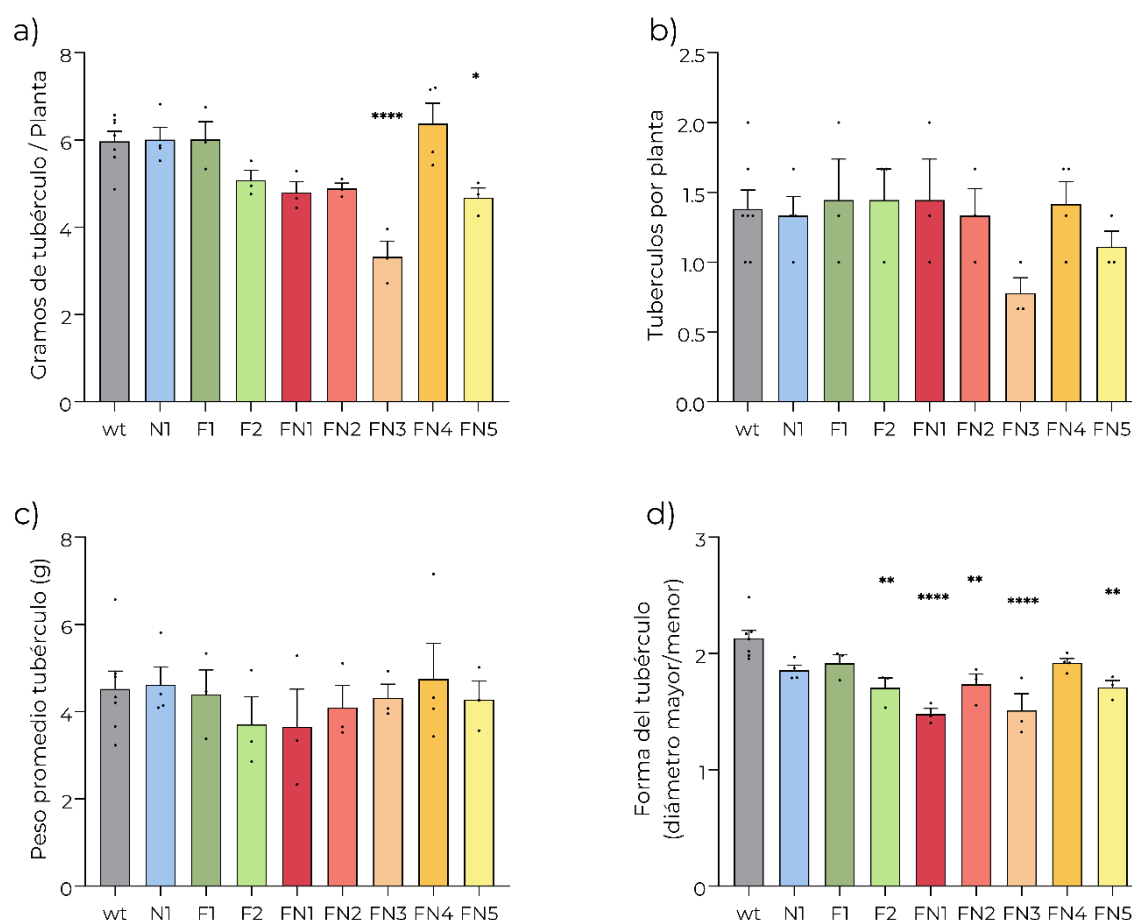


Figura 53. Productividad y forma de los tubérculos en plantas crecidas a partir de tubérculos. gramos (a), número (b) y peso promedio (c) de tubérculos producidos por cada planta. d) Forma de los tubérculos. En todos los casos se trata de una cosecha, y cada punto corresponde al promedio de una maceta, dividido por el número de plantas. El análisis estadístico realizado fue ANOVA de una vía.

Con el fin de realizar una comparación que permita seleccionar la línea transgénica con el fenotipo de mayor potencial como cultivo biofortificado, se condensaron los resultados en la Tabla 4. De acuerdo con la misma, las 3 líneas simples (N1, F1 y F2) no presentaron una mejora del contenido de Fe ni de Zn, por lo que no son cultivos biofortificados. Por otra parte, las 5 líneas dobles (FN1-5) pueden ser consideradas biofortificadas, ya que presentaron un aumento en su contenido de Fe y Zn. Sin embargo, solo la línea FN4 no presentó un impacto en su rendimiento ni en su crecimiento vegetativo, por lo que fue seleccionada para una caracterización en un sustrato de mayor riqueza mineral.

Línea	Genes Introducidos	Contenido de Fe	Contenido de Zn	Crecimiento vegetativo	Rendimiento	Deshidratación
N1	<i>AtNAS1</i>	ns	ns	ns	ns	ns
F1	<i>PvFER</i>	ns	ns	ns	ns	ns
F2	<i>PvFER</i>	ns	ns	ns	ns	ns
FN1	<i>AtNAS1-PvFER</i>	↑	↑	↓	↓	↓
FN2	<i>AtNAS1-PvFER</i>	↑	↑	↓	↓	↓
FN3	<i>AtNAS1-PvFER</i>	↑	↑	↓	↓	↓
FN4	<i>AtNAS1-PvFER</i>	↑	↑	ns	ns	ns
FN5	<i>AtNAS1-PvFER</i>	↑	↑	↓	↓	↓

Tabla 4. Resumen de la caracterización de las líneas transgénicas. ns: diferencias no significativas en comparación con la wt.

Capítulo IV: Evaluación de la línea FN4

Habiendo seleccionado la línea FN4 como la de mayor potencial, se realizaron experimentos en condiciones de mayor similitud a las de campo. Para esto se sembraron tubérculos en macetas grandes (3 L de capacidad) utilizando como sustrato tierra común, similar al que se encuentra en el campo.

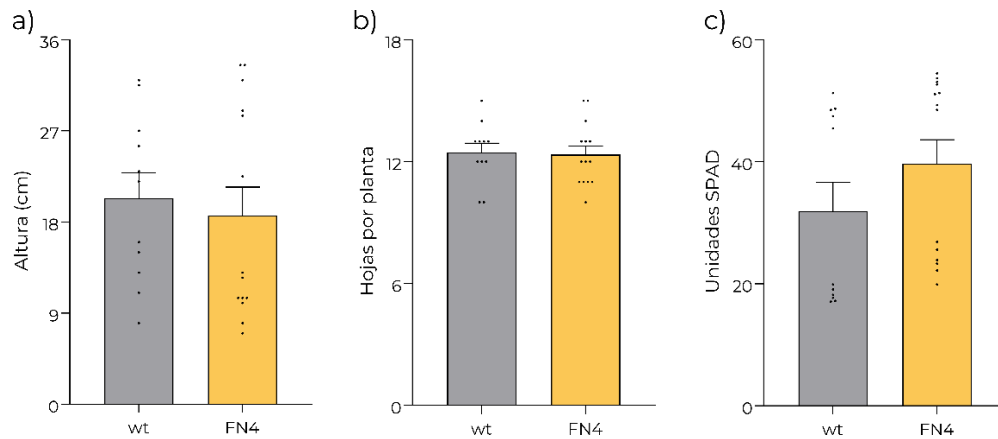


Figura 54. Crecimiento vegetativo y contenido de clorofila de plantas FN4 y wt en macetas de 3 L con tierra común después de 28 días. Altura (a), número de hojas (b) y contenido de clorofila en hojas (c). Los datos provienen de 2 cosechas independientes y fueron analizados estadísticamente mediante la prueba t de Student.

Las plantas de la línea FN4 no presentaron diferencias significativas en altura, número de hojas o contenido de clorofila (Figura 54), siendo indistinguibles de la wt. Resulta llamativa la distribución de los valores de altura y unidades SPAD, que pueden verse agrupados para cada línea en dos nubes. Esto se debe a que los valores fueron muy diferentes para una misma línea entre los dos experimentos, pudiendo deberse esto a haber sido sembrados en diferentes épocas del año.

Rendimiento de FN4 en tierra común

Afortunadamente, esta diferencia entre experimentos no se encuentra al analizar los tubérculos producidos por estas plantas. Al igual que las plantas *ex-vitro*, o las plantas de tubérculo en macetas de 1 L, al cultivar las plantas wt y FN4 en macetas grandes y con tierra común como sustrato no se observaron diferencias significativas en el rendimiento, el número de tubérculos por planta, el peso promedio de los tubérculos o su forma (Figura 55). Esto termina de confirmar que la línea FN4 no presenta una merma en el rendimiento, a pesar de que el resto de las líneas dobles transgénicas sí lo presentan.

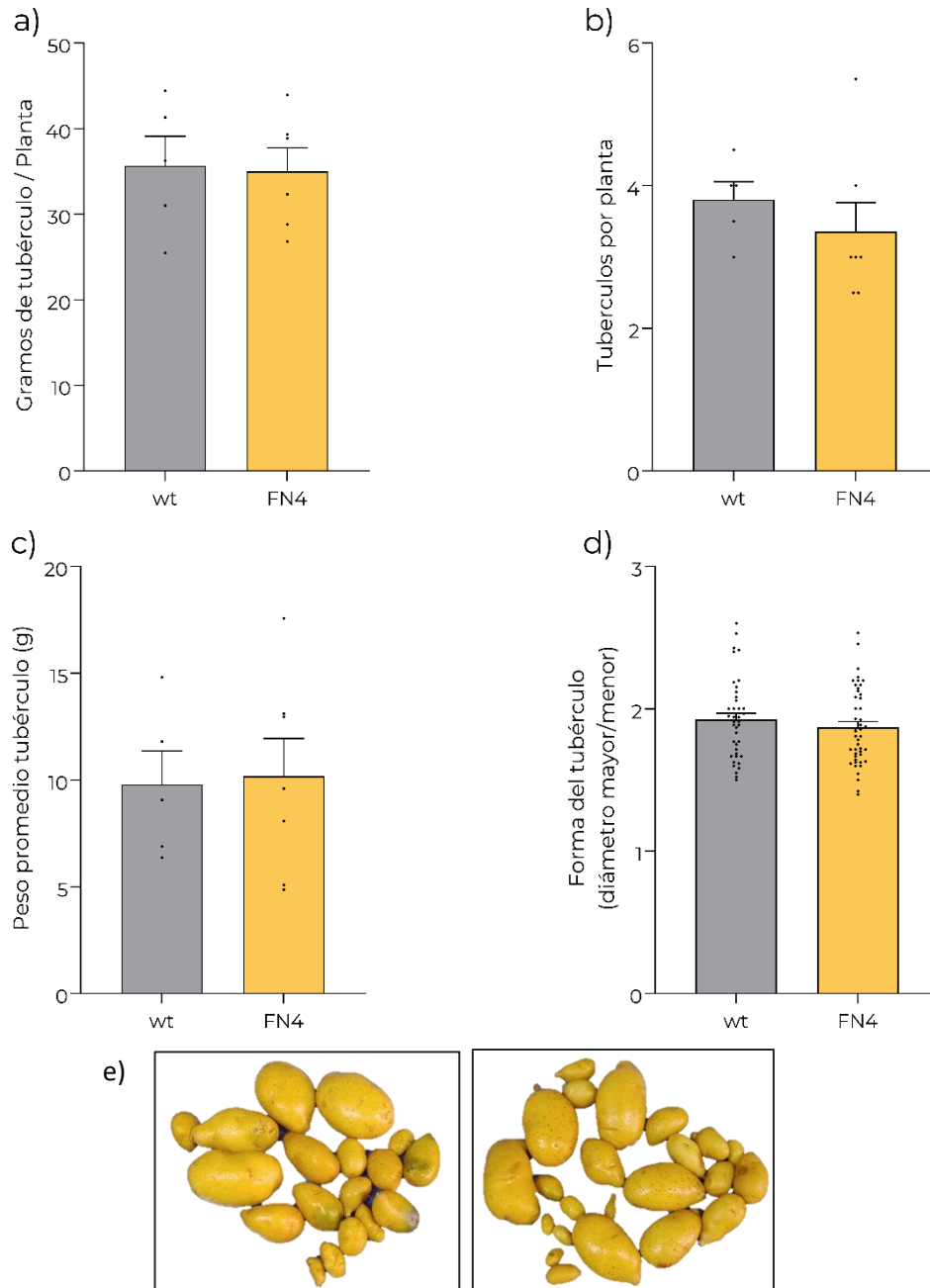


Figura 55. Rendimiento de las plantas y forma de los tubérculos en macetas de 3 L con tierra común como sustrato. a) Gramos de tubérculo producidos por planta, b) número de tubérculos producidos por planta, c) peso promedio de los tubérculos y d) forma de los tubérculos. e) Tubérculos obtenidos en la segunda cosecha, wt (izquierda) y FN4 (derecha). Los resultados provienen de 2 cosechas independientes y cada punto corresponde al promedio obtenido para cada maceta, excepto para la forma de los tubérculos, donde cada punto corresponde a una papa. El análisis estadístico utilizado fue la prueba t de Student.

Contenido de Fe y Zn de tubérculos en tierra común

Aún resta determinar si bajo estas condiciones, poseyendo mayores niveles de micronutrientes en el sustrato, las plantas siguen pudiendo acumular mayores niveles de Fe y Zn en los tubérculos. Con este objetivo, a 6 tubérculos de la línea wt y a 6 tubérculos de la línea FN4 se les analizó el contenido de ambos minerales mediante absorción atómica. Como resultado, se observó un incremento del 111.4% en el contenido de Fe, y del 79.1% en el contenido de Zn de la línea FN4 con respecto a la wt (Figura 56). Esto muestra el alto potencial de esta línea transgénica como alimento biofortificado, y el potencial de la estrategia utilizada.

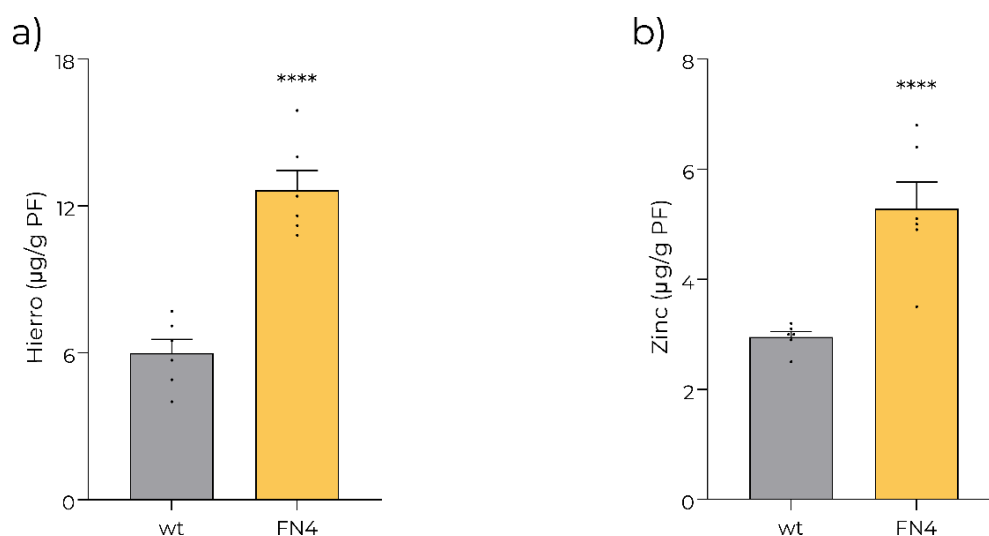


Figura 56. **Contenido de Fe y Zn en tubérculos crecidos en macetas de 3 L con tierra común como sustrato.** Contenido de Fe (a) y Zn (b) relativizado al peso fresco. El resultado corresponde en ambos casos a 6 tubérculos de cada línea, medidos por absorción atómica y analizados estadísticamente mediante la prueba t de Student.

El mayor contenido de Fe en el sustrato llevó a una mayor diferencia en la acumulación de Fe de la línea FN4. Este resultado resulta prometedor, ya que se observa que, al aumentar el Fe del suelo, esta línea podría acumularlo con mayor facilidad. Cabe destacar que los valores de Fe y Zn obtenidos para la wt en este sustrato son similares a los reportados para papas Spunta cultivadas en Argentina (Landeta et al. 2016). Esto sugiere que las condiciones utilizadas son similares a las de campo, al menos en cuanto a la disponibilidad de Zn y Fe, dejando en evidencia el alto potencial de FN4 como alimento biofortificado si se pudiera obtener estos valores en tubérculos sembrados a campo.

Potencial de FN4 como tubérculo biofortificado

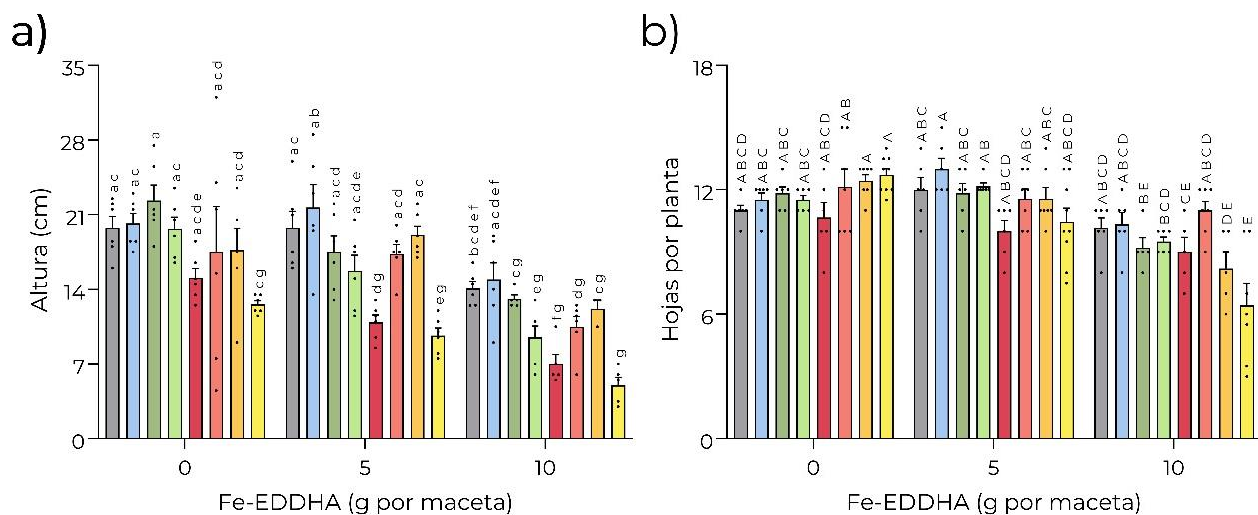
Si tomamos estos valores obtenidos en tierra común para la línea FN4 como los esperados para tubérculos sembrados en el campo, podemos estimar el impacto de reemplazar las papas Spunta por la línea FN4. Para mujeres de 19 a 50 años, se recomienda consumir 18 mg de Fe al día, asumiendo que la absorción típica es del 18% (Instituto de medicina, 2001), lo cual significa que precisan absorber cerca de 3.24 mg de Fe al día. Si se considera una absorción del 28.4% para papas de carne amarilla (Jongstra et al. 2020), una porción de 300 g de papas FN4 (equivalentes al peso de una papa mediana) podría cubrir el 33.3% de la ingesta diaria recomendada (RDA, recommended dietary allowance) de Fe. Además, esta misma porción estaría cubriendo el 19.8% del Zn necesario por día.

Como contexto de esta biofortificación, en el trabajo de Burgos et al. 2007 comparan el contenido de Fe y Zn de diversos cultivares andinos de papa. De acuerdo a sus mediciones, la variedad con mayor contenido de Fe fue Pasma, que presentaba 7.68 µg/g PF, mientras que para FN4 crecida en tierra el contenido fue de 12.65 µg Fe/g PF. En el caso del Zn, la variedad con mayor contenido fue Ayrampo, con 5.06 µg/g PF, mientras que FN4 en tierra contuvo 5.28 µg/g PF. No solo FN4 presentó mayores niveles de ambos minerales que todas las variedades aquí reportadas, sino que lo hace sobre el *background* de la variedad Spunta, que es la de mayor producción en la Argentina.

Capítulo V: Análisis del impacto del incremento de Fe en el sustrato

Habiendo determinado que una mayor abundancia de Fe y Zn en el sustrato permite una mayor acumulación en las plantas FN4 que en las wt, se procedió a analizar el comportamiento de las plantas transgénicas ante distintas cantidades de Fe en el sustrato. Para esto, se rusticaron plantas en sustrato Klasman con el agregado de 0, 5 o 10 g de Fe-EDDHA por maceta.

La altura de las plantas wt no varió significativamente como resultado de los tratamientos, pero sí se observó una reducción de la altura como resultado de los tratamientos en las líneas F1, F2 y FN1 (Figura 57 a). Además, las plantas de la línea FN5 presentaron menor altura que las wt en 5 y 10 g de Fe, mientras que FN1 presentó menor altura solo con 5 g de Fe por maceta. Si analizamos el número de hojas, vemos que las únicas líneas que presentan diferencias son FN4 y FN5, ya que en el tratamiento de 10 g de Fe presentan menos hojas que en otros tratamientos y que la wt en el mismo tratamiento (Figura 57 b). En el caso del contenido de clorofila, se observa que, sin el agregado de Fe en las macetas, las líneas FN3 y FN5 presentan mayor contenido de clorofila, mientras que en 5 g de Fe agregados solo la FN5 mantiene esta diferencia, siendo además la única línea en aumentar significativamente respecto al tratamiento 0 (Figura 57 c). Todas las diferencias con respecto a la wt se pierden al incrementar el Fe a 10 g por maceta, debido al incremento significativo en el contenido de clorofila de la misma. En el caso del rendimiento, no se observaron diferencias para una misma línea entre tratamientos, ni para ninguna de las líneas con respecto a la wt (Figura 57 d). Finalmente, se determinó el contenido de Fe de los tubérculos, observando que nuevamente sin el agregado de Fe en el sustrato las líneas dobles presentan una tendencia a contener mayores niveles de Fe, que en este caso solo fue significativa para FN2 y FN5 (Figura 57 e). Esto probablemente se debió al bajo número de tubérculos medidos y a la alta exigencia del método estadístico aplicado. El tratamiento incrementa significativamente el contenido de Fe de todas las líneas transgénicas, pero no así de la línea wt.



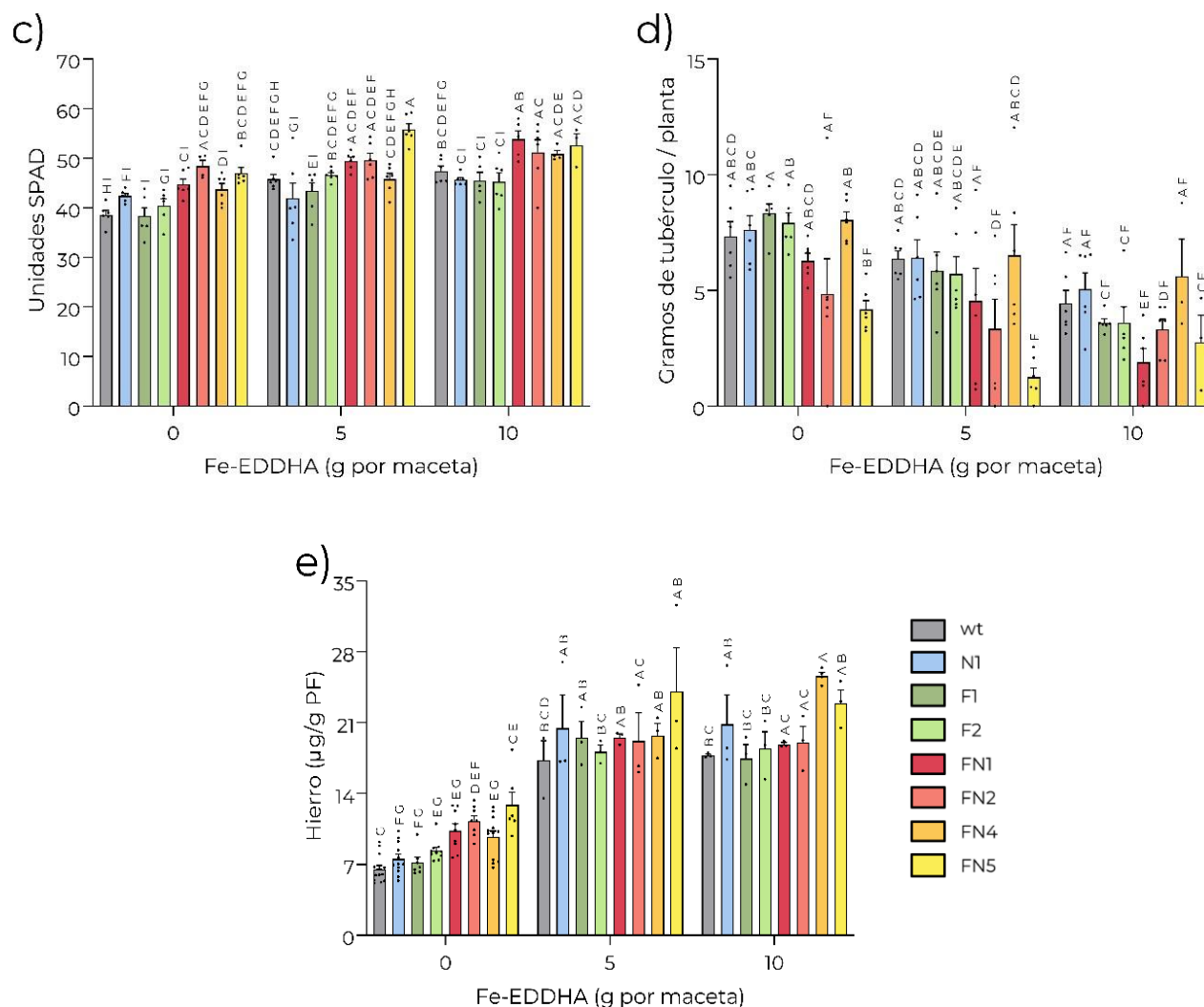


Figura 57. **Desempeño de las plantas transgénicas y control ante el agregado de Fe.** Altura (a), número de hojas (b) y contenido de clorofila (c) de las plantas de todas las líneas a los 28 días. Cada punto corresponde a una planta *ex-vitro*. d) Gramos de tubérculo producidos por planta, en cada tratamiento. e) Contenido de Fe en tubérculos determinados mediante el método de o-fenantrolina. Los datos corresponden a una cosecha, analizados estadísticamente mediante ANOVA de 2 vías. Letras iguales implican que no hay diferencia significativa entre ambas líneas o tratamientos.

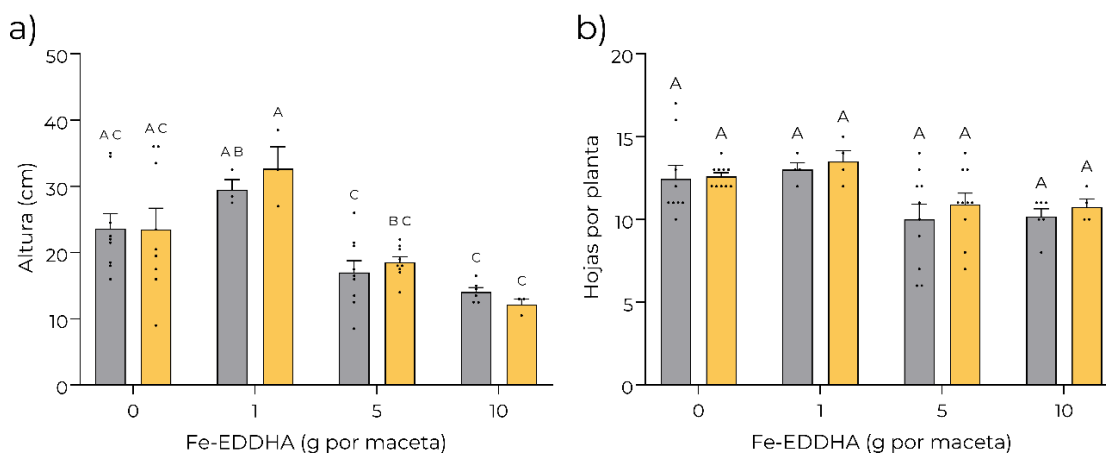
Comportamiento de FN4 ante variaciones en el Fe en el sustrato

Del experimento anterior, se concluye que el tratamiento que consiste en agregar 10 g de Fe es redundante, ya que los resultados observados son similares a los obtenidos con 5 g de Fe, lo que implicaría una saturación del sistema de transporte y almacenamiento de Fe. Por este motivo, decidimos repetir el experimento eliminando este tratamiento e incorporando un nuevo tratamiento intermedio, que consiste

en el agregado de 1 g de Fe-EDDHA por maceta. Como ya se planteó con anterioridad, la línea FN4 presenta el fenotipo de mayor potencial agronómico junto con niveles altos de biofortificación tanto para Fe como para Zn. Por esto, se desea evaluar el comportamiento de esta línea biofortificada en un entorno con niveles bajos, medios y en exceso de Fe (0, 1 y 5 g de Fe-EDDHA agregados por maceta respectivamente).

Analizando la altura de las plantas a los 28 días, se observa que no hay diferencias significativas entre la línea FN4 y la wt en ninguno de los tratamientos, pero las plantas son significativamente más altas al agregar 1 g de Fe que las que tienen 5 o 10 g de Fe (Figura 58 a). Esto permite hipotetizar que el Fe es un recurso limitante del crecimiento en plantas de *S. tuberosum* var. Spunta crecidas en sustrato Klasman TS-1 (Figura 58 a), y que su presencia en altas cantidades resulta un factor detrimental. A su vez, el número de hojas por planta no varió significativamente entre tratamientos ni entre líneas (Figura 58 b). Si se analiza el contenido de clorofila, no se observaron variaciones significativas entre FN4 y wt, pero sí entre tratamientos. Se puede observar que, con 5 g de Fe agregados, la wt incrementa su contenido de clorofila, mientras que, con 10 g de Fe agregados, tanto la wt como FN4 incrementan significativamente su contenido de clorofila (Figura 58 c). Una vez que las plantas fueron cosechadas, se analizó el rendimiento bajo los diferentes tratamientos, no observándose diferencias entre tratamientos ni entre FN4 y wt (Figura 58 d).

Finalmente, se analizó la capacidad de acumular Fe en los tubérculos. Se observó que la línea FN4 presenta mayor contenido de Fe que la wt en 0 g de Fe añadidos, tal como se mostraba en la Figura 42 (a y c). Al añadir 1 o 5 g de Fe al sustrato, tanto la wt como la FN4 incrementan su contenido de Fe (Figura 58 e). En ambos casos, la diferencia entre la línea transgénica y la línea control desaparecen. Sin embargo, al agregar 10 g de Fe al sustrato, la línea wt presenta niveles similares al tratamiento con 5 g de Fe (17 μg Fe/g PF), indicando lo que posiblemente sea un límite de acumulación de Fe en el tubérculo wt. Mientras tanto, la línea FN4 pudo continuar acumulando Fe y llevarlo a niveles de 25 μg Fe/g PF, confirmando que la línea FN4 presenta un sistema de acumulación de Fe más eficiente que las plantas wt (Figura 58 e).



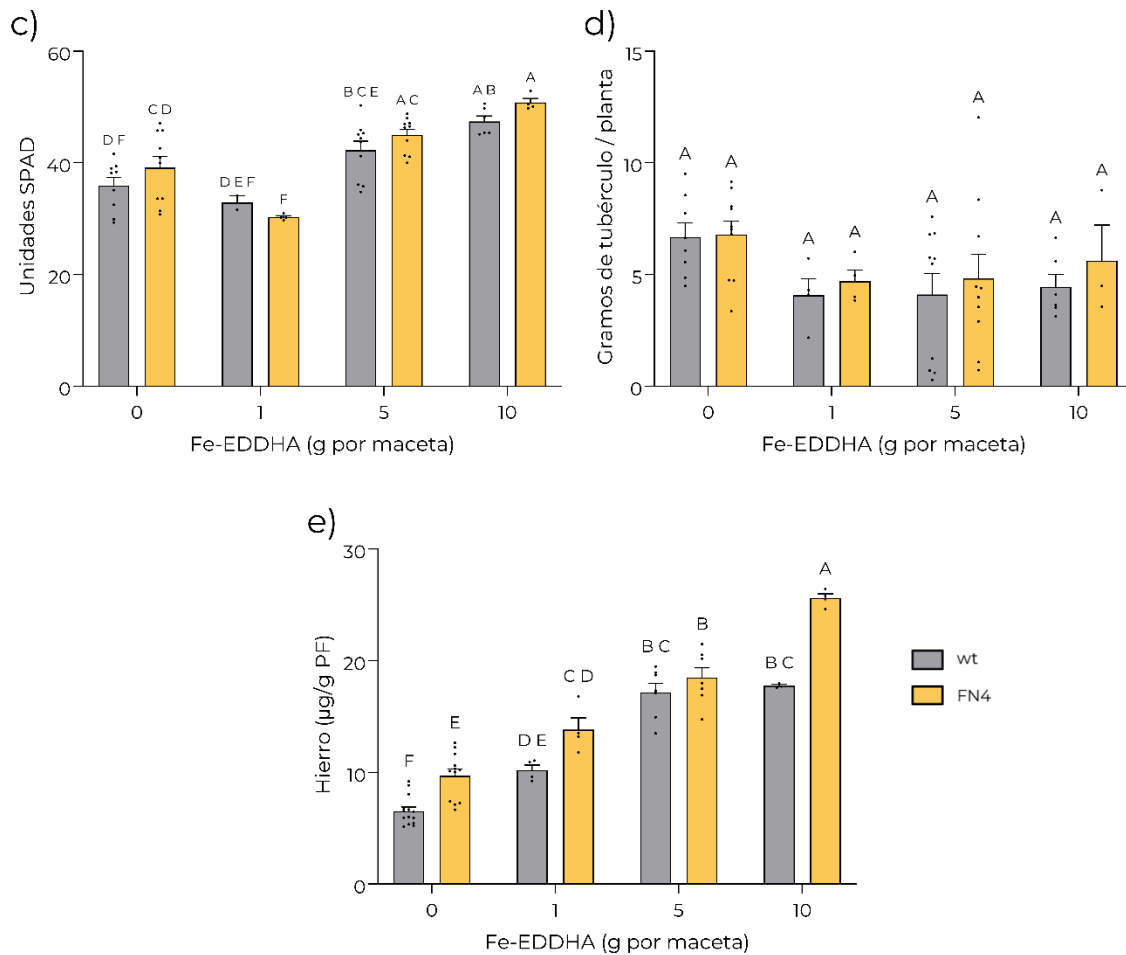


Figura 58. **Caracterización de la respuesta de wt y FN4 a diferentes tratamientos de agregado de Fe-EDDHA.** a) Altura de las plantas a los 28 días. b) Número de hojas de las plantas a los 28 días de tratamiento. c) Contenido de clorofila de las plantas a los 28 días de tratamiento. d) Rendimiento de wt y FN4 luego del tratamiento. e) Contenido de Fe en tubérculos desarrollados bajo diferentes tratamientos, utilizando la técnica de o-fenantrolina. Los resultados corresponden a 2 cosechas independientes para 0 y 5 g de Fe- EDDHA agregado, y 1 sola cosecha para 1 y 10 g de Fe-EDDHA. El análisis estadístico utilizado fue ANOVA de 2 vías.

Conclusiones

La hipótesis de este trabajo fue que la expresión constitutiva del gen *AtNAS1* en plantas de papa junto con la expresión en tubérculos de *PvFER* llevaría a un incremento en el contenido de Fe y Zn en papas. Para lograr esto se desarrollaron 8 líneas transgénicas, de las cuales 1 corresponde a una planta que sobreexpresa *AtNAS1* de manera constitutiva (N1), 2 líneas expresan *PvFER* de manera específica en tubérculo (F1 y F2) y 5 líneas contienen ambas construcciones (FN1-5). Solo estas últimas presentaron un contenido elevado de Fe y Zn en tubérculos, lo cual comprueba la hipótesis inicial y demuestra que la expresión de ambos genes es necesaria para la biofortificación de papas Spunta. Un estudio reciente (Zha et al. 2022) mostró que la expresión constitutiva de *AtNAS1* en plantas de *S. tuberosum* var. Desirée fue suficiente para incrementar el Fe en tubérculos. Similar es el reporte de Nozoye et al. 2017 para plantas de *Ipomoea batatas*, donde la sobreexpresión de *HvNASs1* incrementó la tolerancia a suelos pobres en Fe. La línea N1 generada en este trabajo no mostró diferencias en el contenido de Fe ni de Zn, pero para poder obtener conclusiones más robustas deben generarse más líneas transgénicas que expresen *AtNAS1* de manera constitutiva.

En este trabajo se determinó que la coexpresión de ambas construcciones tuvo efectos negativos tanto en el crecimiento de las plantas como en la producción de tubérculos. Se demostró además que afecta particularmente a las hojas, ya que las mismas no solo son de menor tamaño, sino que además tienen una menor capacidad de retención de agua. Probablemente la menor capacidad de retener agua de estas hojas se deba a problemas en su desarrollo estomático, ya que presentan menos estomas con un mayor tamaño. Se vio afectado negativamente el contenido de clorofila en las líneas FN1, FN3 y FN5. Lo destacable, y la razón por la que es recomendable tener múltiples líneas transgénicas para una misma construcción, es que una de las líneas, FN4, no presentó alteraciones en ninguno de estos parámetros, siendo indistinguible de la wt tanto en crecimiento vegetativo como en producción de tubérculos, retención de agua, contenido de pigmentos y desarrollo de estomas. En ninguna de las líneas generadas en este trabajo se detectaron alteraciones en la calidad de procesamiento de los tubérculos, ya que todos presentaron un porcentaje de peso seco equivalente al de la wt, y niveles similares de almidón, azúcares reductores y proteína.

Los tubérculos de la línea FN4 mostraron una mayor capacidad de acumular Fe bajo condiciones de mayor disponibilidad del mismo en el sustrato, sin afectar el rendimiento del cultivo. Al ser crecida en un sustrato similar al encontrado en el campo, esta línea presenta un incremento de 2.1 y 1.8 veces en el contenido de Fe y Zn, respectivamente, en el tubérculo, sin una penalidad en el rendimiento. Se demostró además que esta acumulación depende del contenido de Fe del sustrato, por lo que cuando se evalúan estrategias de biofortificación es importante utilizar diversos sustratos para poder llegar a conclusiones válidas.

La línea FN4 puede ser una importante fuente de Fe y Zn en la nutrición de las personas. Para mujeres de entre 19 y 50 años, una papa de tamaño promedio (300 g) de esta línea, puede aportar hasta el 33.3% del requerimiento diario de Fe, y el 19.8% del Zn. Estos valores son superiores a los reportados para distintas variedades de papas, por lo que la variedad FN4 resulta prometedora en la lucha contra la malnutrición y la anemia, mejorando la salud de la población.

Experimentos a futuro

Creemos que resultaría interesante conocer el contenido de Fe en las hojas, para estudiar la distribución de este mineral en condiciones de saturación. De la misma manera, evaluar la respuesta de las plantas en condiciones de escasas de Fe en el suelo, es un tema pendiente de este trabajo. Se intentó limitar la disponibilidad de Fe del sustrato a través del agregado de cal al mismo. Al aumentar el pH del suelo, disminuye la disponibilidad del Fe, lo que limita el acceso al mineral desde la planta. Los intentos realizados en este sentido no lograron un aumento estable del pH del sustrato, por lo cual solo se pudo estudiar condiciones de aumento de Fe a partir del sustrato de menor riqueza mineral con el que trabajamos (Klassmann TS-1). El sistema de hidroponia o el acceso a suelos calcáreos son alternativas que esperamos explorar.

Se planea estudiar la respuesta de estas plantas transgénicas a estrés biótico. Se realizó un análisis basado en datos de RNA-SEQ disponibles en SpudDB, y se concluyó que la infección con *P. infestans* incrementó los valores de expresión de *StFER1* y *StFER2* en hojas, sin un cambio en *StFER3* y *StNAS1* (Figura 59). Estos resultados coinciden con lo reportado por García Mata et al. (2001), donde se postula que este aumento en *StFER1* permite un quelado del Fe para disminuir la disponibilidad de este para el patógeno. Esto plantea el interrogante de si la sobreexpresión heteróloga de *PvFER* en plantas de papa puede afectar su resistencia a *P. infestans*, y son experimentos que se planea realizar en el futuro próximo.

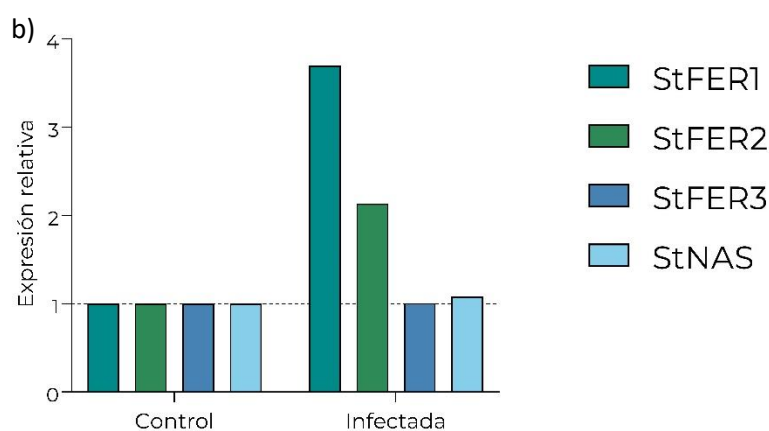


Figura 59. **Expresión relativa de genes endógenos en condiciones control, o infección por *P. infestans*.** Análisis realizado utilizando bases de datos públicas presentes en SpudDB, donde se observa un aumento de la expresión de *StFER1* y *StFER2* en hojas en respuesta a *P. infestans*.

Bibliografía

Abeyá E., Durán P., Mangialavori G., Biglieri A., Kogan L. (2007), Encuesta Nacional de Nutrición y Salud, Documento de resultados publicado por el Ministerio de salud, Presidencia de la Nación Argentina.

Aebi H. (1984), Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126.

Agrawal S., Kumar A., Gupta Y., Trivedi A. (2024), Potato Biofortification: A Systematic Literature Review on Biotechnological Innovations of Potato for Enhanced Nutrition. *Horticulturae*, 10, 292.

Alloway B.J. (2004) Zinc in soils and crop nutrition. *International Zinc Association*, Bruselas

Alloway B.J. (2008) Zinc in soils and crop nutrition, segunda edición. *International Zinc Association and International Fertilizer Industry Association*, Bruselas.

Anderson GJ, Frazer DM (2017), Current understanding of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr.*;106(Suppl 6):1559S-1566S.

Arnon D. I. (1949), Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. *Plant Physiology*, 24(1), 1–15.

Barrell P. J., Yongjin S., Cooper P. A., Conner A. J. (2002), Alternative selectable markers for potato transformation using minimal T-DNA vectors. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 70 61–68.

Becker R., Fritz E., Manteuffel R. (1995), Subcellular Localization and Characterization of Excessive Iron in the Nicotianamine-less Tomato Mutant chloronerva. *Plant Physiology*, Volume 108, Issue 1, Pages 269–275.

Bhowmik D., Kumar S. (2010), A potential medicinal importance of zinc in human health and chronic. *Int. J. Pharm. BioMed. Sci.* 1, 5–11

Black R.E., Allen L.H., Bhutta Z.A., Caulfield L.E., de Onis M., Ezzati M., Colin M., Rivera J. (2008), Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet* 371, 243–260.

Bonierbale M.W., Amoros W.R., Salas E., de Jong W. (2020), Potato breeding. *The potato crop: Its agricultural, nutritional and social contribution to humankind*, 163-217.

Boonyaves K., Wu T.Y., Gruissem W., Bhullar N.K. (2017), Enhanced Grain Iron Levels in Rice Expressing an IRON-REGULATED METAL TRANSPORTER, NICOTIANAMINE SYNTHASE, and FERRITIN Gene Cassette. *Front Plant Sci.* 7;8:130.

Bouis H.E., Saltzman A. (2017), Improving nutrition through biofortification: A review of evidence from HarvestPlus, 2003 through 2016. *Global Food Security.* 12 49-58.

Bradford M.M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254.

Brown P.T., Lange F.D., Kranz E., Lorz H. (1993), Analysis of single protoplasts and regenerated plants by

PCR and RAPD technology. *Molec. Gen. Genet.* 237, 311–317.

Buděšínský M., Budzikiewicz H., Procházka Ž., Ripperger H., Römer A., Scholz G., Schreiber K. (1980), Nicotianamine, a possible phytosiderophore of general occurrence. *Phytochemistry* 19, 2295–2297.

Burgos G., Amoros W., Morote M., Stangoulis J., Bonierbale M. (2007), Iron and zinc concentration of native Andean potato cultivars from a human nutrition perspective. *J. Sci. Food Agric.*, 87: 668–675.

Calayugan M. I. C., Mallikarjuna Swamy B. P., Thanh Nha C., Palanog A. D., Biswas P. S., Descalsota- Empleo G. I., Myat Min Y.M., Inabangan-Asilo M.A. (2021), Zinc-biofortified rice: a sustainable food- based product for fighting zinc malnutrition. *Rice improvement physiological, molecular breeding and genetic perspectives*. pp. 449–470.

Castaigns L, Caquot A, Loubet S, Curie C. (2016), The high-affinity metal Transporters NRAMP1 and IRT1 Team up to Take up Iron under Sufficient Metal Provision. *Sci Rep.* 16;6:37222.

Chakraborty S., Chakraborty N., Agrawal L., Ghosh S., Narula K., Shekhar S., Naik P.S., Pande P.C., Chakraborti S.K., Datta A. (2010), Next-generation protein-rich potato expressing the seed protein gene AmA1 is a result of proteome rebalancing in transgenic tuber. *Proc Natl Acad Sci USA*;107(41):17533–8.

Chao, Z. F., Chao, D. Y. (2022). Similarities and differences in iron homeostasis strategies between graminaceous and nongraminaceous plants. *New Phytologist*, 236(5), 1655–1660.

Cheng L., Wang F., Shou H., Huang F., Zheng L., He F., Li J., Zhao F.J., Ueno D., Ma J.F., Wu P. (2007), Mutation in Nicotianamine Aminotransferase Stimulated the Fe(II) Acquisition System and Led to Iron Accumulation in Rice. *Plant Physiology*, Volumen 145, 4:1647–1657.

Connolly E.L., Campbell N.H., Grotz N., Prichard C.L., Guerinot M.L. (2003), Overexpression of the FRO2 Ferric Chelate Reductase Confers Tolerance to Growth on Low Iron and Uncovers Posttranscriptional Control. *Plant Physiology*, Volume 133, Issue 3, Pages 1102–1110.

Connolly E.L., Guerinot M. (2002), Iron stress in plants. *Genome Biol.*;3(8): REVIEWS1024.

De Lepeleire J., Strobbe S., Verstraete J., Blancquaert D., Ambach L., Visser R.G.F., Stove C., Van Der Straeten D. (2018), Folate Biofortification of Potato by Tuber-Specific Expression of Four Folate Biosynthesis Genes. *Mol Plant*. 11(1):175–188.

De Moura F.F., Moursi M., Donahue A.M., Angeles-Agdeppa I., Atmarita A., Gironella G.M., Muslimatun S., Carriquiry A. (2016) Biofortified β -carotene rice improves vitamin A intake and reduces the prevalence of inadequacy among women and young children in a simulated analysis in Bangladesh, Indonesia, and the Philippines. *Am J Clin Nutr.* 104(3):769–75.

European Cultivated Potato Database, Potato varieties: Spunta.
<https://www.europotato.org/varieties/view/Spunta-E>.

Ewing E.E., Struik, P. C. (1992), Tuber formation in the potato: induction, initiation and growth. *Horticultural Reviews*, 14, 89-198.

FAO (1996), *Informe de la Cumbre Mundial sobre la Alimentación*. Roma. Recuperado de <https://www.fao.org/3/w3548s/w3548s00.htm>

FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO (2022), The State of Food Security and Nutrition in the World 2022. Repurposing food and agricultural policies to make healthy diets more affordable. Rome, FAO.

FAO (2023). Datos correspondientes al 2023, obtenidos a través de FAOSTAT, accesible a través de <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>

Finkelstein J.L., Mehta S., Udipi S.A., Ghugre P.S., Luna S.V., Wenger M.J., Murray-Kolb L.E., Przybyszewski E.M., Haas J.D. (2015), A Randomized Trial of Iron-Biofortified Pearl Millet in School Children in India. *J Nutr* 145:1576–81.

Fourcroy P., Tissot N., Gaymard F., Briat J.F., Dubos C., (2016) Facilitated Fe nutrition by phenolic compounds excreted by the Arabidopsis ABCG37/PDR9 transporter requires the IRT1/FRO2 high-affinity root Fe²⁺ transport system. *Mol Plant* 9: 485–488.

Franks P.J., Farquhar G.D. (2007), The Mechanical Diversity of Stomata and Its Significance in Gas-Exchange Control. *Plant Physiology*, Volumen 143, Issue 1, 78–87.

Fuqua B.K., Vulpe C.D., Anderson G.J. (2012), Intestinal iron absorption. *J Trace Elem Med Biol.*;26(2-3):115-9.

Gammoh N. Z., Rink L. (2017), Zinc in infection and inflammation. *Nutrients* 9 (6), 624.

Ganz T., Nemeth E. (2012), Iron metabolism: interactions with normal and disordered erythropoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2(5):a011668.

García Mata C., Lamattina L., Cassia R.O. (2001), Involvement of Iron and Ferritin in the Potato–Phytophthora infestans Interaction. *European Journal of Plant Pathology* 107, 557–562.

Gautam C.K., Tsai H.H., Schmidt W. (2021), IRONMAN tunes responses to iron deficiency in concert with environmental pH. *Plant Physiol.* 187(3):1728-1745.

Gómez-Galera S., Rojas E., Sudhakar D., Zhu C., Pelacho A.M., Capell T., Christou P. (2010), Critical evaluation of strategies for mineral fortification of staple food crops. *Transgenic Res.* 19(2):165-80.

Gregorio G.B., Senadhira D., Htut H., Graham R.D. (2000) Breeding for Trace Mineral Density in Rice. *Food and Nutrition Bulletin.* 21(4):382-386.

Gross, J., Stein, R. J., Fett-Neto, A. G., Fett, J. P. (2003), Iron homeostasis related genes in rice. *Genet. Mol. Biol.* 26, 477–497.

Gupta U.C. (1968) Studies on the O-phenanthroline method for determining iron in plant materials. *Plant Soil* 28, 298–305.

Haas J.D., Luna S.V., Lung'aho M.G., Wenger M.J., Murray-Kolb L.E., Beebe S., Gahutu J.B., Egli I.M. (2016), Consuming Iron Biofortified Beans Increases Iron Status in Rwandan Women after 128 Days in a Randomized Controlled Feeding Trial. *J Nutr* 146:1586–92

Hafeez B., Khanif Y.M., Saleem M. (2013), “Role of Zinc in Plant Nutrition- A Review”. *Journal of Experimental Agriculture International* 3 (2):374-91.

Hajdukiewicz P., Svab Z., Maliga P., (1994) The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant mol. Biol.*, 25:989-994.

Herbik A., Koch G., Mock H.P., Dushkov D., Czihal A., Thielmann J., Stephan U.W., Bäumlein H. (1999), Isolation, characterization and cDNA cloning of nicotianamine synthase from barley. A key enzyme for iron homeostasis in plants. *Eur J Biochem.* 1999 Oct 1;265(1):231-9.

Higuchi, K., Watanabe, S., Takahashi, M., Kawasaki, S., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K. and Mori, S. (2001), Nicotianamine synthase gene expression differs in barley and rice under Fe-deficient conditions. *The Plant Journal*, 25: 159-167.

Ibrahim I.A.A. & Yusuf A.J. (2015) Quantitative determination of iron and folic acid in *Lactuca sativa* (Lettuce) plant. *Adv. In Applied Science Research* 6(7):112-115

Inoue H., Kobayashi T., Nozoye T., Takahashi M., Kakei Y., Suzuki K., Nakazono M., Nakanishi H., Mori S., Nishizawa N.K. (2009), Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron(III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. *J Biol Chem.* 284(6):3470-9.

Inoue H., Nojima H., Okayama H. (1990), High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. ;96(1):23-8.

Ishimaru, Y., Bashir, K., Nakanishi, H., Nishizawa, N. K. (2012). OsNRAMP5, a major player for constitutive iron and manganese uptake in rice. *Plant Signaling & Behavior*, 7(7), 763–766.

Iyigun M., Nunn N., Qian N. (2017), The Long-run Effects of Agricultural Productivity on Conflict 1400-1900, *NBER*.

Jackson S.D. (1999), Multiple Signaling Pathways Control Tuber Induction in Potato. *Plant Physiology*, Volumen 119, 1:1–8,

Johnson AA, Kyriacou B, Callahan DL, Carruthers L, Stangoulis J, Lombi E, Tester M. (2011), Constitutive overexpression of the OsNAS gene family reveals single-gene strategies for effective iron- and zinc-biofortification of rice endosperm. *PLoS One*. 2011;6(9):e24476.

Jones J.D.G., Shlumukov L., Carland F., English J., Scofield S.R., Bishop G.J., Harrison K. (1992) Effective vectors for transformation, expression of heterologous genes, and assaying transposon excision in transgenic plants. *Transgenic Research* 1, 285–297.

Jongstra R., Mwangi M.N., Burgos G., Zeder C., Low J.W., Mzembe G., Liria R., Penny M., Andrade M.I., Fairweather-Tait S., Zum Felde T., Campos H., Phiri K.S., Zimmermann M.B., Wegmüller R. (2020), Iron Absorption from Iron-Biofortified Sweetpotato Is Higher Than Regular Sweetpotato in Malawian Women while Iron Absorption from Regular and Iron-Biofortified Potatoes Is High in Peruvian Women. *J Nutr.*;150(12):3094-3102.

Klatte M., Schuler M., Wirtz M., Fink-Straube C., Hell R., Bauer P. (2009), The Analysis of Arabidopsis Nicotianamine Synthase Mutants Reveals Functions for Nicotianamine in Seed Iron Loading and Iron Deficiency Responses, *Plant Physiology*, Volume 150, Issue 1, Pages 257–271

Kogan L., Abeyá Gilardón E., Biglieri A., Mangialavori G., Calvo E., Durán P. (2008), Anemia: la desnutrición oculta, Informe del Ministerio de Salud de Argentina. <https://cesni-biblioteca.org/archivos/anemia-la-desnutricion-oculta.pdf>

Kopriva S. (2015), Plant sulfur nutrition: From Sachs to Big Data. *Plant Signaling & Behavior*, 10(9).

Köseoğlu A.T., Açıkgöz V. (1995), Determination of iron chlorosis with extractable iron analysis in peach leaves. *Journal of Plant Nutrition*, 18(1), 153–161.

Kwapisz J., Slomka A., Zekanowska E. (2009) Hepcidin and Its Role in Iron Homeostasis. *EJIFCC*. 20(2):124-8.

Kwon S., Jeong Y., Lee H., Kim J., Cho K., Allen R., Kwak S.S. (2002), Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen mediated oxidative stress. *Plant Cell Environ* 25:873–882.

Laffont C., Arnoux P. (2020), The ancient roots of nicotianamine: diversity, role, regulation and evolution of nicotianamine-like metallophores. *Metallomics*, Volume 12, Issue 10, Pages 1480–1493.

Landeta M.C., Pighin A.F., Gomez G.A. (2016) Contenido de minerales en papas crudas, procesadas industrialmente y cocidas por diferentes métodos. *DIAETA* ;39 (177).

Lawson T., Blatt M.R. (2014) Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *Plant Physiol.* 164(4):1556-70.

Lee S, Jeon US, Lee SJ, Kim YK, Persson DP, Husted S, Schjørring JK, Kakei Y, Masuda H, Nishizawa NK, An G. (2009), Iron fortification of rice seeds through activation of the nicotianamine synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* ;106(51):22014-9.

Legay S, Guignard C, Ziebel J, Evers D. (2012), Iron uptake and homeostasis related genes in potato cultivated in-vitro under iron deficiency and overload. *Plant Physiol Biochem.* 60:180-9

Li J., Martin C., Fernie A. (2024), Biofortification's contribution to mitigating micronutrient deficiencies. *Nat Food* 5, 19–27.

Li G., Wu J., Kronzucker H.J., Li B., Shi W. (2024), Physiological and molecular mechanisms of plant-root responses to iron toxicity. *Journal of Plant Physiology*, 297,154257.

Liang G. (2022), Iron uptake, signaling, and sensing in plants. *Plant Commun.* 3(5):100349.

Linnaeus C. (1753), *Species plantarum*, Volumen 1, página 185.

López Estupiñán L. (2023), Registros arqueológicos, etnohistóricos y etnobotánicos de la papa en la cordillera de los Andes. *Historia Y Memoria*, (27), 19–49.

Lynch S.R. (2011) Why nutritional iron deficiency persists as a worldwide problem. *J Nutr.* 141(4):763S-768S.

Manzanares M., Lucena J.J., Gárate A. (1990). Iron(II) determination in leaves of strawberry (*Fragaria vesca*). In: van Beusichem, M.L. (eds) *Plant Nutrition — Physiology and Applications. Developments in Plant and Soil Sciences*, vol 41. Springer, Dordrecht.

Maret W., Sandstead H. H; (2006). Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 20, 3–18.

Martín-Barranco A., Spielmann J., Dubeaux G., Vert G., Zelazny E. (2020), Dynamic Control of the High-Affinity Iron Uptake Complex in Root Epidermal Cells. *Plant Physiology*, Volume 184, Issue 3, Pages 1236-1250,

Martínez-García J.F., Virgós-Soler A., Prat S. (2002) Control of photoperiod-regulated tuberization in potato by the Arabidopsis flowering-time gene CONSTANS. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(23):15211-6.

Masuda T., Goto F., Yoshihara T., Mikami B. (2010), Crystal structure of plant ferritin reveals a novel metal binding site that functions as a transit site for metal transfer in ferritin. *J Biol Chem*;285(6):4049-4059.

Mori S., Nishizawa N. (1987), Methionine as a dominant precursor of phytosiderophores in Gramineae plants. *Plant Cell Physiol.*;28:1081–1092

Muñiz García M.N., Stritzler M., Capiati D.A. (2014), Heterologous expression of Arabidopsis ABF4 gene in potato enhances tuberization through ABA-GA crosstalk regulation. *Planta.* 239(3):615-31

Muñiz García M.N., Muro M.C., Mazzocchi L.C., País S.M., Stritzler M., Schlesinger M., Capiati D.A. (2017) The protein phosphatase 2A catalytic subunit StPP2Ac2b acts as a positive regulator of tuberization induction in *Solanum tuberosum* L. *Plant Mol Biol.* 93(3):227-245.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962), A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.

Nandi S., Susuki Y.A., Huang J., Yalda D., Pham P., Wu L., Bartley G., Huang N., Lönnnerdal B. (2002), Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula, *Plant Science*, Volume 163, Issue 4, Pages 713-722,

Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. (2005), Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot.* 56:2907-2914.

Noma M., Noguchi M., Tamaki E. (1971), A new amino acid, nicotianamine, from tobacco leaves. *Tetrahedron Letters*, Volume 12, Issue 22, Pages 2017-2020,

Nozoye T. (2018), The Nicotianamine Synthase Gene Is a Useful Candidate for Improving the Nutritional Qualities and Fe-Deficiency Tolerance of Various Crops. *Front Plant Sci.*; 9:340.

Nozoye T., Otani M., Senoura T., Nakanishi H., Nishizawa N.K. (2017) Overexpression of barley nicotianamine synthase 1 confers tolerance in the sweet potato to iron deficiency in calcareous soil. *Plant Soil* 418, 75–88.

Nunn N., Qian N. (2011), The potato's contribution to population and urbanization: evidence from a historical experiment. *Q J Econ.* ;126(2):593-650.

OMS (Organización Mundial de la Salud), Malnutrición, en su página web accedida desde <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition>.

OMS 2001, Iron deficiency anaemia, Assessment, Prevention and Control. A guide for programme managers.

Owens, B. (2018), Golden Rice is safe to eat, says FDA. *Nature Biotechnology* 36, 559–560.

Pafumi C.A. (2023), La Gran Hambruna y su tratamiento como genocidio: apuntes para el debate. *Suplemento Ideas*, IV(13), 1-10.

Petry N., Egli I., Gahutu J.B., Tugirimana P.L., Boy E., Hurrell R. (2012), Stable iron isotope studies in Rwandese women indicate that the common bean has limited potential as a vehicle for iron biofortification. *J Nutr.* 2012 Mar;142(3):492-7.

Pham H.D., Pólya S., Müller B., Szenthe K., Sági-Kazár M., Bánkúti B., Bánáti F., Sárvári E., Fodor F., Tamás L., Philipp K., Solti A. (2020), The developmental and iron nutritional pattern of PIC1 and NiCo does not support their interdependent and exclusive collaboration in chloroplast iron transport in Brassica napus. *Planta* 251, 96.

Prasad A. S. (2013), Discovery of human zinc deficiency: its impact on human health and disease. *Adv. Nutr.* 4, 176–190.

Proudhon D., Wei J., Briat J., Theil E.C. (1996), Ferritin gene organization: differences between plants and animals suggest possible kingdom-specific selective constraints. *J Mol Evol.*;42(3):325-36.

Rajniak, J., Giehl, R.F.H., Chang, E., Murgia I., von Wirén N., Sattely E.S. (2018), Biosynthesis of redox-active metabolites in response to iron deficiency in plants. *Nat Chem Biol* 14, 442–450.

Rashid, A. and Fox, R.L. (1992), Evaluating Internal Zinc Requirements of Grain Crops by Seed Analysis. *Agron. J.*, 84: 469-474.

Rellán-Álvarez R., Giner-Martínez-Sierra J., Orduna J., Orera I., Rodríguez-Castrillón J.A., García-Alonso J.I., Abadía J. (2010), Álvarez-Fernández A., Identification of a Tri-Iron(III), Tri-Citrate Complex in the Xylem Sap of Iron-Deficient Tomato Resupplied with Iron: New Insights into Plant Iron Long- Distance Transport, *Plant and Cell Physiology*, Volume 51, Issue 1, Pages 91–102.

Rengel, Z., Batten, G. D., & Crowley, D. E. (1999), Agronomic approaches for improving the micronutrient density in edible portions of field crops. *Field Crop Research*, 60, 27-40.

Rocha-Sosa M, Sonnewald U, Frommer W, Stratmann M, Schell J, Willmitzer L. (1989), Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *EMBO J.* 8(1):23-9.

Rogers E.E., Eide D.J., Gueriot M.L. (2000), Altered selectivity in an Arabidopsis metal transporter. *Proc Natl Acad Sci USA*;97(22):12356-60.

Romano E., Proite K., Soares A., Torres A., Arieta J., Jach G., Mentaberry A., Monte D. (2001) New binary vetores for plant co-transformation. *Physiol. Mol. Biol. Plants* (2001) 7(2): 133-137.

Römhelt V, Marschner H. (1986), Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiol.*;80(1):175-80.

Sablani, Shyam & Mujumdar, A. (2006), 27 Drying of Potato, Sweet Potato, and Other Roots. *Handbook of Industrial Drying*, Cuarta edición. 10.1201/9781420017618.ch27.

Safiri S., Kolahi A.A., Noori M., Nejadghaderi S.A., Karamzad N., Bragazzi N.L., Sullman M.J.M., Abdollahi M., Collins G.S., Kaufman J.S., Grieger J.A. (2021) Burden of anemia and its underlying causes in 204 countries and territories, 1990-2019: results from the Global Burden of Disease Study 2019. *J Hematol Oncol* ;14(1):185.

Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez JY., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. (2012), Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682.

Schuler M., Rellán-Álvarez R., Fink-Straube C., Abadía J, Bauer P. (2012), Nicotianamine Functions in the Phloem-Based Transport of Iron to Sink Organs, in Pollen Development and Pollen Tube Growth in Arabidopsis, *The Plant Cell*, Volume 24, Issue 6, Pages 2380–2400,

Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca del ministerio de economía de Argentina (2023), Producción de papa en Argentina – evolución del cultivo hasta la temporada 2021-2022.

Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, (2021), Producción de papa en Argentina. Informe correspondiente a mayo 2021.

SEMAE, Organización Interprofesional Francesa para semillas y plantas, The French seed potato, <https://www.plantdepommedeterre.org/>

Senguttuvel P, Padmavathi G., Jasmine C., Sanjeeva Rao D., Neeraja C.N., Jaldhani V., Beulah P., Gobinath R., Aravind Kumar J, Sai Prasad S.V., Subba Rao L.V., Hariprasad A.S., Sruthi K., Shivani D., Sundaram R.M., Govindaraj M. (2023), Rice biofortification: breeding and genomic approaches for genetic enhancement of grain zinc and iron contents. *Front Plant Sci.* 14:1138408.

Seregin, I.V.; Kozhevnikova, A.D. (2023) Nicotianamine: A Key Player in Metal Homeostasis and Hyperaccumulation in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 10822.

Shayeghi M., Latunde-Dada G.O., Oakhill J.S., Laftah A.H., Takeuchi K., Halliday N., Khan Y., Warley A., McCann F.E., Hider R.C., Frazer D.M., Anderson G.J., Vulpe C.D., Simpson R.J., McKie A.T. (2005), Identification of an intestinal heme transporter. *Cell.* ;122(5):789-801

Spence M.J., Henzl M.T., Lammers P.J. (1991), The structure of a *Phaseolus vulgaris* cDNA encoding the iron storage protein ferritin. *Plant Mol Biol.* ;17(3):499-504.

Stevens G.A., Beal T., Mbuya M.N.N., Luo H., Neufeld L.M. (2022) Micronutrient deficiencies among preschool-aged children and women of reproductive age worldwide: a pooled analysis of individual-level data from population-representative surveys. *Lancet Glob Health.* ;10(11):e1590-e1599.

Stritzler M., Muñiz García M.N., Schlesinger M., Cortelezzi J.I., Capiati D.A. (2017), The plasma membrane H⁺-ATPase gene family in *Solanum tuberosum* L. Role of PHA1 in tuberization. *J Exp Bot.* 68(17):4821-4837.

Takahashi M., Terada Y., Nakai I., Nakanishi H., Yoshimura E., Mori S., Nishizawa N.K. (2003), Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell.* 15(6):1263-80.

Tang G., Qin J., Dolnikowski G.G., Russell R.M., Grusak M.A. (2009), Golden Rice is an effective source of vitamin A. *Am J Clin Nutr.* 89(6):1776-83.

Teixeira A.I., Ribeiro L.F., Rezende S.T., Barros E.G., Moreira M.A. (2012), Development of a method to quantify sucrose in soybean grains. *Food Chem* 130:1134–1136.

Van Der Straeten, D., Bhullar, N. K., De Steur, H., Gruissem, W., MacKenzie, D., Pfeiffer, W., Qaim, M., Slamet-Loedin, I., Strobbe, S., Tohme, J., Trijatmiko, K. R., Vanderschuren, H., Van Montagu, M., Zhang, C., & Bouis, H. (2020), Multiplying the efficiency and impact of biofortification through metabolic engineering. *Nature communications*, 11(1), 5203.

Veena S., Nemeth E. (2017), Regulation of the iron homeostatic hormone hepcidin. *Adv. In Nutrition*,

8(1),126-136.

Waldo G. S., Wright E., Whang Z. H., Briat J.F., Theil E.C., Sayers D.E. (1995), Formation of the Ferritin Iron Mineral Occurs in Plastids (An X-Ray Absorption Spectroscopy Study, *Plant Physiology*, Volume 109, Issue 3, Pages 797–802

Wessells K.R., Brown K.H. (2012) Estimating the Global Prevalence of Zinc Deficiency: Results Based on Zinc Availability in National Food Supplies and the Prevalence of Stunting. *PLoS One*. 2012;7(11):e50568.

White P.J., Broadley M.R. (2009), Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, 182: 49-84.

Wirth J., Poletti S., Aeschlimann B., Yakandawala N., Drosse B., Osorio S., Tohge T., Fernie A.R., Günther D., Gruissem W., Sautter C. (2009), Rice endosperm iron biofortification by targeted and synergistic action of nicotianamine synthase and ferritin. *Plant Biotechnol J*. 7(7):631-44.

WorldBank (2017), An overview of links between obesity and food systems. Documento accesible desde: www.documents.worldbank.org/curated/en/222101499437276873/pdf/117200-REVISED-WP-Obesity-Overview-Web-PUBLIC-002.pdf.

Ye X., Al-Babili S., Klöti A., Zhang J., Lucca P., Beyer P., Potrykus I. (2000), Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*. 287(5451):303-5.

Yuan, Y., Wu, H., Wang, N., Li J., Zhao W., Du J., Wang D., Hong-Qing L. (2008), FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in Arabidopsis. *Cell Res* 18, 385–397.

Zha M., Li X., Li R., Huang J., Fan J., Zhang J., Wang Y., Zhang C. (2022) Overexpression of Nicotianamine Synthase (AtNAS1) Increases Iron Accumulation in the Tuber of Potato. *Plants* (Basel) 11:2741.

Zhang Y.Y., Stockmann R., Ng K., Ajlouni S. (2020), Revisiting phytate-element interactions: implications for iron, zinc and calcium bioavailability, with emphasis on legumes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(6), 1696–1712.

Zielińska-Dawidziak M. (2015) Plant ferritin-a source of iron to prevent its deficiency. *Nutrients*. 7(2):1184-201.