

Tesis Doctoral

Un rol biológico propuesto para las misteriosas polifenol oxidasas vegetales

Llorente, Briardo Ernesto

2010

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

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

Cita tipo APA:

Llorente, Briardo Ernesto. (2010). Un rol biológico propuesto para las misteriosas polifenol oxidasas vegetales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Llorente, Briardo Ernesto. "Un rol biológico propuesto para las misteriosas polifenol oxidasas vegetales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

UN ROL BIOLÓGICO PROPUESTO PARA LAS MISTERIOSAS POLIFENOLOXIDASAS VEGETALES

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

Biarldo Ernesto Llorente

Director de tesis: Dra. Mirtha María Flawiá

Director Asistente: Dr. Fernando Félix Bravo-Almonacid

Consejo de Estudios: Dr. Luis Quezada Allué

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular
(INGEBI-CO NICET)

Buenos Aires, 2010

Al presente esta tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos:

- 2010 **Biarlo Lorente**, Vanina Rodríguez, Guillermo D. Alonso, Héctor N. Torres, Mirtha M. Flawiá and Fernando Bravo-Almonacid. Improvement of aroma in transgenic potato as a consequence of impairing tuber browning.

PLoS ONE. DOI 10.1371/journal.pone.0014030

Este artículo fue incluido en las *Selecciones del Editor de PLoS Biology*. 2010.

- 2010 **Biarlo Lorente**, Guillermo D. Alonso, Fernando Bravo-Almonacid, Vanina Rodríguez, Mariana G. López, Fernando Carrari, Héctor N. Torres and Mirtha M. Flawiá. Safety assessment of non-browning potatoes: opening the discussion about the relevance of substantial equivalence on next generation biotech crops.

Plant Biotechnology Journal. DOI 10.1111/j.1467-7652.2010.00534.x

- 2010 **Biarlo Lorente**, Fernando Bravo-Almonacid, Cristina Cvitanich, Elzbieta Orłowska, Héctor N. Torres, Mirtha M. Flawiá and Guillermo D. Alonso. A quantitative real-time PCR method for *in planta* monitoring of *Phytophthora infestans* growth.

Letters in Applied Microbiology. DOI 10.1111/j.1472-765X.2010.02942.x

- Dieciséis (16) congresos nacionales e internacionales.

*Nothing in biology makes sense except in the light of evolution**

Theodosius Dobzhansky

* *Nada tiene sentido en biología sino es a la luz de la evolución.*

Resumen

Las polifenol oxidasas [PPO; EC (Enzyme Commission) 1.14.18.1 o EC 1.10.3.1] son ciertamente enzimas muy intrigantes. A pesar de haber sido estudiadas durante décadas y ser sus reacciones catalíticas ampliamente conocidas, no ha sido posible asignarles una localización precisa dentro de ninguna ruta metabólica. Aún más notable es que, incluso luego de más de 110 años de investigación transcurridos desde su descripción inicial en 1896, su función biológica es todavía un misterio.

Las PPO son enzimas plastídicas ubicuas en vegetales que catalizan la conversión oxígeno-dependiente de fenoles a quinonas. Los sustratos fenólicos de PPO se localizan en la vacuola y entran en contacto con la misma cuando se producen daños en la compartimentación intracelular. Las quinonas formadas por la actividad de PPO son especies altamente reactivas, capaces de reaccionar con virtualmente todos los componentes celulares. Estas conducen a la formación y precipitación de polímeros oscuros similares a la melanina, un fenómeno conocido con el nombre de pardeamiento enzimático. Este fenómeno es responsable de cuantiosas pérdidas económicas en el mercado de frutos y vegetales y, actualmente, sólo puede ser parcialmente controlado mediante el uso de aditivos potencialmente dañinos para la salud humana.

Con el propósito de contribuir al entendimiento del rol biológico y la evolución de estas enzimas, y a su vez generar un cultivo exento del deterioro oxidativo mediado por PPO, diversas líneas transgénicas (-PPO) de papa (*Solanum tuberosum*) con reducida actividad PPO fueron obtenidas mediante ingeniería genética y caracterizadas tanto a nivel fisiológico como molecular. El cultivo de papa fue elegido como modelo para este trabajo por ser el tercer cultivo de mayor consumo en el mundo y una de las alternativas principales para suplir las próximas necesidades alimentarias de la creciente población mundial.

Considerando la relevancia intelectual y económica de estas enzimas, esta tesis trata tanto con aspectos biológicos como prácticos del estudio de las PPO. Un exhaustivo análisis de seguridad reveló que las papas -PPO son seguras para el consumo, si bien son metabólicamente diferentes a sus parentales silvestres (WT, de sus siglas en inglés Wild Type). Este estudio instauró el debate sobre la relevancia de los conceptos actualmente utilizados para la evaluación de la seguridad de cultivos transgénicos. En

esta línea, diversos estudios sensoriales realizados en ratones y humanos revelaron que, además de su vida útil más prolongada, los tubérculos -PPO poseen mejoras organolépticas. Esta serie de estudios representaron el primer ejemplo exitoso de la aplicación de un modelo animal y paradigmas neurobiológicos en el estudio de un cultivo genéticamente modificado.

Paralelamente, experimentos con patógenos e insectos fueron llevados a cabo para explorar las potenciales implicancias de PPO en los procesos de resistencia a estrés biótico. El desarrollo de un nuevo método para estudiar la enfermedad más devastadora del cultivo de papa, el tizón tardío, causado por el oomiceto *Phytophthora infestans*, permitió identificar que las plantas -PPO son más resistentes a este patógeno mediante mecanismos que parecen involucrar la participación de compuestos fenólicos. Inversamente, experimentos realizados con el insecto plaga *Cyclocephala signaticollis* mostraron que los tubérculos -PPO eran consumidos en una mayor proporción que los tubérculos WT por este coleóptero. A su vez, los análisis filogenéticos sugieren que las PPO vegetales fueron adquiridas por transferencia génica horizontal a partir de bacterias como una adaptación de las plantas primitivas al ambiente terrestre.

En conjunto, estos estudios añaden una pequeña pero importante contribución a la comprensión de la evolución y la función biológica de las enzimas PPO que podría ser útil para el futuro desarrollo de nuevos cultivos mejorados. Finalmente, y probablemente el aspecto más interesante de esta tesis, es que, de la síntesis de los experimentos realizados durante el transcurso de este estudio, ha emergido una hipótesis que propone por primera vez una sugestiva explicación sobre el rol biológico de las PPO vegetales como parte de un sistema de defensa contra la depredación. El modelo propuesto aporta una explicación para el mecanismo de acción de PPO que es coherente con las evidencias evolutivas y, a su vez, permite interpretar una serie de intrigantes resultados previamente reportados por otros grupos de investigación.

Palabras clave: Polifenol oxidasas (PPO) - Rol biológico de PPO - Evolución de PPO - Oxidación enzimática - Mejoramiento biotecnológico - *Solanum tuberosum* - Organismo Genéticamente Modificado (OGM) - Seguridad de OGMs - Percepción de OGMs - Silenciamiento génico - Tolerancia a estrés.

Abstract

The polyphenol oxidases [PPO, EC (Enzyme Commission) 1.14.18.1 or EC 1.10.3.1] are certainly very intriguing enzymes. Despite having been studied for decades and their catalytic reactions are well known, no precise location has been assigned to this enzyme in any known metabolic pathway. Remarkably, even after over 110 years of research since its initial description in 1896, its biological function is still a mystery.

The PPOs are ubiquitous plastid plant enzymes that catalyze the oxygen-dependent conversion of phenols to quinones. PPO phenolic substrates are located in the vacuole and come into contact with the enzyme when disruption of the intracellular compartmentalization takes place. The quinones formed by PPO activity are highly reactive species that can react with virtually all cellular components, leading to the formation and precipitation of dark melanin-like polymers, a phenomenon known as enzymatic browning. This phenomenon is responsible for enormous economic losses in the fruit and vegetable industry and is currently partially controlled through the use of additives which have some adverse effects on human health.

In an attempt to contribute to the understanding of the biological function and evolution of these enzymes, and to generate a quality improved crop exempt from the PPO-mediated oxidative damage, several transgenic potato (*Solanum tuberosum*) lines (-PPO or *nonbrowning*) with reduced PPO activity were genetically engineered and characterized both at the physiological and molecular levels. Potato was chosen as a model for this study because it is currently the third most important food crop consumed worldwide and a critical alternative for feeding the world's growing population.

Considering the intellectual and economic relevance of these enzymes, this thesis deals with both biological and practical aspects of the study of PPO. A comprehensive evaluation of the safety assessment of the transgenic lines revealed that the *nonbrowning* potatoes present no risk for adverse health effects. Although, they are metabolically different from wild-type (WT) potatoes. An exhausted safety assessment analysis evidenced no adverse health effects, establishing a debate about the relevance of the concepts currently used to assess the safety of genetically modified crops. In line with these aspects, sensory studies in mice and humans revealed that, in

addition to their extended shelf life, *nonbrowning* potatoes have organoleptic improvements over the WT potatoes. This series of studies represented the first successful example of the implementation of an animal model and neurobiological paradigms in the study of a genetically modified crop.

In parallel, studies with pathogens and insects were carried out to study the potential implications of PPO in biotic stress resistance processes. A new method to study the most devastating disease affecting potato, the “late blight”, caused by the oomycete *Phytophthora infestans*, was developed and applied to evaluate the disease resistance of -PPO plants. The transgenic plants presented an increased resistance to this pathogen through mechanisms that seem to involve the participation of phenolic compounds. Conversely, experiments performed with the insect pest *Cyclocephala signaticollis* showed that -PPO tubers were consumed in greater proportions than WT tubers by this coleopteran. In turn, phylogenetic analyses suggests that plant PPOs were acquired by horizontal gene transfer from bacteria as an adaptation of primitive plants to the terrestrial environment.

In summary, these studies provide a small but important contribution to the understanding of the evolution and biological function of PPO enzymes that could be useful for the future development of new improved crops. Finally, and perhaps the most interesting and relevant aspect of this thesis, is that a new hypothesis that provides a suggestive explanation for the biological role of plant PPOs as part of a defense system against predation has emerged from the work done. The proposed model provides an explanation for the mechanism of action of PPO that, is consistent with the evolutionary evidence, and also allows to interpret a number of intriguing results previously reported by other research groups.

Keywords: Polyphenol oxidase (PPO) – PPO biological function – PPO evolution - Enzymatic browning - Biotech improvement - *Solanum tuberosum* - Genetically Modified Organism (GMO) - GMO safety assessment - GMO perception - Gene silencing - Stress tolerance.

Agradecimientos

He disfrutado mucho escribiendo esta tesis y espero que parte de ello sea compartido con quien la lea. Deseo dar las gracias a la Dra. Mirtha Flawiá, al Dr. Héctor Torres y todos los miembros del INGEBI, donde aprendí de ciencia, de colaboración y de amistad. Ciertamente no debe haber ni una sola persona dentro de sus paredes que no haya compartido de buena gana conmigo su conocimiento, opiniones ypreciado equipamiento.

A mis amigos Fede Rojas, Pato Portal y Esteban Erben, tres campeones con los que discutí más experimentos y compartí más aventuras de las que pueda recordar.

A todos mis demás amigos y compañeros del INGEBI y del entrañable laboratorio 209: Pablo Gargantini, Vero Giammaria, Euge Segretin, Guille Lobo, Rodrigo Baltanás, Ale Schojjet, Cata Guida, Cristian Meyer, Fasso Fassolari, Salo Vilchez, Marian Schlessinger, Teresa Weise, Patricia Caicedo, Dani Noain, Maru Pepper, Tete Bello Gay, Pau Bey, Nati Módena, Nati Ferraso, Mari Binaghi, Silvia Ledesma, Sonia Wirth, Mauro Morgenfeld, Ezequiel Lentz, Karina Gómez, Matu “Lebowski” de Vas, Juan Pablo Luppi, Diego Wengier, Vani Grippo, Juan Echebore, Leti Niborski, Sandra Bachmann, Tami Salem, Sabina Domene, Sofi Nasif, Maxi Jun Ayub, Benson Nyambega, Berti Bouvier, Clau Pereira y Ramiro Lorenzo por todos estos años compartidos y hacer del trabajo mucho más que solo experimentos.

A los Dres. Guillermo Alonso y Fernando Bravo-Almonacid y las Dras. Cristina Paveto y Silvia Villamil por su ayuda incondicional y largas discusiones que me fueron de gran ayuda desde los albores de este trabajo.

Al Dr. Fernando Canari y la Dra. Mariana López por los experimentos clave y las interesantes discusiones compartidas.

A Nico Ayub, Gaby Soto y Flavio de Souza por toda su ayuda con los estudios evolutivos de PPO.

A Rubén Álvarez, que construyó cual elavezado Q muchos de los artefactos utilizados en esta tesis.

A Irma Gelmi, Marta Garibaldi, Alicia Quintela, Mariano Rodríguez, Gladys Muñoz, Mari y el Gran Francisco Irusta, Martín La Rosa, Daniel Gracia, Alejandra Rodríguez, Daniela Faccemin, José Amado y Roberto Malarini por su ayuda siempre dispuesta.

A los Dres. Luis Quesada Allué, Joaquín Espinosa, Jorge Muschietti y Marcelo Rubinstein y las Dras. Cristina Cvitanich, Elsie Orlowska, Laura Schreier, Graciela López, Silvia Vanzulli y Teresa Téllez-Iñón por todos sus consejos que enriquecieron mi trabajo.

A Nico Codega, Gonzalo y Ale Penna, Maxi González y toda su familia, Maxi Shorttrede, Lucas Bukata, Lio Caputo, Ezequiel Pettillo, Manu Muñoz, Seba “Carucha” Rombolá, Said Alume, Mauro Denapole, Jorge Pereyra y Guille Amaral por su amistad.

A Karina Gómez, Anita Lobo y Salo Vilchez por sus certeras correcciones y a Rubén Escudero por su ayuda con las impresiones de esta tesis.

A la familia Rodríguez por su cálido afecto.

A Gonzo y Mingus, mis padres, Leoy y toda mi familia, por su apoyo y continua alegría.

Muy especialmente a Nina, por hacerme sentir la persona más feliz de la tierra.

Y por supuesto, a Gabriel Bertrand y Charles Darwin.

A mis padres

Índice

Prólogo	13
Introducción	15
De las polifenol oxidasas y sus sustratos fenólicos	15
Silenciamiento de ARN en plantas	19
Sobre el cultivo de papa y la biotecnología	20
Seguridad y percepción de los cultivos biotecnológicos	21
Darwiniana	22
Objetivos	24
Materiales y Métodos	25
Declaración ética	25
Construcción del vector de silenciamiento y obtención de las plantas transgénicas -PPO	25
Extracción de proteínas, ensayo de actividad PPO y análisis de proteínas por inmunquímica (western blot)	26
Análisis de ADN	27
Monitoreo de <i>Phytophthora infestans</i> por PCR cuantitativa	28
Análisis de ARN	29
Análisis bioinformático de reactividad cruzada con alérgenos	30
Evaluación de productividad	31
Medición de parámetros fotosintéticos	31
Análisis metabólico	31
Estudios alimentarios en ratones	32
Estudios sensoriales	33
Estudios con <i>Cyclocephala signaticollis</i>	36
Estudios con <i>Phytophthora infestans</i>	36
Estudios evolutivos	37
Documentación fotográfica	38
Análisis estadístico de los datos	38

Resultados	40
Obtención de las líneas transgénicas -PPO	40
El silenciamiento de <i>PPO</i> reduce la actividad enzimática de PPO y el pardeamiento en tubérculos, pero no tiene efectos sobre el crecimiento, el desarrollo ni la fotosíntesis	43
Los niveles de metabolitos son disímiles en las líneas WT y -PPO	46
Los tubérculos -PPO son más consumidos que los WT y no alteran los parámetros fisiológicos en un modelo murino	48
Análisis bioinformáticos de alergenicidad	51
Estudios sensoriales	52
Los ratones tienen preferencia por las papas -PPO cuando los tubérculos presentan deteñimiento oxidativo	55
Los seres humanos son capaces de diferenciar las líneas -PPO de las WT por su aroma	56
<i>Cyclocephala signaticollis</i> consume más papa -PPO que WT	57
Las plantas -PPO son más resistentes a <i>Phytophthora infestans</i>	58
Filogenia y evolución de <i>PPO</i>	66
Discusión	73
El modelo y el impacto de PPO sobre el metabolismo	73
Seguridad y percepción de las papas sin pardeamiento	75
Implicancias ecológicas	77
Evolución y propuesta de un posible rol biológico	79
Conclusiones	81
Firmas	84
Bibliografía	85

Prólogo

Antes de la publicación de *El Origen de las Especies (1)*^{*}, las teorías científicas imperantes sostenían que los seres vivos (al igual que sus componentes) estaban *diseñados* de la forma en que los percibimos *para* cumplir una función. La revolución Darwiniana otorgó a la selección natural la fuerza creativa de la evolución y, a la variación natural, una personalidad azarosa y carente de propósito. Esta idea cambió el mundo y, una vez comprendida, es difícil volver a ver la realidad con los mismos ojos. Dado que la biología es producto del pasado, creo que utilizar estos *ojos evolutivos* a la hora de examinar resultados experimentales, podría permitirnos interpretar los acontecimientos ocurridos que dieron lugar a que los resultados que observamos sean justamente esos y no otros.

Este ejercicio eventualmente podría llevarnos a proponer modelos que, no necesariamente serán reales, pero ciertamente serán útiles y, dependiendo de las evidencias con que contemos, también probables. La importancia de estos modelos reside en su capacidad de proporcionar un marco de entendimiento para los procesos biológicos, que ocasionalmente estimulará la creación de mejores modelos para intentar comprender de que forma la evolución dio (y da) forma a nuestro mundo.

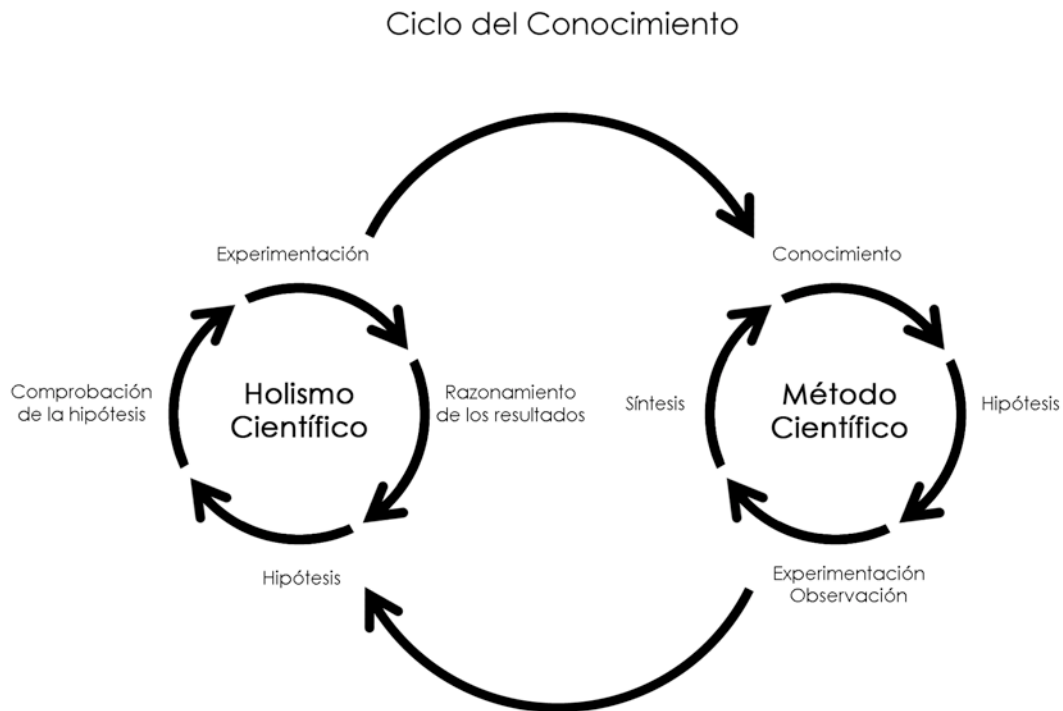
El objetivo inicial de este trabajo fue desarrollar una estrategia molecular para inhibir el deterioro oxidativo que ocurre en vegetales a causa de la actividad de las enzimas polifenol oxidasas. Para llevarlo a cabo, se utilizó el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) como modelo, con el propósito de transferir en el futuro el desarrollo a otros cultivos. Si bien los objetivos originales se lograron, el postulado de una hipótesis que pretende explicar el rol biológico de las polifenol oxidasas vegetales resulta ser un asunto que trasciende ampliamente los resultados de este trabajo. Sea esta real o falsa, el tiempo dirá. A modo de síntesis, se podría decir que el proyecto fue inicialmente visto con *ojos prácticos* y a medida que el trabajo fue desarrollándose,

^{*} El título original de 1859, "*On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*", se acortó a "*The Origin of Species*" a partir de su sexta edición en 1872.

dio lugar a que pudiera ser visto con *ojos evolutivos*, es ese devenir el que da forma a esta tesis.

Por último, son necesarias tres aclaraciones. Me he tomado la libertad de calificar de *miste riosas* a las enzimas polifenol oxidasas como una forma de intentar ilustrar en el título de esta tesis el hecho de que su función biológica no ha podido ser dilucidada a pesar de más de un siglo de intensas investigaciones. Es mi intención que esta descripción sea interpretada como un detalle romántico y no como uno místico. Por otro lado, en la Introducción de este escrito no se encontrarán largas disquisiciones sobre los fundamentos de técnicas experimentales específicas o procesos biológicos ampliamente conocidos. Esta argumentación habría complicado en vano la lectura de esta tesis. En cambio, en la sección Resultados, se han incorporado descripciones introductorias sobre estos temas en las instancias que fueron consideradas necesarias.

Finalmente, considerando el Ciclo del Conocimiento, esta tesis no encaja totalmente dentro del clásico esquema deductivo y reduccionista del Método Científico, donde una investigación comienza a partir de un conocimiento previo que permite formular una hipótesis que es luego puesta a prueba por medio de experimentos, sino que está mayoritariamente comprendida dentro del esquema inductivo del Holismo Científico, donde la investigación comienza a partir de la experimentación y luego el análisis de los resultados lleva a la generación de una hipótesis que deberá ser puesta a prueba (2, 3), como ilustra la siguiente figura:



Introducción

De las polifenol oxidasas y sus sustratos fenólicos

Si pelamos una manzana, podemos estar seguros de que a menos que apliquemos alguno de los viejos trucos de la abuela, como alterar su pH con jugo de limón o impedir su contacto con el oxígeno atmosférico sumergiéndola en agua, esta comenzará a tomarse oscura y, al poco tiempo, ya no tendremos tantas ganas de comemos aquella manzana “oxidada”. Este fenómeno tan usual, llamado pardeamiento enzimático, no ocurre sólo en manzanas, sino que es común en todo el reino vegetal y es producto de la actividad de una familia de enzimas conocidas como polifenol oxidasas [PPO; EC (Enzyme Commission) 1.14.18.1 o EC 1.10.3.1]. El pardeamiento enzimático es desencadenado por el encuentro entre PPO y sus sustratos fenólicos almacenados dentro de la vacuola al ocurrir una destrucción de la compartimentación intracelular. Las quinonas formadas mediante la actividad de PPO son especies altamente reactivas capaces de reaccionar con virtualmente todos los componentes celulares, conduciendo a la formación y precipitación de polímeros similares a la melanina que son los que dan la apariencia oscura a los tejidos dañados (4) (Figura 1). Ciertamente, estas enzimas no se han mantenido a lo largo de la evolución por cientos de millones de años (al menos 500 millones de años en vegetales. Véase los análisis filogenéticos de la sección de Resultados) sólo para arruinar la ensalada de frutas; sin embargo, a pesar de haber sido estudiadas durante décadas y de existir un amplio conocimiento sobre ellas, su función biológica es todavía un misterio.

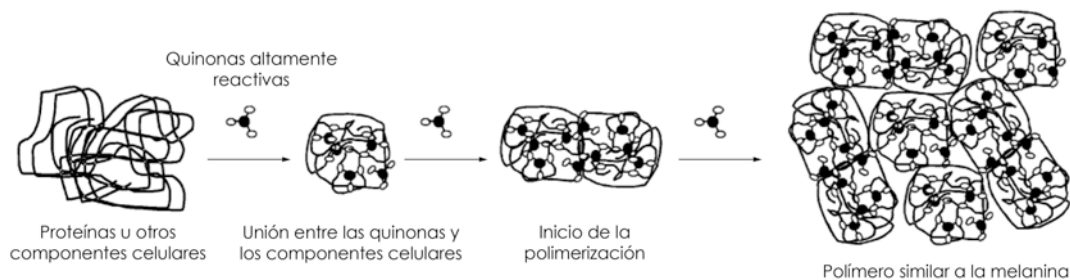


Figura 1. Modelo de la polimerización entre los compuestos fenólicos y los componentes celulares mediada por PPO. Adaptado de (5).

Las polifenol oxidases fueron descritas por primera vez hace más de 110 años por Gabriel Bertrand en 1896 (6). Estas enzimas pertenecen a un tipo muy ancestral de proteínas que se encuentran en casi todos los dominios de la vida: la familia de proteínas de unión a cobre de tipo 3 (type 3 copper-protein family) (7, 8). Se especula que esta familia de enzimas, surgida hace alrededor de 3.500 millones de años, podría haber ayudado a mantener bajas las concentraciones tóxicas de oxígeno intracelular cuando a causa de la aparición de la fotosíntesis la atmósfera terrestre cambió de su condición anaeróbica a aeróbica (7,9). Las PPO vegetales comparten el mismo dominio catalítico con proteínas tan diversas como las hemocianinas respiratorias, las tirosinasas inmunológicas de hemolinfa, las hexamerinas de insectos y las fenol oxidases responsables de la pigmentación de la piel (7, 9-13).

Si bien estas enzimas son ubicuas en vegetales, sabemos que sus genes han sido perdidos recientemente al menos en una especie, *Arabidopsis thaliana* (14). Las PPO se encuentran asociadas a las membranas de los tilacoides y catalizan la conversión oxígeno-dependiente de fenoles a quinonas (4) mediante dos pasos: la hidroxilación de los compuestos fenólicos y, posteriormente, la oxidación de los productos difenólicos (Figura 2A). El sitio catalítico de PPO está conformado por 2 átomos de cobre, cada uno de los cuales está coordinado por 3 histidinas (Figura 2B) y las reacciones catalíticas proceden gracias a una flexibilidad estructural propia del sitio activo que permite aproximar los distintos átomos que participan en la catálisis al anillo fenólico del sustrato (Figura 2C) (7, 8, 15-17).

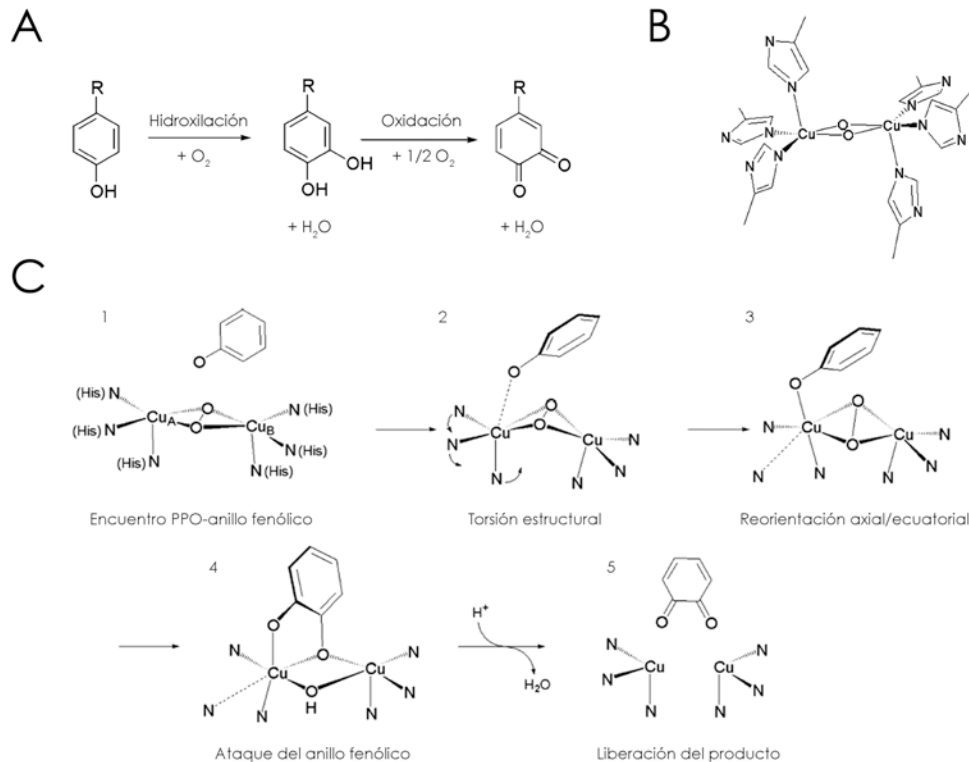


Figura 2. Actividad enzimática de la polifenol oxidasa (PPO). (A) Reacciones de hidroxilación y oxidación catalizadas por PPO. (B) Sitio catalítico de PPO. Conformado por 2 átomos de cobre, cada uno de los cuales se encuentra coordinado por 3 histidinas. (C) Modelo propuesto del mecanismo de catálisis de PPO basado en el análisis de estructura por cristalografía de rayos X y simulaciones de dinámica molecular (LFMD: ligand field molecular dynamics). Adaptado de (15-17).

Pese a los considerables esfuerzos por intentar establecer el papel de PPO dentro del metabolismo vegetal (18-21), no se le ha podido asignar a esta enzima una localización definida en ninguna vía metabólica (18, 22). Sin embargo, existen varios trabajos, carentes aún de una explicación sólida, que sugieren la participación de PPO en los mecanismos de defensa a estrés biótico y abiótico. En muchas especies vegetales, la resistencia a insectos está condicionada por la capacidad de los tricomas de romperse y polimerizar rápidamente su contenido al entrar en contacto con el insecto invasor. En esta "trampa" biológica, la polimerización del exudado de los tricomas es catalizada por PPO (23, 24). También, ha sido reportado que en trigo (*Triticum aestivum*), los cultivares resistentes a áfidos tienen una mayor actividad constitutiva de PPO que los cultivares susceptibles (25).

Resultados similares, donde la actividad de PPO se correlacionó en forma directa con una disminución en la defoliación de plantas por insectos, son comunes en la bibliografía (26-29). Una serie de trabajos realizados con plantas silvestres y transgénicas de álamo (*Populus tremula* x *P. alba*) y tomate (*Solanum lycopersicum*), con mayores y menores actividades de PPO, mostraron una correlación directa entre la resistencia a insectos y la actividad de PPO entre los distintos genotipos (30-32). Otros estudios realizados también con tomates silvestres y transgénicos mostraron que plantas deficientes en PPO eran más susceptibles a la bacteria *Pseudomonas syringae*, mientras que plantas sobreexpresantes de PPO resultaban más resistentes al mismo patógeno (33, 34). Por otro lado, unos pocos trabajos han correlacionado la modulación de la actividad de PPO *in planta* en respuesta al estrés térmico, hídrico y salino (35-37). Probablemente, el único informe existente en donde se estudió implícitamente la relación entre PPO y un estrés abiótico también sea el más desconcertante. En este trabajo, se encontró que plantas de tomate silenciadas para PPO resultaron ser más tolerantes al estrés hídrico. Si bien la causa de estos resultados no pudo ser interpretada, los autores concluyeron que las plantas transgénicas mostraban menores síntomas de estrés oxidativo (38).

Con un menor grado de incertidumbre, se cree que estas enzimas son las principales responsables de las reacciones de oxidación que conllevan al oscurecimiento de los tejidos vegetales dañados, senescentes o infectados (4, 22, 39). Desde un punto de vista práctico, estas reacciones alteran negativamente las propiedades organolépticas y la calidad nutritiva de los alimentos, ocasionando cuantiosas pérdidas económicas en el mercado de frutos y vegetales (40, 41). En papa (*Solanum tuberosum*), las polifenol oxidasas están codificadas por una familia multigénica constituida por al menos seis (6) miembros con un complejo patrón espacio-temporal de expresión génica. Tres de ellos, *POB2* (U22921), *POB3* (U22922) y *NOR333* (M95196) se expresan en tubérculos y, además, *NOR333* también se expresa en flores y hojas (4).

En contraste con la amplia distribución de las proteínas de unión a cobre de tipo 3, las enzimas de la vía metabólica de los fenilpropanoides (Figura 3), conforman un metabolismo exclusivo de plantas terrestres, surgido hace alrededor de 500 millones de años como una adaptación clave de las plantas a la vida terrestre, que les permitió hacer frente tanto al estrés biótico como abiótico (42). Esta vía genera compuestos fenólicos vitales para diversos procesos biológicos como la vascularización y la rigidez del tallo, la síntesis de compuestos volátiles y pigmentos de flores y frutos, protección UV (ultravioleta), interacciones microbio-planta y defensas contra patógenos (42-

46). Con respecto al estrés biótico, los compuestos fenólicos contribuyen a los mecanismos de resistencia/tolerancia de una manera cuantitativa, formando parte de la naturaleza de múltiples componentes que conforman las respuestas de defensa en plantas (46).

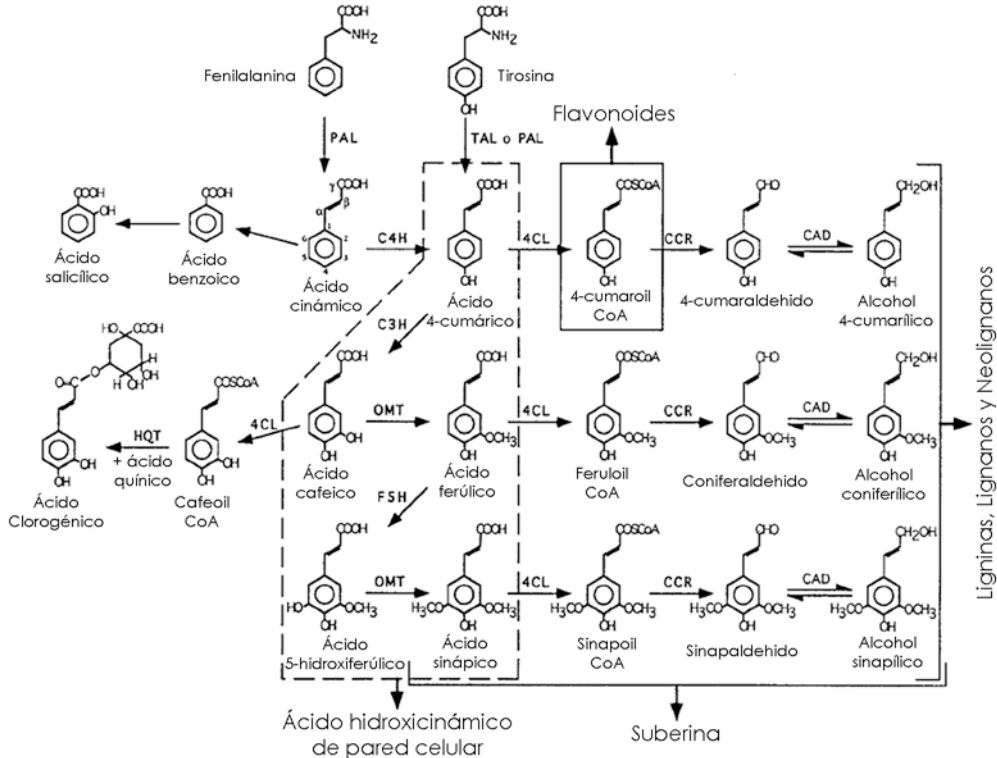


Figura 3. Vía metabólica de los fenilpropanoides. CAD: cinamil alcohol deshidrogenada. CCR: cinamoil-CoA reductasa. C3H: 4-cumara to 3-hidro xilasa. C4H: cina ma to 4-hidro xilasa. 4CL: 4-cumaroil-CoA ligasa. F5H: ferula to 5-hidro xilasa. HQT: hidroxina moil-CoA quina to transferencia. OMT: O-metiltra nsfe rase. PAL: fenila la nina amo nio-lia sa. TAL: tiro sina amo nio-lia sa. Adaptado de (47).

Ha sido ampliamente demostrado que los fenilpropanoides desempeñan un papel importante en los sistemas de defensa vegetal contra patógenos (45, 48). Estos metabolitos pueden presentar actividad antimicrobiana o acumularse como fenoles de pared celular, restringiendo la invasión microbiana (49). Se ha descrito que plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transgénicas, que sobreexpresan el gen de la fenilalanina amonio-licasa (PAL), la principal enzima responsable del flujo metabólico de la vía de los fenilpropanoides, presentan una menor sensibilidad al hongo patógeno *Cercospora nicotianae* (50). En concordancia con estos resultados, plantas transgénicas de tabaco a las que se les ha suprimido la expresión del gen PAL muestran una menor resistencia contra el mismo patógeno (50, 51). De forma similar, la desviación metabólica de sustratos de la vía de fenilpropanoides en papa da lugar a una mayor susceptibilidad al agente causal del tizón tardío, *Phytophthora infestans* (52). Adicionalmente, se ha reportado que plantas transgénicas de papa (nahG), incapaces de acumular ácido salicílico, un compuesto derivado de la vía de los fenilpropanoides, también son más susceptibles a *P. infestans* (53); y que plantas transgénicas de tomate con mayores niveles de ácido clorogénico son más resistentes

tanto al patógeno *P. syringae* como al estrés oxidativo ocasionado por un agente abiótico (paraquat) (54). Sin embargo, actualmente se cuestiona que los compuestos fenólicos tengan un rol defensivo *per se* en la resistencia de plantas a herbívoros (55, 56).

Silenciamiento de ARN en plantas

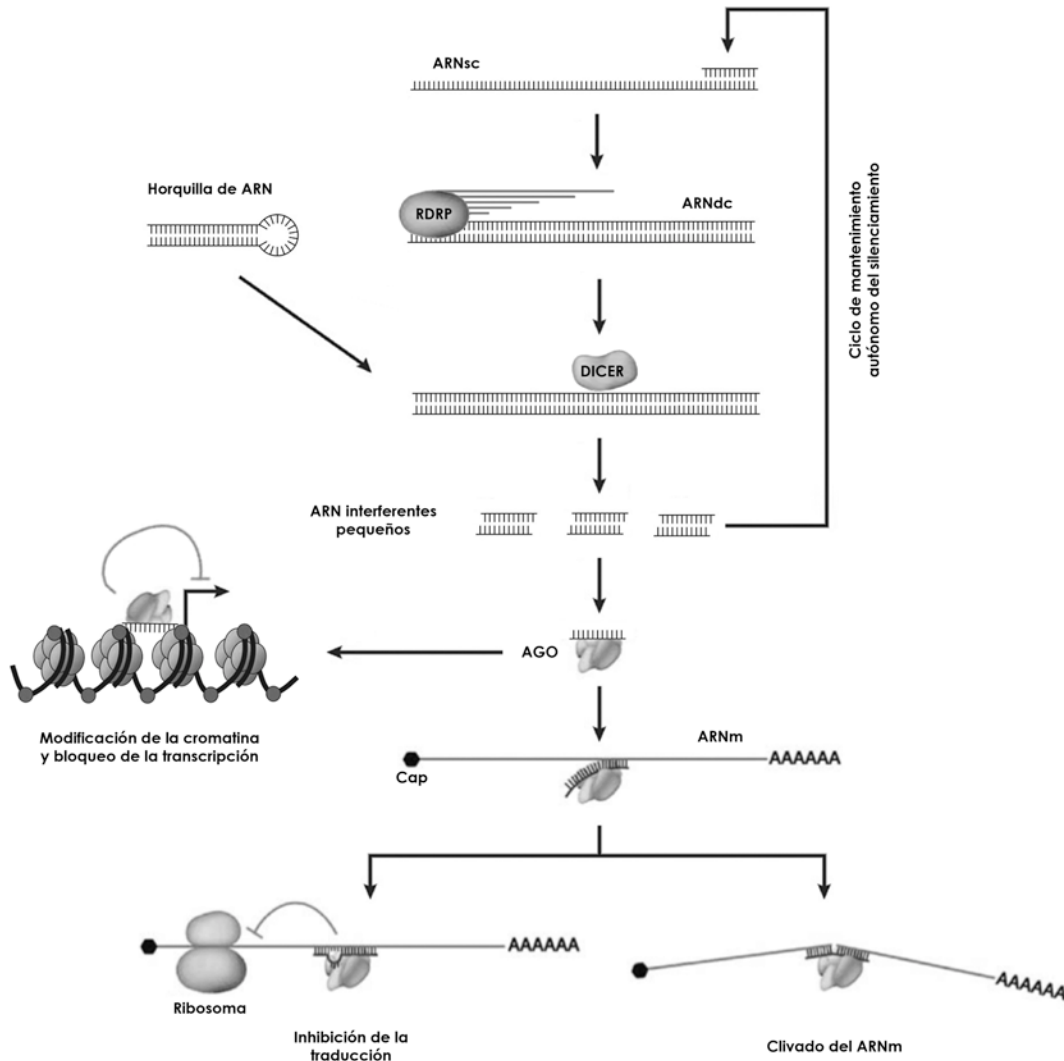
Las plantas han desarrollado una variedad de vías de silenciamiento génico mediado por ARNs pequeños de entre 20 y 25 nucleótidos de tamaño. Estos ARNs pequeños reprimen la expresión de genes con secuencias homólogas a nivel transcripcional, post-transcripcional y traduccional (Figura 4). Estas vías de silenciamiento de ARN desempeñan un papel importante en la regulación del crecimiento y el desarrollo, así como en las respuestas a estrés biótico y abiótico (57-61). El silenciamiento de RNA no es un mecanismo exclusivo del reino vegetal, sino que se encuentra evolutivamente conservado en otras ramas de la vida. A partir de los primeros trabajos de silenciamiento de ARN descritos en plantas (62-64), mecanismos análogos fueron posteriormente hallados en muchos otros organismos eucariotas (65-71).

La aplicación del silenciamiento de ARN con fines biotecnológicos comenzó en los orígenes de la era de la biotecnología vegetal, dando lugar al primer cultivo transgénico comercial: el tomate larga vida “MacGregors Flavr Savr” en 1994. Estos tomates estaban transformados con una copia invertida (o antisentido) del gen de la poligalacturonasa, enzima responsable de la degradación de la pared celular durante la maduración del tomate, por lo que el ablandamiento natural de estos tomates resultaba retrasado (59). Actualmente, el silenciamiento de ARN es una tecnología ampliamente usada en investigación y biotecnología vegetal, tanto como una herramienta útil para analizar la función de genes, como para desarrollar nuevos rasgos en cultivos de interés comercial. El silenciamiento de ARN se ha aplicado en una gran variedad de especies con el fin de silenciar la expresión de genes tanto endógenos como exógenos, y también para alterar vías metabólicas gracias a su capacidad de silenciar múltiples genes en forma simultánea (59, 72-75).

Página siguiente

Figura 4. Modelo simplificado de los mecanismos de silenciamiento de ARN. Las moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc) - producidas por una enzima ARN polimerasa dependiente de ARN (RDRP) a partir de un ARN de simple cadena (ARNsc) o una horquilla de ARN, etc. - son reconocidas y procesadas por las proteínas DICER, dando lugar a la generación de ARNs pequeños (de 20 a 25 nucleótidos). Estos ARNs interferentes pequeños pueden ser reconocidos por proteínas Argonauta (AGO) y dirigir procesos de silenciamiento de la expresión de genes con secuencias homólogas a nivel transcripcional, traduccional y post-transcripcional y, en algunos organismos, pueden también ser utilizados por las RDRPs como oligonucleótidos cebadores para sintetizar ARNdc secundarios, estableciendo así un mantenimiento autónomo del silenciamiento de ARN por retroalimentación. El silenciamiento génico transcripcional está dado por la metilación de histonas de ADN y la subsecuente remodelación de la cromatina generando la inhibición de la transcripción. El silenciamiento génico traduccional puede ocurrir cuando la secuencia del

ARN pequeño es sólo parcialmente complementaria a la secuencia del ARNm, dando lugar a una inhibición de la traducción al interactuar con los ribosomas. El silenciamiento génico post-transcripcional parece ser el más común en plantas y ocurre cuando la secuencia del ARN pequeño es totalmente complementaria a la secuencia del ARNm, permitiendo que AGO catalice la escisión del ARNm. Adaptado de (53, 57, 58, 60, 72, 76, 77).



Sobre el cultivo de papa y la biotecnología

La papa es un cultivo nativo de la región de los Andes correspondiente a Chile, Bolivia, Ecuador y Perú. Si bien, los primeros vestigios de papa poseen entre 8.000 y 2.000 años de antigüedad (78), se cree que este cultivo fue domesticado por primera vez alrededor del año 200 A. C. (79). La papa fue uno de los principales cultivos del pueblo Inca y posteriormente, fue introducida en Europa a fines del Siglo XVI, luego de la conquista del Perú (www.potato2008.org). Actualmente, la papa es uno de los tres cultivos de mayor producción mundial (80), es cultivado en aproximadamente 125 países y más de mil millones de personas la consumen de forma diaria (81). Dado que

la demanda de cultivos seguirá aumentando a consecuencia de la creciente población humana, la papa es considerada una de las principales alternativas a los cereales para resolver los problemas de alimentación de la población mundial (80, 82). Reafirmando esto, las Naciones Unidas declaró a el 2008 como "Año Internacional de la Papa" (www.un.org/depts/dhl/resguide/r60.htm). Aparte de la importancia del cultivo de papa como alimento humano y animal (83), su almidón es utilizado para producir plásticos biodegradables y combustible (etanol), además de ser también un recurso crítico para la industria farmacéutica, textil, maderera y papelería (84-87).

El pardeamiento enzimático es un problema importante para los productores de papa, ya que hasta el 20 % de la producción puede verse comprometida durante la cosecha y los posteriores procedimientos de transporte, almacenamiento y distribución (88). Este fenómeno reduce la aceptación de los consumidores, ya que afecta negativamente la apariencia y la calidad nutricional de los tubérculos (41). Además, el pardeamiento enzimático es especialmente problemático para la industria de la papa fresca, donde su prevención conlleva a un aumento de los costes de producción. Actualmente, la inhibición del pardeamiento puede realizarse mediante el uso de aditivos naturales o químicos, siendo los aditivos con sulfitos los más utilizados en muchos países; aún existiendo evidencias de que pueden resultar dañinos para la salud humana (89). Recientemente se ha sugerido que la selección directa para diferentes combinaciones alélicas del gen *POT32* y el estudio de biomarcadores metabólicos podrían ayudar en la obtención de cultivares con menor susceptibilidad al pardeamiento enzimático (90, 91). Sin embargo, considerando que el desarrollo de nuevas variedades de papa por mejoramiento convencional requiere de al menos 15 años, y que este proceso está limitado al acervo genético de la especie o de especies estrechamente relacionadas (81), la ingeniería genética resulta una alternativa atractiva para mejorar la calidad del cultivo de papa. De hecho, desde el informe pionero donde se describió que la expresión de genes antisentido de *PPO* era capaz de reducir el pardeamiento enzimático en tubérculos (39), otros trabajos han expuesto estrategias similares para silenciar esta enzima con el fin de mejorar la calidad alimenticia en vegetales (92, 93).

Seguridad y percepción de los cultivos biotecnológicos

Si bien la aceptación de los cultivos biotecnológicos de primera generación ha ido en aumento en todo el mundo desde 1996 (94), preocupaciones entre científicos, consumidores y autoridades gubernamentales sobre la seguridad de los cultivos transgénicos han conducido al desarrollo de los conceptos de "seguridad comparativa" y de "equivalencia sustancial" (95). El concepto de seguridad comparativa comprende el carácter analítico de la primera etapa de la evaluación de la seguridad alimentaria de los cultivos biotecnológicos, en combinación con posteriores evaluaciones toxicológicas y nutricionales (95). El concepto de equivalencia sustancial, considerado parte de la evaluación de seguridad comparativa (95), está basado en la idea de que los organismos parentales pueden servir como base de comparación para evaluar la seguridad de un organismo genéticamente modificado (96). La lógica de esta comparación está basada en la suposición de que los cultivos homólogos convencionales son generalmente

considerados seguros, debido a su historial de uso. El criterio es, pues, no alcanzar un nivel de seguridad absoluta, sino establecer el mismo nivel de seguridad que es aceptado para los alimentos tradicionales. Con el fin de aplicar estos conceptos, es indispensable realizar estudios comparativos del metabolismo, la fotosíntesis, el crecimiento y el rendimiento (97) y, si el cultivo transgénico ha sido substancialmente modificado, o existen incertidumbres con respecto a la posible ocurrencia de efectos tóxicos o nutricionalmente no deseados, debe considerarse la realización de estudios de alimentación en un organismo animal modelo (98). Para evaluar la ocurrencia de posibles alteraciones no intencionales, actualmente se utilizan análisis de transcriptómica, proteómica y metabolómica (99), siendo esta última la más útil (100), ya que permite obtener una visión general del metabolismo primario y sus modificaciones (100-102). Otras cuestiones importantes que necesitan ser abordadas son los posibles riesgos de toxicidad o alergenicidad que pudieran derivarse del consumo del cultivo genéticamente modificado (98, 103). En este sentido, los estudios bioinformáticos y de alimentación en animales cumplen un papel centinela para identificar posibles efectos no deseados de índole alérgica, toxicológica y nutricional (98). Por otro lado, los estudios de análisis sensoriales son esenciales para el desarrollo de cualquier nuevo alimento y fundamentales en la evaluación de cultivos transgénicos con mejoras cualitativas (104). Los estudios sensoriales también pueden contribuir significativamente a la percepción pública y aceptación de los alimentos genéticamente modificados (104), especialmente teniendo en cuenta la creciente demanda de una mejor calidad de alimentos por parte de los consumidores (105).

Se estima que la próxima generación de cultivos biotecnológicos, con beneficios perceptibles tanto por productores como consumidores, mejorará la percepción pública de los cultivos genéticamente modificados (106). Sin embargo, mientras esta nueva generación de cultivos biotecnológicos se está desarrollando, es importante establecer criterios apropiados tanto para evaluar su seguridad como su calidad. En contraste con la primera generación de cultivos biotecnológicos, donde únicamente se modifica una característica del cultivo y, teniendo en cuenta que las modificaciones introducidas hasta ahora no se considera que tengan efectos significativos sobre el metabolismo, la próxima generación de cultivos biotecnológicos añadirá un nuevo nivel de complejidad inherente a los mecanismos subyacentes a sus características. Los estudios científicos destinados a dar respuesta a estas preocupaciones seguramente contribuirán a aumentar la conciencia pública sobre los beneficios y la seguridad de la biotecnología vegetal.

Darwiniana *

Inmersas en su ecosistema y confinadas por su naturaleza sésil, las plantas deben hacer frente a un sinnúmero de condiciones desfavorables sin contar con la opción del escape. Como resultado, durante su evolución, las plantas han desarrollado una serie de estrategias que les permiten responder a una amplia gama de situaciones de estrés (107). Estos múltiples mecanismos fueron emergiendo y apilándose a lo largo de

* Tomado de Stephen Jay Gould (1977) *Desde Darwin: reflexiones sobre historia natural* (Ever Since Darwin. *Reflections in Natural History*). W. W. Norton & Company, New York.

su historia evolutiva, siendo *moldeados* y *retenidos* por la acción de presiones de selección hasta alcanzar un equilibrio entre aquellos que en su conjunto mejoran la aptitud biológica (fitness) de las plantas. A modo de representación gráfica, podemos imaginar a las plantas como navajas suizas multiuso con un juego de diversas herramientas acumuladas durante la evolución que utilizan para solucionar sus problemas al mejor estilo de Mac Gyver**.

Al ser la evolución un proceso no dirigido, en algunos casos, estos distintos mecanismos podrán interactuar dando resultados neutrales o sinérgicos. Alternativamente, también podrán existir casos en donde estos mecanismos sean capaces de interferirse unos a otros, reduciendo su eficacia. Por ende, no es alocado pensar que algunos componentes de esta pléthora de mecanismos serán conservados a lo largo de la evolución a pesar de que generen este tipo de interferencias negativas si al final del día, contar con ambos mecanismos, proporciona una mejor adaptación al medio ambiente. Por lo tanto, si al eliminar experimentalmente alguno de estos componentes/mecanismos, nos encontramos con que la aptitud biológica del organismo modificado es superior a la del organismo parental silvestre, estaremos frente a una fuerte evidencia de que el componente/mecanismo en cuestión se hubiera perdido a lo largo de la evolución a no ser que fuera mantenido por presiones de selección lo suficientemente fuertes como para justificar su permanencia. Este razonamiento es fundamental para la comprensión del modelo sobre el rol biológico de las polifenol oxidasas propuesto en esta tesis.

Finalmente, considerando la relevancia intelectual y práctica de las enzimas polifenol oxidasas, esta tesis versa tanto sobre aspectos biológicos como prácticos de su estudio.

** Mac Gyver fue una serie de televisión norteamericana de los años 80-90 en la que su protagonista, Mac Gyver, tenía la habilidad de salir de cualquier apuro utilizando elementos simples y su inseparable navaja suiza multiuso.

Objetivos

Esta tesis constó de dos objetivos generales:

- 1) Un objetivo de carácter práctico, que consistió en desarrollar, caracterizar y evaluar la seguridad de plantas de papa (*Solanum tuberosum*, variedad Spunta) transgénica con bajos niveles de actividad polifenol oxidasa (PPO).
- 2) Un objetivo de índole intelectual, que consistió en la empresa de generar nuevo conocimiento acerca de las enzimas PPO para intentar contribuir a su entendimiento.

Para cumplir con el primer objetivo se propuso:

- I. Desarrollar un plásmido para silenciar múltiples miembros de la familia génica de PPO de papa.
- II. Obtener plantas transgénicas de papa transformadas con el plásmido de silenciamiento para la familia genes de PPO de papa.
- III. Caracterizar las plantas transgénicas obtenidas en condiciones de invernadero.
- IV. Evaluar la inocuidad alimentaria del cultivo transgénico desarrollado.

Para cumplir con el segundo objetivo se propuso:

- I. Estudiar las implicancias metabólicas de reducir la actividad de PPO en un vegetal.
- II. Evaluar las implicancias ecológicas de reducir la actividad de PPO en un vegetal.
- III. Estudiar la evolución de las enzimas PPO.

Materiales y Métodos

Declaración ética

Todos los procedimientos experimentales comprendiendo animales y humanos fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET), en conformidad con la declaración de Helsinki y la Directiva RD_Nº 1047-1005 para la investigación ética del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) de Argentina.

Construcción del vector de silenciamiento y obtención de las plantas transgénicas -PPO

Para la construcción del vector de silenciamiento de polifenol oxidasas (PPO) se optó por un diseño de horquilla, ya que este tipo de estrategia permite silenciamientos altamente eficientes en plantas (108, 109). El cassette de silenciamiento (Véase Figura 6) contiene un promotor CaMV 2x35S (promotor 35s del virus del mosaico del coliflor), seguido de un fragmento de 376 nucleótidos (ppoi) correspondiente a la región 5' del gen de PPO de papa (número de acceso de GenBank: U22921) en orientación sentido (ppoi S), un intrón procesable de 840 nucleótidos correspondiente al intrón 1 de la Fosfoenolpiruvato carboxilasa 1 de papa, (ppc1i1, número de acceso de GenBank: X90982), el fragmento ppoi en orientación antisentido (ppoi A) y un terminador NOS (terminador de la nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens*). Los fragmentos sentido y antisentido de ppoi y el intrón ppc1i1 fueron obtenidos mediante amplificación por PCR (de sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction: Reacción en Cadena de la Polimerasa), usando ADN genómico de papa variedad Spunta como molde. El fragmento ppoi sentido fue amplificado utilizando los iniciadores Pot32sense Fwd (5'-CCACTCGAGTGAGCAATAATGGCAAGCTTG TG-3') y Pot32sense Rev (5'-CCGGATATCATCATCAGGCTTAGGCGCGC-3'). El fragmento ppc1i1 fue amplificado utilizando los iniciadores Ppc1i1Fwd (5'-GTATGCATTTTCCCAATTTATG-3') y Ppc1i1Rev (5'-ACCTAATGTGAGATGAAAATATC-3'). El fragmento ppoi antisentido fue amplificado utilizando los iniciadores Pot32antisense Fwd (5'-AAAAC TGCAGCTTTC TC CA

TATCATCAGGCTTAG-3') y Pot32antise nse Rev (5'-TCCTCTAGATGAGCAATAATGGCAAGCTTGTG-3'). Estas reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 20 μ l y las condiciones de ciclado fueron 95 °C durante 10 min seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 55 °C durante 1 min, 72 °C durante 1 o 2 min y un paso final de extensión de 10 min a 72 °C. El cassette de silenciamiento fue construido utilizando técnicas clásicas de biología molecular y utilizando bacterias *Escherichia coli* DH5 α F [F/endA1 hdR17(rk- mk+) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 (Nal^r) relA1 Δ (lacZYA-argF)U169 (m80lacZAM15)] o DH10B [F- mrcA Δ (mrr-hdRMS-mcrBC) Δ 80dlacZ Δ AM15 Δ lacX74 deoR recA1 endA1 ara Δ 139D (ara, leu) 7697 galU galK λ - rpsLnupG] e introducido dentro del vector binario pPZP-Hyg (110). Subsecuentemente, la construcción fue transferida a la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 [GV3101:pM90RK pMP90RK (pTC58 Δ T-DNA)] por electroporación. Los cultivos de *Escherichia coli* se mantuvieron a 37 °C y los cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* se mantuvieron a 28 °C en medios LB (Luria-Bertani) y placas LB-agar (111), adicionados con los antibióticos correspondientes.

Las plantas transgénicas se obtuvieron por transformación de discos de tubérculo de papa (*Solanum tuberosum*, variedad Spunta) libres de patógenos mediante co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens* (112), con la adición de 10 mg/L de acetosiringona al medio de cultivo para potenciar la infectividad de *A. tumefaciens* (113). Los potenciales brotes transgénicos se seleccionaron en medio sólido conteniendo 4 mg/L de higromicina. Las líneas transgénicas fueron micropropagadas *in vitro* en medio sólido MS-agar (114), suplementado con 2-3 % sacarosa. Las plantas *in vitro* se mantuvieron en cuartos de cultivo a 25 °C y con fotoperíodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad. Las plantas regeneradas *in vitro* fueron trasladados a macetas de 4 litros y mantenidas bajo condiciones de invernadero (25 \pm 3 °C). Durante el período de invierno, la luz natural se suplementó con lámparas de sodio que proporcionaban 100-300 μ mol/s/m² con un fotoperíodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad.

Extracción de proteínas, ensayo de actividad PPO y análisis de proteínas por inmunquímica (western blot)

Los extractos proteicos se obtuvieron a partir de tejidos de hojas o tubérculos homogeneizados en una proporción de 200 mg de peso fresco por cada 1 ml de solución de homogeneización (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 2 mM β -mercaptoetanol (β -Me); 0,1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF); 1 μ g/ml leupeptina; 3 % [p/v] polivinilpirrolidona (PVPP); 1 mM ácido etilendiaminotetraacético disódico (Na₂ EDTA) y 20 % glicerol). El homogenato se centrifugó a 10000 \times g a 4 °C durante 20 min y el sobrenadante se utilizó para la cuantificación de proteínas, la evaluación de la actividad de PPO y la evaluación de la presencia de la enzima PPO por western blot. La cantidad de proteína total se cuantificó por el método de Bradford (115), usando albúmina sérica bovina como estándar. Los ensayos de actividad de PPO se realizaron con 2 μ g de proteína en un volumen de 1000 μ l de solución 20 mM fosfato (pH 6) conteniendo 4 mM MgCl₂ y 10 mM L-DOPA (3-(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina). La actividad de PPO fue seguida por el cambio en la absorbancia a 475 nm debido a la oxidación de la L-DOPA. Se añadió catalasa (84 U/ μ l) a las muestras antes del análisis para evitar la oxidación del sustrato debida a la actividad de peroxidasas (34). Los

ensayos de actividad en gel se realizaron con 20 µg de proteínas resueltas en geles nativos de poliacrilamida (PAGE) y solución Tris-base (3 g Tris-base y 14,4 g/L de glicina pH 8,3) según lo descrito por Niranjana-Raj *et al.* (116), con un gel de separación de 8 % (p/v) y un gel de concentración de 5 % (p/v). La corrida electroforética se realizó a un voltaje constante de 100 V. La medición de actividad de PPO en gel se realizó en un agitador rotatorio lavando varias veces los geles en agua desionizada e incubándolos luego en solución fosfato de sodio 100 mM (pH 7,0) conteniendo 10 mM de L-DOPA. Una vez que se observaron bandas oscuras en el gel, indicando actividad de PPO, se inhibió la reacción con NaN₃ en una concentración final de 2 mM. Los análisis de inmunquímica (western blot) se realizaron según lo descrito por Laemmli (117), desnaturalizando 10 µg de proteína por ebullición durante 5 min en solución de carga (300 mM Tris-HCl pH 6,8; 10 % dodesulfato sódico (SDS); 0,1 % azul de bromofenol (BPB); 150 mM ditio treitol (DTT) y 50 % glicerol) y resolviendo los extractos proteicos por SDS-PAGE e inmovilizándolos sobre membranas de polivinilideno-fluoruro (PVDF) (Perkin Elmer, EE.UU.). La presencia de PPO se detectó utilizando anticuerpos policlonales de conejo anti-PPO (118) en combinación con anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados a fosfatasa alcalina. La igualdad de cargas fue verificada corriendo en paralelo geles teñidos con azul de Coomassie.

Análisis de ADN

El ADN se obtuvo según lo descrito por Edwards (119) para el análisis de PCR y según lo descrito por Murray (120) para el análisis de Southern blot (121). El número aproximado de copias de la construcción de silenciamiento presentes en las líneas PPO se determinó por el análisis de Southern blot (121), utilizando 10 µg de ADN genómico (ADNg) digerido por 5 h a 37 °C con 20 U de la enzima de restricción Hind III (New England Biolabs, EE.UU.). Las muestras de ADNg digerido fueron comidas por 12 h a 35 v en un gel de agarosa 0,8 % de 21 cm de largo. Las muestras fueron transferidas por vacío durante 4 h a una membrana Amersham Hibond+ (General Electric Healthcare, Reino Unido). Un fragmento de 543 pares de bases del promotor 2x35S amplificado por PCR con los oligonucleótidos 35S-01566Fwd (5'-TTACAGAGGCAAGAGCAGCA-3') y 35S-01567Rev (5'-GAAGCAAGCCTTGAATCGTC-3') y marcado con α³²P]-dATP fue utilizado como sonda. Esta reacción de PCR se realizó en un volumen de 20 µl y las condiciones de ciclado fueron 95 °C durante 10 min seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 58 °C durante 30 s, 72 °C durante 1 min y un paso final de extensión de 10 min a 72 °C. La membrana fue prehibridada con 14 ml de solución Amersham Rapid-Hyb (General Electric Healthcare, Reino Unido) por 2 h y posteriormente se agregaron 1,5 millones de cuentas por minuto (CPM) de la sonda 2x35S por cada 1 ml de solución Amersham Rapid-Hyb (21 millones de CPMs totales). La membrana se hibridó por 12 h a 65 °C en un horno rotatorio de hibridación Amersham (General Electric Healthcare, Reino Unido) y luego fue lavada con 2X SSC (Solución de citrato de sodio: 300 mM NaCl y 30 mM citrato de sodio) suplementado con 0,1 de % SDS y expuesta por 48 h a una placa radi sensible que fue revelada utilizando un equipo Typhoon (General Electric Healthcare, Reino Unido).

La integridad del cassette de silenciamiento introducido en las plantas transgénicas se determinó por PCR utilizando los oligonucleótidos 2x35SFwd 3' (5'-ATCTCCACTGACGTA

AGGGA-3'); NOS-tRev5' (5'-TGATAATCATCGCAAGACCG-3'); PPC1i1Fwd (5'-GAGAGGATATCAAAGAAACAG-3') y PPC1i1Rev (5'-GCTCATAAACACTCTTGGACC-3'). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1 % y teñidos con bromuro de etidio. Estas reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 20 μ l y las condiciones de ciclado fueron 95 °C durante 10 min seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 55 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min y un paso final de extensión de 10 min a 72 °C.

Para reducir la variabilidad en la calidad del ADN entre las muestras de los experimentos de infección con *Phytophthora infestans*, se desarrolló un único protocolo para aislar el ADNg de cultivos de *P. infestans* puros y de tubérculos y hojas de papa tanto infectados como no infectados. Las muestras se homogeneizaron mecánicamente a razón de 10 mg de peso fresco cada 1 ml de solución de lisis (200 mM Tris-HCl pH 8; 100 mM NaCl; 25 mM Na₂ EDTA; 3 % [p/v] SDS y 125 mg/ml de proteínasa Kañada inmediatamente antes del uso). Los extractos se incubaron a 37 °C durante 1 h y se mezclaron con un volumen de solución de extracción (100 mM Tris-HCl pH 8; 2,5 M NaCl; 20 mM Na₂ EDTA; 2 % [p/v] CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) y 2 % [v/v] β -me agregado antes de su uso). Los homogenatos se incubaron a 65 °C durante 15 min, se mezclaron con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico [25:24:1] y se centrifugaron a 10000 \times g a temperatura ambiente durante 10 min. Las fases acuosas fueron transferidas a tubos nuevos y se mezclaron con 100 μ g/ml de RNasa A. Las muestras se incubaron 30 min a 37 °C y luego se adicionaron 0,25 volúmenes de 2 M NaCl-4 % [p/v] PEG₆₀₀₀ y 0,7 volúmenes de alcohol isopropílico. Las mezclas fueron centrifugadas a 15000 \times g a temperatura ambiente durante 20 min y el sobrenadante fue descartado. Después de la centrifugación, los precipitados fueron lavados con 1 ml de etanol 70 % (v/v) frío, secados al aire y resuspendidos en 50 μ l de solución TE (10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8). Posteriormente, las muestras purificadas fueron cuantificadas por espectroscopia utilizando un aparato Nano Drop (Thermo Scientific, EEUU.) y su integridad fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa 1 %. Las muestras de ADN fueron almacenadas a -20 °C hasta ser usadas.

Monitoreo de *Phytophthora infestans* por PCR cuantitativa

Los oligonucleótidos EF-1 α Fwd (5'-TGAGGCAAACGTGCTGCTC-3') y EF-1 α Rev (5'-TGGA AACACCAGCATCACAC-3') diseñados en base a la secuencia del gen del Factor de elongación 1- α de *S. tuberosum* (EF-1 α , número de acceso de GenBank: AB061263.1) se utilizaron para cuantificar el ADNg de *S. tuberosum*. Los oligonucleótidos PiO8-3-3Fwd (5'-CAATTCGCCACTTCTTCTGA-3') y PiO8-3-3Rev (5'-GCCCTTCTGCCCTCAAGAAC-3') (53, 122) diseñados sobre secuencias altamente repetitivas del genoma de *P. infestans* (123) se utilizaron para cuantificar el ADNg de *P. infestans*. Las condiciones de cada PCR cuantitativa (qPCR) fueron optimizadas en lo que respecta a la enzima Taq Platinum ADN polimerasa (0,5 U por reacción para ambos amplicones. Invitrogen, EEUU.), los oligonucleótidos (1 μ M para EF-1 α y 0,75 μ M para PiO8. Alpha DNA, Canadá), la concentración de MgCl₂ (3 mM para EF-1 α y 2 mM para PiO8), la concentración de la mezcla de dNTPs (0,5 mM para ambos amplicones) y las temperaturas de adquisición de la señal de fluorescencia. Las qPCRs se realizaron en

un volumen total de 20 μ l, usando SYBR Green I (1 μ l por reacción de una dilución 1/1000 en dimetil sulfóxido (DMSO) de 10000 X SYBR Green I Invitrogen, EE.UU.) en un equipo Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Sciences, Australia). Las condiciones de ciclado fueron de 95 °C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 10 s a 95 °C, 15 s a 60 °C (para *EF-1 α*) o 58 °C (para *PiO8*), 20 s a 72 °C y 1 s para la adquisición de la señal de fluorescencia a temperaturas de 79 °C (para *EF-1 α*) o 76 °C (para *PiO8*). Tres réplicas se llevaron a cabo para cada muestra y los valores promedio fueron utilizados. Las reacciones de qPCR para cada fragmento se realizaron junto a curvas estándar de dilución de ADNg (124). Las eficiencias de las qPCRs para *EF-1 α* y *PiO8* se obtuvieron mediante curvas estándar hechas por triplicado con ADNg de *S. tuberosum* y ADNg de *P. infestans*, respectivamente. Las eficiencias de las qPCRs se calcularon según la ecuación: $E = [(10^{(-1/\text{pendiente})}) - 1] \times 100$. Los valores de *PiO8* fueron normalizados con los valores correspondientes de *EF-1 α* para cada muestra individual. Los valores promedio obtenidos a los 6 días post inoculación (dpi) se fijaron en 100 % y todos los demás valores se normalizaron con los valores obtenidos para las muestras obtenidas a 6 dpi.

Análisis de ARN

El ARN total se extrajo utilizando Trizol (Invitrogen, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante y se cuantificó mediante espectroscopia utilizando un aparato NanoDrop (Thermo Scientific, EE.UU.). La integridad del RNA fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa 1 %. Las muestras de ARN fueron tratadas con DNasa I libre de RNasas (Promega, EE.UU. o Applied Biosystems/Ambion, EE.UU.) según las instrucciones de los fabricantes y la síntesis de ADNc (ADN copia) se llevó a cabo utilizando el Kit de transcripción inversa Superscript III (Invitrogen, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante, utilizando oligonucleótidos hexámeros aleatorios y 2 μ g de ARN total. La expresión de los miembros de la familia de genes *PPO*: *POB2* (número de acceso de GenBank: U22921); *POB3* (número de acceso de GenBank: U22922) y *NOR333* (número de acceso de GenBank: M95196), fue monitoreada por RT-qPCR (transcripción inversa y PCR cuantitativa) utilizando los oligonucleótidos *POB2rtFwd* (5'-CATGCAAGGTACC AATAAATACG-3') y *POB2rtRev* (5'-GCAACACCATAAAGACCACCT-3'); *POB3rtFwd* (5'-TTCTAATAGTGTGACCAAACC-3') y *POB3rtRev* (5'-GCATTAGCAACACCATAAAGACC-3'); y *NOR333rtFwd* (5'-AAGAAGGTGTGATGTGTCATAC-3') y *NOR333rtRev* (5'-CGGATGCGGAGTTAGTCAT-3'), respectivamente. Los oligonucleótidos *CuDomPPOfwd* (5'-TTAAGCAACAAGCTAATATACATGTGC-3') y *CuDomPPOrev* (5'-TCATGGAACGGGAA GAAAAGCC-3'), diseñados para amplificar el dominio conservado de unión a cobre A (*CuDomA*) de los genes de *PPO*, fueron utilizados para evaluar conjuntamente la abundancia relativa de todas las isoformas de ARNm de *PPO*. La expresión de los genes de la Fenilalanina amonio-liase 1 (*PAL-1*, número de acceso de GenBank: X63103.1), la Proteína relacionada con la patogénesis 1 (*PR-1*, número de acceso de GenBank: AJ250136.1 y AY050221.1) y la Quitinasa de clase 2 (*CHIA*, número de acceso de GenBank: U49970.1, U49969.1, AF024537.1 y AF024538.1) fue monitoreada por RT-qPCR utilizando los oligonucleótidos *PAL-1Fwd* (5'-GCAAACCTIGACGCTGATGAA-3') y *PAL-1Rev* (5'-CGTTCATCACTTCAGCGAAA-3'); *PR-1Fwd* (5'-TGGTACCAACCAATGTGCA A-3') y *PR-1Rev* (5'-AATGAACCACCATCCGTGT-3'); y *ChtAFwd* (5'-GCCAGGGTACGGTGTCAATA-3') y *ChtARev* (5'-TTCACCAGTGGGACCATCA-3'),

respectivamente. El gen del Factor de elongación 1- α (*EF-1 α* , número de acceso de GenBank: AB061263.1) de *S. tuberosum* se utilizó como control endógeno ya que se ha demostrado que es el gen más adecuado para la normalización de la expresión génica en papa por RTqPCR (125). La expresión del gen *EF-1 α* se midió utilizando los oligonucleótidos EF-1 α Fwd (5'-TGAGGCAAACGTGCTGCTC-3') y EF-1 α Rev (5'-TGGAAACACCAGCATCACAC-3').

Las condiciones de RTqPCR fueron optimizadas en lo que respecta a la enzima Taq Platinum ADN polimerasa (0,5-1,5 U. Invitrogen, EEUU.), los oligonucleótidos (0,5-1 μ M. Alpha DNA, Canadá), la concentración de MgCl₂ (2-3 mM), la concentración de la mezcla de dNTPs (0,2-0,5 mM. New England Biolabs, EEUU.) y las temperaturas de adquisición de la señal de fluorescencia (72-79 °C). Las reacciones de RTqPCR se realizaron en un volumen total de 20 μ l, usando SYBR Green I (1 μ l por reacción de una dilución 1/1000 en dimetil sulfóxido (DMSO) de 10000 X SYBR Green I Invitrogen, EEUU.) en un equipo Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Sciences, Australia) y con ~10 ng de ADNc como molde. Las condiciones de ciclado fueron de 95 °C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 10-30 s a 95 °C, 15-30 s a 55-60 °C, 20-30 s a 72 °C y 1 s a la temperatura óptima de adquisición de la señal de fluorescencia. Todos los amplicones fueron amplificados por triplicado a partir de la misma preparación de ARN y el valor promedio fue utilizado. Las reacciones de RTqPCR para cada gen se realizaron junto a curvas de diluciones estándar de ADNc total (124). Las eficiencias de las RTqPCRs se obtuvieron mediante curvas estándar hechas por triplicado con ADNc de *S. tuberosum*. Las eficiencias de las RTqPCRs se calcularon según la ecuación: $E = [(10^{-(1/\text{pendiente})}) - 1] \times 100$. Todos los valores de RTqPCR se normalizaron con los niveles endógenos del gen de referencia *EF-1 α* y los valores de expresión de plantas silvestres (WT, de sus siglas en inglés Wild Type) no infectadas. Las condiciones de reacción de RTqPCR (transcripción reversa seguida de PCR) fueron las mismas que las utilizadas para RTqPCR pero con solo 25 ciclos de reacción.

Análisis bioinformático de reactividad cruzada con alérgenos

Para evaluar la probabilidad de que posibles secuencias aminoacídicas derivadas de la construcción introducida en las plantas transgénicas tuvieran homología con alérgenos conocidos, la secuencia de la horquilla de silenciamiento fue evaluada en sus 6 marcos de lectura posibles usando métodos bioinformáticos (126-129). Estas secuencias nucleotídicas fueron traducidas a secuencias proteicas utilizando la herramienta ExpASy (www.expasy.ch/tools/dna.html). Se realizaron búsquedas en las bases de datos SDAP (Structural Database of Allergenic Protein; fermi.utmb.edu/SDAP/sdap_who.html) y FARRP (Food Allergy Research and Resource Program; www.allergenonline.com) (127) mediante alineamientos FASTA completos y alineamientos FASTA con una ventana deslizante de 80 aminoácidos (126, 129). Por último, se realizó una búsqueda utilizando BLAST para identificar cualquier similitud significativa con secuencias de alérgenos recientemente reportadas que no se encontraran en las bases de datos SDAP o FARRP. Esta búsqueda se realizó en la base de datos de secuencias no redundantes del NCBI-Entrez Protein Database (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (126, 129).

Evaluación de productividad

Los datos de productividad se obtuvieron a partir de 2 experimentos realizados en condiciones de invernadero donde las líneas -PPO se cultivaron lado a lado con los controles WT en macetas de 4 litros. Se utilizaron 25 plantas por línea y los tubérculos fueron cosechados cuando las plantas se neciearon (en invierno: septiembre del 2007 y en verano: marzo del 2008), después de aproximadamente 4 meses de crecimiento.

Medición de parámetros fotosintéticos

La captación neta de CO₂, la conductancia estomática y la transpiración en hojas se midió utilizando un equipo LI-6400 (Li-Cor, EEUU.) bajo condiciones de invernadero e irradiación fija (1500 μmol/m²/s). Los parámetros fueron calculados con el programa suministrado por el fabricante. Las mediciones se realizaron en hojas completamente expandidas del tercer nodo (contando desde la parte superior de la planta hacia abajo) y se muestrearon 6 plantas por cada línea.

Análisis metabólico

Los estudios metabólicos se realizaron en colaboración con el Dr. Fernando Carrari y la Dra. Mariana López (Instituto de Biotecnología, Instituto Nacional de Tecnología Agrícola, INTA-Castelar, Argentina).

Los niveles de almidón, sacarosa, fructosa y glucosa se determinaron por espectrofotometría de acuerdo a lo descrito por Fernie *et al.* (130). Los niveles de todos los demás metabolitos fueron cuantificados por GC-MS (Cromatografía gaseosa acoplada a espectroscopía de masas), siguiendo el protocolo descrito por Roessner *et al.* (131). Las muestras de tubérculos (4-6 lotes de muestras mezcladas provenientes de 25 plantas por genotipo) se tomaron al tiempo de la cosecha y fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C hasta su análisis. Las extracciones se realizaron mediante una rápida homogenización del tejido en nitrógeno líquido y el agregado de la solución de extracción. El tejido de papa (~100 mg) se extrajo en 1400 μl de metanol, según lo descrito por Roessner *et al.* (132) con las modificaciones propuestas por Lisc *et al.* (133); 60 μl de un patrón interno (0,2 mg/ml de ribitol en agua) fueron agregados para poder realizar las cuantificaciones. La mezcla se extrajo durante 15 min a 70 °C y se agitó enérgicamente luego de agregar un volumen de agua, se centrifugó a 2200 × g y posteriormente se secó en vacío. El precipitado se resuspendió y derivatizó durante 120 min a 37 °C (en 60 μl de 30 mg/ml de clorhidrato de metoxiamina en piridina), seguido de un tratamiento de 30 min a 37 °C (con 120 μl de N-metil-N-[trimetilsilil]-trifluoroacetamida) y 1 μl de cada muestra se inyectó en modo “splitless”, utilizando una técnica de aguja caliente. La cromatografía de gases-tiempo de vuelo-

espectrometría de masas (GC-TOF-MS) fue realizada con un inyector automático AS 2000, un cromatógrafo de gases GC 6890N (Agilent Technologies, EEUU.) y un TOF-espectrómetro de masas Pegaso III (LECO Instruments, EEUU.). El espectrómetro de masas fue calibrado según las recomendaciones del fabricante, utilizando tris-(perfluorobutil)-amina (CF43). La cromatografía gaseosa se realizó en una columna capilar MDN-35, de 30 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interior y una película de 0,25 mm de espesor (Macherey-Nagel equivalente). La temperatura de inyección se fijó en 230 °C, la de interfaz a 250 °C y la de la fuente de iones a 200 °C. Se utilizó Helio 5.0 como gas portador, con un caudal de 2 ml/min. El análisis se realizó en el marco del siguiente programa de temperaturas: 2 min de calentamiento isotérmico a 80 °C, seguido de una rampa de 15 °C por minuto hasta alcanzar los 330 °C y manteniendo esta temperatura durante 6 minutos. Los espectros de masas se registraron con una resolución de 20 exploraciones (scans) por segundo con un campo de barrido de 70 a 600 m/z. Tanto los cromatogramas como los espectros de masas se analizaron utilizando el programa Chroma-TOF, versión 3.00 (LECO Instruments, EEUU.) de procesamiento de cromatografía de masas y deconvolución espectral. La identificación y cuantificación de los compuestos detectados en el experimento de perfiles metabólicos se realizó utilizando el programa TagFinder 4.0 (134). Dado que los conjuntos de datos medidos en diferentes momentos no son directamente comparables debido a la variación en el tiempo de los parámetros de calibración de la máquina GC-MS, los datos se normalizaron usando el control WT de cada lote como una medida de referencia.

Estudios alimentarios en ratones

Los estudios de seguridad alimentaria se realizaron en colaboración con la Tèc. Vanina Rodríguez y gracias al asesoramiento de las Dras. Daniela Noain, Marcela Pepper, Estefanía Bello Gay (Laboratorio de Animales Transgénicos, Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, INGEBI-CONICET, Buenos Aires, Argentina), Laura Schreier, Graciela López (Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina) y Silvia Vanzulli (Instituto de Investigaciones Oncológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina).

Se realizaron 2 estudios (replicas) con un total de cuarenta ratones hembra BA1B/c de 8 semanas de edad (Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina). Los animales fueron alojados y mantenidos bajo condiciones estándar (ciclo de luz-oscuridad de 12 h, habitación con aire acondicionado, temperatura de 21 ± 1 °C y humedad relativa del 60 ± 10 %), en conformidad con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Servicio de Salud Pública de Estados Unidos (Care and Use of Laboratory Animals of the Public Health Service, EEUU.). Se utilizó alojamiento grupal para mejorar el bienestar de los animales. Después de una aclimatación de 7 días, los ratones fueron separados al azar en grupos de 5 animales por jaula (31 x 22 x 16 cm) y alimentados durante 28 días (135, 136) con dietas que difirían únicamente en la línea de papa suministrada. Los grupos A, B, C y D fueron expuestos simultáneamente tanto a tubérculos de papa fresca (bastones de ~ 1 x 4 cm) WT, J8, J14 y J20, respectivamente como a alimento

balanceado para roedores (GEPISA Feeds, Argentina) *ad libitum*. El agua para beber estuvo disponible de forma continua durante todo el experimento. El peso corporal, el consumo de alimento balanceado y el consumo de papa se midieron durante todos los días del experimento. El margen de seguridad de exposición (safety margin of exposure) fue calculado de acuerdo con la siguiente ecuación: Margen de exposición = [consumo diario de papa (kg)/peso corporal (kg)] x [peso medio humano (kg)/promedio mundial de consumo diario de papa per cápita humano (kg)]. Los análisis hematológicos se realizaron con un autoanalizador Sysmex XT-1800i (Sysmex, Japón) o por microscopía, y los análisis bioquímicos se determinaron usando un autoanalizador Hitachi 917 (Hitachi, Japón) sobre muestras de sangre tomadas a los 28 días de haber iniciado el experimento. Las muestras de sangre se recolectaron por medio de punción cardíaca bajo anestesia general por administración intraperitoneal de 0,01 ml/g de peso corporal de un cóctel de ketamina (Ketalar, Parke Davis, 0,23 mg/ml) y xilazina (Rompum, Bayer, 0,14 mg/ml). Se recolectaron muestras fecales en el día 28 para el análisis de la flora intestinal en cultivos agar-Levine-EMB (EMB: Eosin Methylene Blue) y agar-sangre (MBA: Minimal Blood Agar). Órganos vitales como el corazón, los riñones, el hígado, los pulmones y el bazo fueron pesados inmediatamente después de sacrificar los animales. Los pesos relativos de los órganos se calcularon aplicando la siguiente fórmula: Peso relativo de los órganos = [peso del órgano (g)/peso corporal (g)] x 100. Los tejidos de riñones e hígados fueron fijados en formalina al 10 % (v/v) e incluidos en parafina. Luego, fueron cortados en secciones de 5 µm de espesor y teñidos con hematoxilina y eosina para ser sometidos a exámenes histopatológicos.

Estudios sensoriales

Los estudios sensoriales se realizaron en colaboración con la T^{ec}. Vanina Rodríguez y gracias al asesoramiento de las Dras. Daniela Noain, Estefanía Bello Gay y Marcelo Rubinstein (Laboratorio de Animales Transgénicos, Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, INGEB-CONICET, Buenos Aires, Argentina).

Las 3 líneas transgénicas, J8, J14 y J20, se utilizaron en el análisis sensorial en humanos. La línea J14, con la mayor inhibición de la actividad enzimática de PPO fue seleccionada para las pruebas de preferencia olfativa en ratones. Las masas de las muestras experimentales usadas fueron: 2 g para los experimentos en el paradigma de campo abierto, 3 g para los experimentos en el paradigma del tablero con agujeros, 80 g para el primer experimento con seres humanos y 20 g para el segundo experimento con seres humanos. Las muestras consistieron en discos de papa (8 mm de diámetro x 1 mm de espesor) recién cortados (0 h o frescos) o discos de papa oxidados. Las muestras oxidadas consistieron en muestras colocadas en bolsas plásticas herméticas mantenidas durante aproximadamente 24 horas (para los experimentos con ratones) o 4-6 horas (para los experimentos con seres humanos) a temperatura ambiente y en oscuridad.

Evaluación sensorial en ratones: Los estudios de preferencia olfativa en ratones se realizaron utilizando un total de 32 hembras BALB/c de 8 semanas de edad (Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata,

Argentina). Ocho ratones fueron utilizados en los experimentos realizados con el paradigma de campo abierto y 24 ratones en los experimentos realizados con el paradigma del tablero con agujeros. Los animales fueron alojados y mantenidos bajo condiciones estándar (ciclos de luz-oscuridad de 12 h, habitación con aire acondicionado, temperatura de 21 ± 1 °C y humedad relativa del 60 ± 10 %), en conformidad con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Servicio de Salud Pública de Estados Unidos (Care and Use of Laboratory Animals of the Public Health Service, EEUU). Se utilizó alojamiento grupal para mejorar el bienestar de los animales. Después de una aclimatación de 7 días, los ratones fueron separados al azar en grupos de 4 animales por jaula (31 x 22 x 16 cm) y sometidos a los estudios de comportamiento. Tanto el alimento balanceado para roedores (GEPISA Feeds, Argentina) como el agua estuvieron disponible *ad libitum*, excepto durante las pruebas de comportamiento.

Todos los experimentos de preferencia olfativa se realizaron durante el período de oscuridad y en completa oscuridad, entre las 19:00 h y las 22:00 h, en una habitación de comportamiento separada, donde los ratones fueron habituados durante 3 días de antelación a los experimentos. Cuatro módulos de actividad de campo abierto (Med Associates Inc., EEUU) construidos en acrílico (40 x 40 x 40 cm) y acoplados a un ordenador se utilizaron para evaluar la actividad horizontal, vertical y estereotipada de los animales. Dos contenedores de alimento idénticos, construidos con plástico (35 mm de diámetro x 12 mm de altura) y específicamente diseñados para evitar el contacto físico con su contenido (el alimento se encontraba separado por una malla metálica), se colocaron en posiciones equidistantes dentro de cada módulo de actividad y se fijaron al piso del campo abierto con cinta adhesiva. Los animales fueron colocados en cada uno de los cuatro módulos de actividad y los movimientos horizontales y verticales fueron medidos mediante la interrupción de rayos infrarrojos. El comportamiento estereotipado se midió por interrupciones repetidas de un único haz infrarrojo. Los rayos infrarrojos se encontraban separados cada 2,5 cm cruzando el plano x-y en 2 niveles del plano z. La evaluación de la actividad en el campo abierto se realizó mediante un protocolo consistente en 5 min de adaptación y una duración del ensayo de 15 min (137). Dos zonas de análisis (6 x 6 cm), denominadas A y B (Véase Figura 12), que comprendían las posiciones de cada contenedor, se generaron con la computadora y, tanto el número de entradas como el tiempo de exploración dedicado por los ratones a las zonas A y B fueron analizados. El número de entradas y la duración del tiempo de exploración en las zonas se utilizaron como una medida de la preferencia por el olor de una manera similar a métodos descritos anteriormente (138, 139). Del primer al tercer día, los ratones fueron habituados durante 60 minutos a los módulos de actividad con los contenedores de alimento vacíos. El cuarto día, el comportamiento de exploración de los ratones se supervisó con los contenedores de alimento vacíos y los datos obtenidos fueron considerados como controles experimentales negativos. El quinto día, muestras frescas de papa (0 h) fueron colocadas aleatoriamente en los recipientes A o B y la posición de las muestras se invirtió en el sexto día (24 h = muestras oxidadas), de manera que si a las 0 h las muestras WT y -PPO se habían colocado en los recipientes A y B respectivamente, a las 24 h, las muestras WT y -PPO se colocaron en los recipientes B y A, respectivamente. El séptimo día, muestras frescas de papa WT fueron colocadas en los contenedores opuestos a los ocupados por las muestras -PPO en el sexto día, mientras que el otro contenedor se mantuvo vacío. Los datos obtenidos el séptimo día fueron considerados

como controles experimentales positivos. Los controles experimentales positivos se realizaron deliberadamente el séptimo día para evitar la habituación preferencial de los ratones a cualquiera de los dos contenedores. Controles adicionales con ambos recipientes conteniendo muestras WT recién cortadas o con un recipiente conteniendo alimento balanceado y el otro vacío se llevaron a cabo el octavo y noveno día, respectivamente. Un conjunto adicional de experimentos se realizó con un tablero de un único agujero (40 x 40 x 40 cm) construido de acuerdo a lo descrito previamente por Mandairon *et al.* (140) y con la adición de paredes opacas para mejorar el rendimiento de los animales durante el test. La secuencia y la duración de la introducción de la nariz de los ratones en el agujero fueron supervisadas bajo luz infrarroja con una cámara de vídeo digital infrarroja para su análisis (138). Los ratones fueron habituados por 3 días durante 30 minutos y al día siguiente se realizaron los ensayos utilizando 6 ratones para cada tipo de muestra (138). Para evitar la influencia del aprendizaje en los resultados, los ratones fueron utilizados sólo una vez (138). Cada test duró 2 minutos (140, 141) y la duración (segundos) de la introducción de la nariz en el agujero fue utilizada como una medida de la preferencia por el olor de la muestra (140-142). Los módulos, los contenedores de alimento y el tablero de agujeros fueron limpiados cuidadosamente entre cada prueba para minimizar las señales olfativas.

Evaluación sensorial en humanos: Se realizaron 2 experimentos sensoriales con un total de 69 voluntarios humanos sanos de entre 20 y 50 años de edad, reclutados en el Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI), que participaron de experimentos olfativos a ciegas (143, 144). Los ojos de los participantes fueron cubiertos durante el experimento para evitar la percepción visual de las muestras. El primer experimento se realizó con 8 participantes a lo que se les pidió oler un conjunto de muestras no identificadas y estimar la intensidad de su olor. Las muestras fueron presentadas en placas de petri conteniendo 80 g de discos de tubérculo de papa (8 mm de diámetro x 1 mm de espesor) WT o -PPO (J8, J14 o J20). Tres muestras independientes de cada línea se presentaron al azar cada 45 segundos a cada participante. En el segundo experimento, se realizó un test triangular (145) con 61 participantes divididos en dos grupos. El primer grupo (de 19 participantes) se puso a prueba con muestras de papa fresca, mientras que el segundo grupo (de 42 participantes) se puso a prueba con muestras de papa oxidada. Cada sujeto recibió al azar un conjunto de tres muestras no identificadas, que consistía en dos muestras del mismo genotipo y una de genotipo diferente. La prueba se realizó tanto con dos muestras control (WT) y una transgénica (J14 fue la única línea utilizada en este experimento) o con dos muestras transgénicas y una control. Las muestras se presentaron en frascos opacos idénticos conteniendo 20 g de discos de papa (8 mm de diámetro x 1 mm de espesor) WT o -PPO. En este experimento, se pidió a los participantes que juzgaran que muestra tenía un olor diferente (145) y que clasificaran, utilizando una escala arbitraria de 1 a 9 (siendo 1: "nada agradable" y 9: "muy agradable"), que tan agradable les resultaba cada muestra [2,15]. Adicionalmente, también se solicitaron comentarios descriptivos a los participantes en ambos experimentos (143, 145).

Estudios con *Cyclocephala signaticollis*

Las larvas de *Cyclocephala signaticollis* (gusano blanco o isoca chica) fueron gentilmente proporcionadas por la Dra. Dora Carmona (Laboratorio de Zoología Agrícola, Instituto Nacional de Tecnología Agrícola, INTA Balcarce-Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina), quien también brindó su asesoramiento para la experimentación con insectos. Estas larvas fueron obtenidas de un campo experimental del INTA Balcarce para asegurar que los insectos no hubieran estado en contacto con insecticidas. Estos ensayos se hicieron a temperatura ambiente y consistieron en colocar larvas de *Cyclocephala signaticollis* (n=30) en su tercer estadio ($0,6765 \pm 0,02796$ g) dentro placas de petri (2,5 cm de altura x 8,7 cm de diámetro) que contenían 22 g de tierra autoclavada y $1,139 \pm 0,009333$ g de papa -PPO o WT. Tanto el peso de las larvas y la cantidad de alimento fueron registrados al inicio y al final del experimento al cabo de 4 días.

Estudios con *Phytophthora infestans*

Los estudios con *P. infestans* se realizaron gracias al asesoramiento de las Dras. Adriana Andreu (Instituto de Investigaciones Biológicas de la Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina), Cristina Cvitanich y Elzbieta Orłowska (Departamento de Biología Molecular, Universidad de Aarhus, Aarhus, Dinamarca).

El aislamiento $R_2R_3R_6R_7R_9$ de *Phytophthora infestans* del tipo de apareamiento A2 (146), fue proporcionado gentilmente por la Dra. Adriana Andreu (Instituto de Investigaciones Biológicas de la Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina) y la cepa de GFP-*P. infestans* (147) fue proporcionada gentilmente por el Dr. Felix Mauch (Universidad de Fribourg, Fribourg, Suiza). Ambas cepas fueron mantenidas en medio agar-centeno (148) (con el agregado de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de geneticina (G418, Gibco/Invitrogen, EEUU.) para GFP-*P. infestans*) a 19 ± 1 °C y en oscuridad. El aislamiento de *P. infestans* $R_2R_3R_6R_7R_9$ fue obtenido en un campo comercial de papa en la provincia de Córdoba (146) y la cepa de GFP-*P. infestans* se obtuvo a partir del aislamiento de *P. infestans* CRA 208, el cual se encuentra transformado con el vector p34GFN que contiene el gen de selección de la neomicina fosfo transferasa II (NPTII) y el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor y el terminador del gen *HAM34* de *Bremia lactucae* (147, 149).

Luego de crecer los cultivos de *P. infestans* durante 10 días, se cosechó el micelio en 25 ml de agua estéril y se estimuló la producción de zoosporas mediante incubación a 4 °C durante 5 h. Luego de una filtración con un filtro de tela de nylon de 15 μm , la suspensión de esporangios fue observada bajo un microscopio óptico para su cuantificación. La concentración del inóculo se ajustó en 25 esporangios/ μl para los experimentos de monitoreo por qPCR y 50 esporangios/ μl para los experimentos de infección con GFP-*P. infestans*.

Para los experimentos de infección con *P. infestans* se utilizaron hojas compuestas (de la cuarta a la sexta hoja, contando desde la parte superior de la planta hacia abajo) escindidas de plantas de 4 semanas de edad cultivadas en invernadero. Estas hojas

compuestas fueron trasladadas a una cámara de crecimiento y mantenidas a 19 ± 1 °C con un fotoperíodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad. Al cabo de 2 días, las hojas fueron inoculadas en su lado abaxial con gotas equidistantes de 10 μ l de agua conteniendo 250 esporangios. El crecimiento del patógeno fue evaluado por qPCR tomando discos de hoja de 8 mm de diámetro de los sitios de inoculación. Las muestras de tubérculo consistieron en discos de 8 mm de diámetro x 1 mm de espesor obtenidos de tubérculos de aproximadamente 4 meses de edad. Estos fueron inoculados en su centro con 10 μ l de agua conteniendo 250 esporangios y mantenidos en cajas de plástico a 19 ± 1 °C. Cada cuantificación de la carga del patógeno se realizó a partir de 20 muestras de hojas o de tubérculos infectados. Los valores obtenidos para *PiO8* fueron normalizados con los valores correspondientes de *EF-1 α* de cada muestra. Los valores promedio obtenidos a los 6 días post inoculación (dpi) se fijaron en 100 % y todos los demás valores se normalizaron con los valores obtenidos para las muestras obtenidas a 6 dpi.

Para observar microscópicamente el desarrollo de la infección, se realizaron inoculaciones con 5 μ l de agua conteniendo 250 esporangios de la cepa GFP-*P. infestans* en el centro de discos de tubérculo de 8 mm de diámetro x 2,5 mm de espesor. Estas muestras se mantuvieron en cajas de plástico a 19 ± 1 °C y oscuridad durante 7 días y luego las regiones centrales de los discos fueron cortadas transversalmente en secciones de 250 μ m utilizando un vibrátomo (Vibratome Series 1000 Sectioning System, The Vibratome Company, EEUU).

El contenido de fenoles totales fue estimado modificando el procedimiento descrito por Singleton *et al.* (150). Una alícuota de 1 ml de extracto etanólico fue transferida a un tubo de ensayo que contenía 6 ml de agua destilada. Luego, se adicionaron 500 μ l del reactivo de Folin-Ciocalteu. Después de 5 min, se añadieron 1,5 ml de una solución de Na₂CO₃ (200 g/l) y agua hasta completar un volumen de 10 ml. Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 760 nm y se comparó con una curva de calibración realizada con ácido gálico.

Estudios evolutivos

Los estudios evolutivos se realizaron en colaboración con el Dr. Nicolás Ayub y la Dra. Gabriela Soto (Laboratorio de Mejoramiento Molecular de Especies Forrajeras, Instituto Nacional de Tecnología Agrícola, INTA-Castelar, Argentina) y el Dr. Flavio de Souza (Laboratorio de Animales Transgénicos, Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, INGEBI-CONICET, Buenos Aires, Argentina).

La búsqueda de secuencias aminoacídicas se realizó mediante el uso de la herramienta BLASTP (www.ncbi.nlm.nih.gov). Los posteriores cálculos de identidad proteica se realizaron utilizando el programa MatGATv2.02 (151). El análisis filogenético de PPO se llevó a cabo utilizando el programa MEGA 4.0 (152). Las secuencias proteicas se alinearon utilizando el programa ClustalW 2.0.12 (153, 154). Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el método de Neighbor-Joining (NJ) (155) con distancias genéticas computadas utilizando el modelo P-distance y análisis de "Bootstrap de 500 réplicas". Los árboles fueron construidos sin "outgroup" y el método

para fijar la raíz utilizado fue “root on midpoint”. El análisis de similitud del dominio Tiro sinasa se llevó a cabo alineando las secuencias aminoacídicas con el programa ClustalW 2.0.12 (153, 154) y curando el alineamiento manualmente. La tasa de heterogeneidad (rate heterogeneity) de cambios de residuos de aminoácidos fue estimada bajo un modelo de distribución gama (gamma distribution model) con el programa TREE-PUZZLE (156). Estos datos fueron utilizados para construir un árbol filogenético con el paquete de programas PHYLIP 3.69 (Phylogeny Inference Package. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) de la siguiente manera: el programa SEQBOOT fue usado para crear 100 replicas (bootstrap) de los alineamientos y estos fueron utilizados para calcular la distancia entre las secuencias utilizando el programa PRODIST. Finalmente, el árbol fue estimado con NEIGHBOR y se derivó una topología consenso con el programa CONSENSE.

Documentación fotográfica

Las imágenes macroscópicas fueron adquiridas utilizando una cámara Canon Ixus 70 o una cámara Canon PowerShot SD 110 (Canon, Japón). Las imágenes correspondientes a las secciones de tejidos de hígado y riñón fueron obtenidas con la cámara integrada a un microscopio Olympus BX41 (Olympus, Japón). Los análisis de microscopía de fluorescencia se llevaron a cabo bajo luz UV utilizando un microscopio de fluorescencia Leica MZFLIII (Leica, Alemania). Los análisis de microscopía confocal se llevaron a cabo con un microscopio confocal Nikon C1 (Nikon, Japón), utilizando longitudes de onda de excitación de 488 nm y 544 nm y longitudes de onda de adquisición de 500 a 600 nm.

Análisis estadístico de los datos

En la mayoría de los casos, la significancia estadística se determinó mediante el análisis *t* de Student o el test de ANOVA. La prueba de ANOVA de medidas repetidas fue utilizada para determinar la significancia en los cambios de peso corporal en ratones. Los datos de comportamiento en el paradigma de campo abierto fueron analizados utilizando el programa Activity Monitor versión 5 (MED Associates Inc., EE.UU.). El porcentaje de entradas y el tiempo de exploración de las zonas A y B en los experimentos de campo abierto se calcularon considerando la suma del número total de entradas o el tiempo de exploración transcurrido en las zonas A y B como 100 %. La significancia estadística se determinó mediante la prueba *t* de una muestra para diferencia del 50 %. La hipótesis nula fue que el 50 % de los casos, los ratones visitarían y explorarían por igual cualquiera de las dos zonas experimentales (A o B) y una desviación significativa del 50 % indicaría una preferencia significativa (157). La prueba de ANOVA seguida del test de comparación múltiple de Newman-Keuls se utilizó para determinar la significancia estadística en los experimentos de exploración con el paradigma del tablero con agujeros (140) y el test hedónico en humanos. La significancia estadística del número correcto de respuestas en el test triangular se determinó usando las tablas de significancia estadística descriptas por Roessler *et al.* (158), considerando que una respuesta era correcta cuando el participante asignaba el olor diferencial al genotipo que estaba representado por una única muestra. Para el

análisis de los experimentos de infección con *P. infestans*, la significancia estadística se determinó mediante un ANOVA de un factor seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey. En la mayoría de los casos el análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, EEUU). Las variaciones en el contenido de metabolitos se evaluaron mediante pruebas *t* de Student utilizando el programa Excel (Microsoft Corporation, EEUU) y considerando un $P < 0,01$ como un valor significativo. El análisis de componentes principales (PCA) se llevó a cabo como se detalla en (131) utilizando el programa InfoStat (www.infostat.com.ar).

Resultados

Obtención de las líneas transgénicas -PPO

Con la intención de silenciar múltiples miembros de la familia de genes de *PPO* de papa (*Solanum tuberosum*), se optó por construir un vector de silenciamiento con un 100 %, 84 % y 71 % de identidad con los genes *POB2*, *POB3* y *NOR333*, respectivamente (Figura 5). Además, se usó un diseño de horquilla, ya que este tipo de estrategia permite silenciamientos altamente eficientes en plantas (108, 109). A partir de ADN genómico (ADNg) de papa se amplificó por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) un fragmento de 376 pares de bases (pb) de la región 5' del gen *POB2* (ppoi) (Figura 5). Este fragmento fue insertado en orientación sentido (ppoi S) y antisentido (ppoi A), flanqueando ambos lados de un fragmento de 838 pb correspondiente al intrón 1 de la fosfoenolpiruvato carboxilasa 1 de papa (ppc1i1). Esta construcción fue colocada entre el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV 2x35S) y el terminador de la nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens* (NOS-t). Este cassette fue clonado en el vector binario pPZP-Hyg (110), que contiene el gen de selección de la higromicina fosfo transferasa (*HPT*), y el plásmido resultante fue nombrado pPPOi (Figura 6). Una vez que la integridad de la construcción fue confirmada por mapeos de restricción, por PCR y por secuenciación de ADN (Figura 6A y 6B), la misma se utilizó para transformar plantas de papa mediante co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens* (112). A partir de la selección con higromicina, se obtuvieron 39 líneas potencialmente transgénicas (-PPO). De estas 39 líneas crecidas *in vitro*, se identificaron 26 líneas con actividades de PPO en hojas por debajo del 30 % de la actividad observada en las plantas silvestres (WT, de sus siglas en inglés Wild Type) (Figura 7A). De entre las plantas transgénicas con menor actividad de PPO, tres líneas (llamadas J8, J14 y J20), que contenían una única copia del cassette de silenciamiento (Figura 7B) correctamente integrada, fueron seleccionadas para el resto de los experimentos. La correcta recombinación del cassette de silenciamiento fue confirmada por PCR en las líneas transgénicas seleccionadas (Figura 7C y 7D).

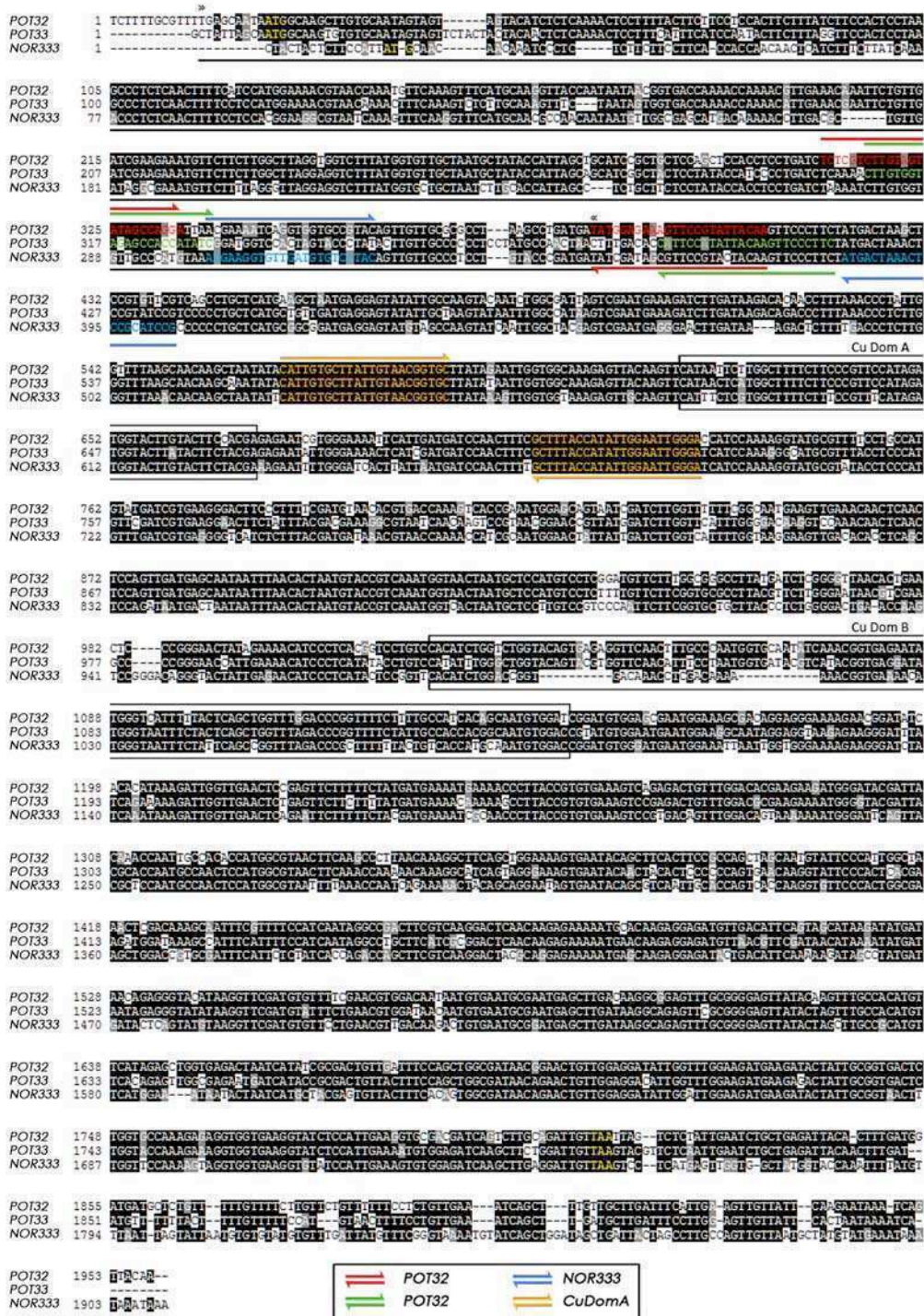


Figura 5. Alineamiento de las secuencias de los genes de *PPO* *POT32*, *POT33* y *NOR333*. La región 5' subrayada y comprendida entre puntas de flecha dobles corresponde al fragmento de 376 nucleótidos utilizado para construir el vector de silenciamiento para los genes de *PPO*. Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR de *POT32*, *POT33*, *NOR333* y el dominio de unión a cobre A (*CuDomA*) se encuentran graficados en color rojo, verde, azul y naranja respectivamente. En color amarillo se encuentran señalados los codones de inicio (ATG) y terminación (TAA). Los nucleótidos conservados se encuentran sombreados. Los dominios de unión a cobre A y B (*Cu Dom A* y *Cu Dom B*) se indican en cuadrados.

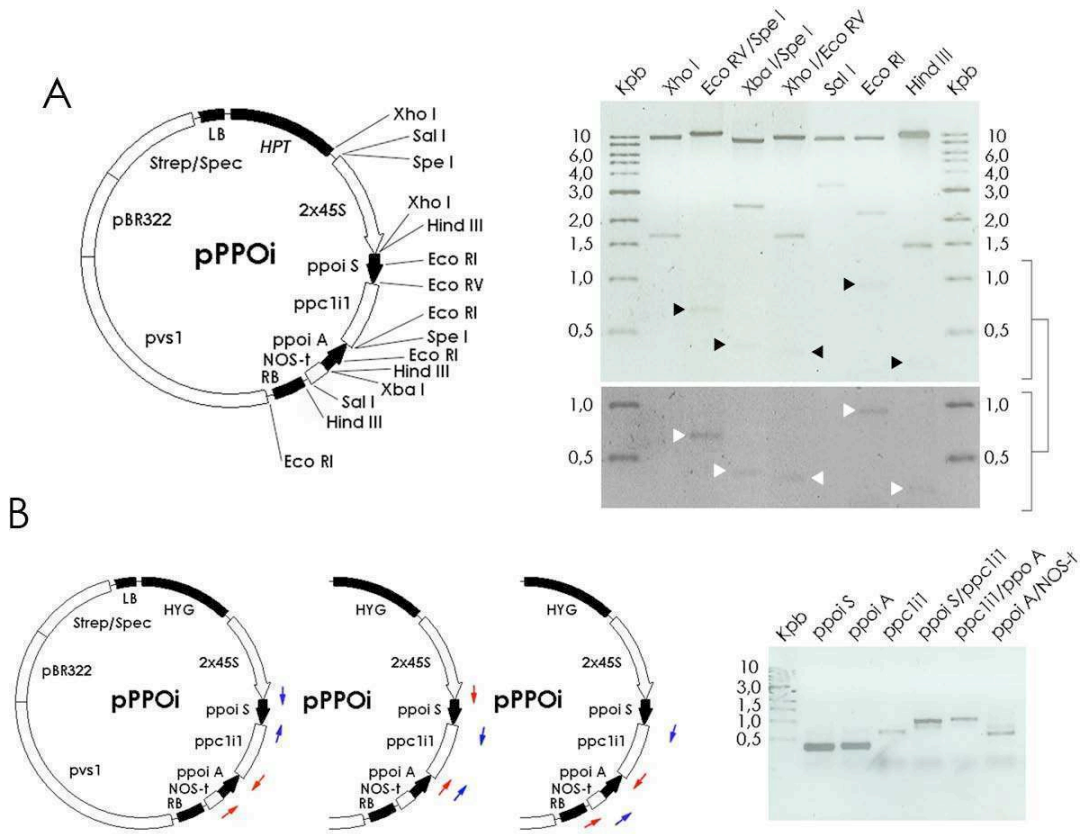


Figura 6. Construcción del plásmido de silenciamiento para los genes de *PPO*. (A) Mapeo de restricción del vector pPPOi. La región del gel indicada con una llave se muestra duplicada con una mayor exposición en el panel inferior para permitir la visualización de las bandas de menor peso molecular (señaladas por puntas de flecha en ambos paneles). Kbp: kilo pares de bases (1000 pb). 2x35S es el promotor del virus del mosaico del coliflor. ppoi S y ppoi A son las secuencias dirigidas a silenciar los genes de *PPO* orientadas en dirección sentido y antisentido respectivamente. ppc111 es el intrón 1 de la fosfoenolpiruvato carboxilasa 1 de papa. NOS-t es el terminador de la nopalina sintasa de *Agrobacterium*. HPT es el gen de la higromicina fosfo transferasa que confiere resistencia a la higromicina. Strep/Spec son genes de selección bacteriana que otorgan resistencia a estreptomina y espectinomicina. pVS1 y pBR322 son segmentos de los plásmidos de igual nombre que forman parte del esqueleto del vector binario pPZP-Hyg y aportan los orígenes de replicación en *E. coli* y *A. tumefaciens* respectivamente. LB y RB son los bordes izquierdo y derecho respectivamente del ADN de transferencia (ADN-T) de *Agrobacterium*. El vector pPPOi tiene un tamaño esperado de 11669 pb. La digestión con Xho I debería generar 2 fragmentos con un tamaño esperado de 1600 y 10069 pb. La digestión con Eco RV/Spe I debería generar 2 fragmentos con un tamaño esperado de 840 y 10829 pb. La digestión con Xba I/Spe I debería generar 3 fragmentos con un tamaño esperado de 410, 2589 y 8670 pb. La digestión con Xho I/Eco RV debería generar 3 fragmentos con un tamaño esperado de 379, 1600 y 9690 pb. La digestión con Sal I debería generar 2 fragmentos con un tamaño esperado de 3269 y 8400 pb. Una digestión total con Eco RI debería generar 4 fragmentos con un tamaño esperado de 200, 950, 1040 y 9459 pb, sin embargo, se obtuvieron digestiones parciales y sólo se observaron 3 fragmentos de 1040, 2210 (conformado por los fragmentos de 1040 + 970 + 200 pb) y 9459 pb. La digestión con Hind III debería generar 3 fragmentos con un tamaño esperado de 270, 1629 y 9770 pb. (B) Reacciones de PCR de los fragmentos ppoi S, ppoi A, ppc111, ppoi A/NOS-t, ppoi S/ppc111 y ppc111/ppoi A, utilizando el vector pPPOi como molde. Las flechas de igual color indican la posición de los pares de oligonucleótidos utilizados en cada reacción de PCR. ppoi S es un amplicón con un tamaño esperado de 379 pb. ppoi A es un amplicón con un tamaño esperado de 410 pb. ppc111 es un amplicón con un tamaño esperado de 840 pb. ppoi S/ppc111 es un amplicón con un tamaño esperado de 1219 pb. ppc111/ppoi A es un amplicón con un tamaño esperado de 1250 pb. ppoi A/NOS-t es un amplicón con un tamaño esperado de 680 pb.

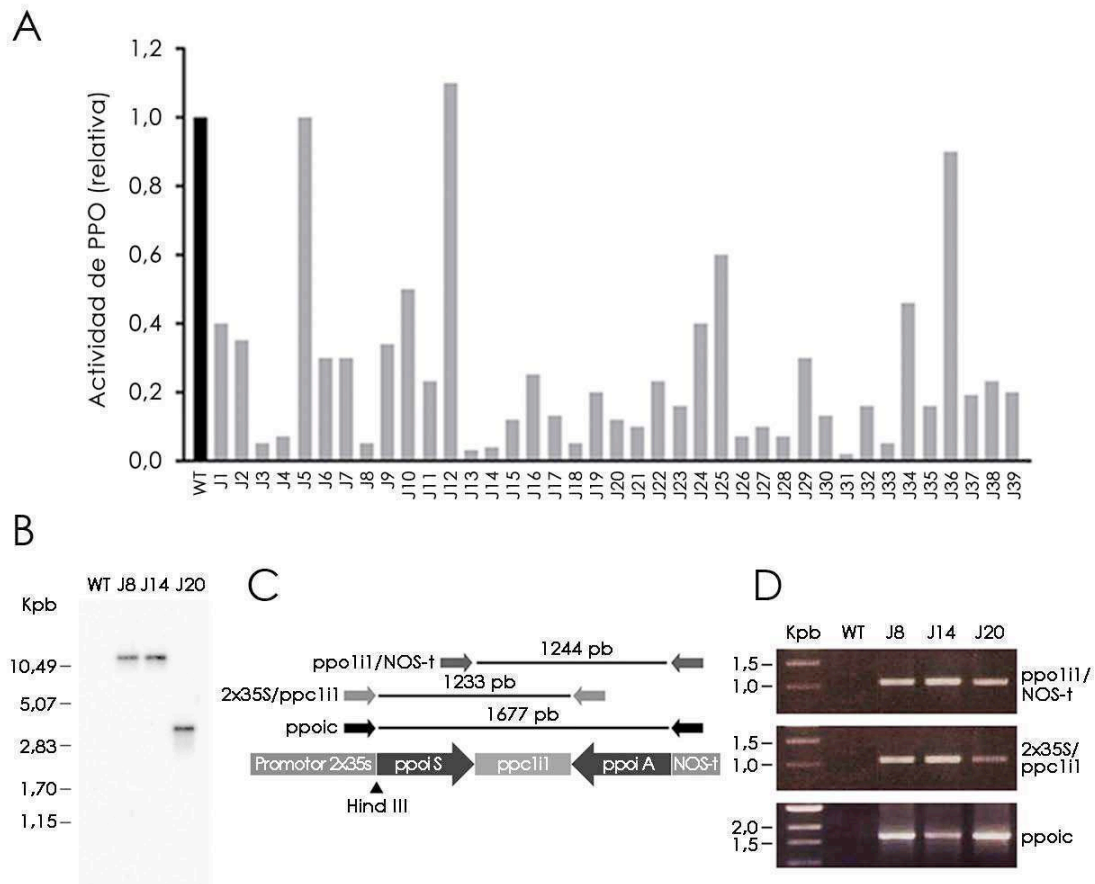
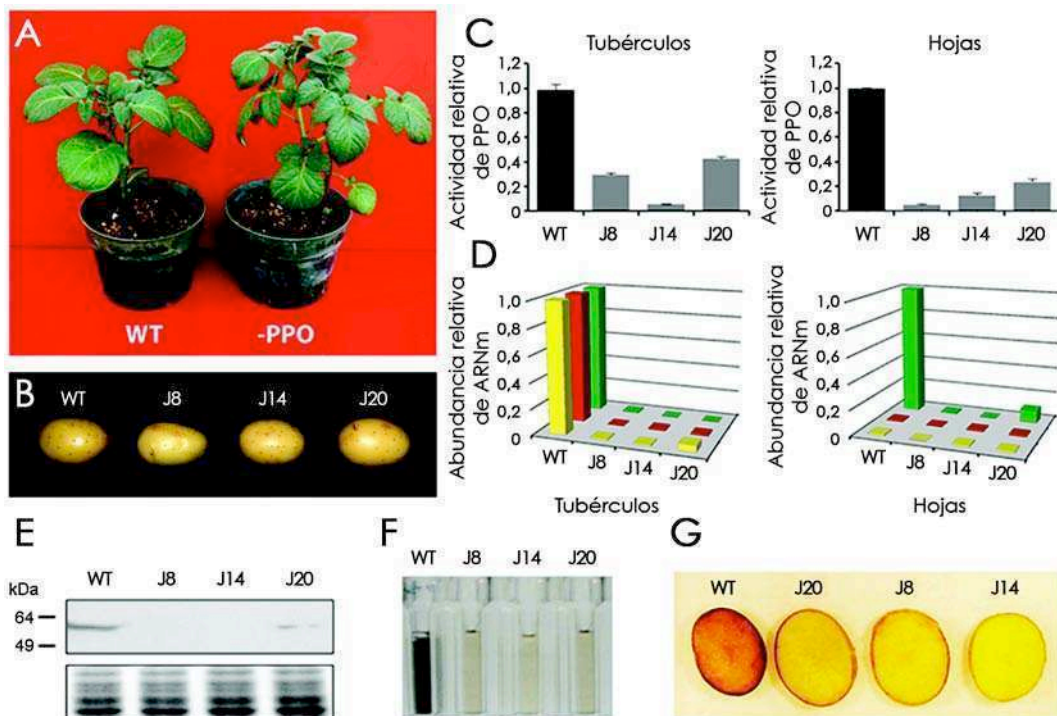


Figura 7. Obtención de las líneas transgénicas -PPO. (A) Actividad de PPO de las putativas líneas transgénicas crecidas *in vitro* en medio MS sólido suplementado con higromicina. Los valores son el promedio de tres mediciones independientes y están representadas como las actividades relativas en comparación con el genotipo silvestre (WT). (B) Análisis de Southern blot de las líneas seleccionadas (J8, J14 y J20) con una única copia del cassette de silenciamiento. El ADN se digirió con la enzima Hind III y se utilizó una sonda de 543 pb complementaria al promotor 2x35S. (C) Representación esquemática del diseño de horquilla del cassette de silenciamiento. Las flechas representan los oligonucleótidos utilizados para analizar la integridad de la construcción recombinada en las líneas transgénicas seleccionadas. La punta de flecha inferior indica el sitio de restricción Hind III utilizado para digerir el ADN usado en el análisis de Southern blot. Las flechas superiores representan los oligonucleótidos utilizados para analizar la integridad del cassette recombinado. (D) Análisis de PCR sobre ADN de plantas WT y transgénicas. La integridad del cassette de silenciamiento recombinado en las líneas transgénicas fue evaluada utilizando las tres combinaciones de oligonucleótidos que se muestran en 3C. ppc111/NOS-t es un amplicón con un tamaño esperado de 1244 pb. 2x35s/ppc111 es un amplicón con un tamaño esperado de 1233 pb. ppoic es un amplicón con un tamaño esperado de 1677 pb.

El silenciamiento de PPO reduce la actividad enzimática de PPO y el pardeamiento en tubérculos, pero no tiene efectos sobre el crecimiento, el desarrollo ni la fotosíntesis

Luego de su selección *in vitro*, las líneas transgénicas J8, J14 y J20 fueron mantenidas bajo condiciones de invernadero para continuar con su caracterización. Las tres líneas transgénicas presentaron fenotipos normales, siendo indistinguibles de las plantas WT en todas las etapas de desarrollo bajo las condiciones de invernadero del INGEBI

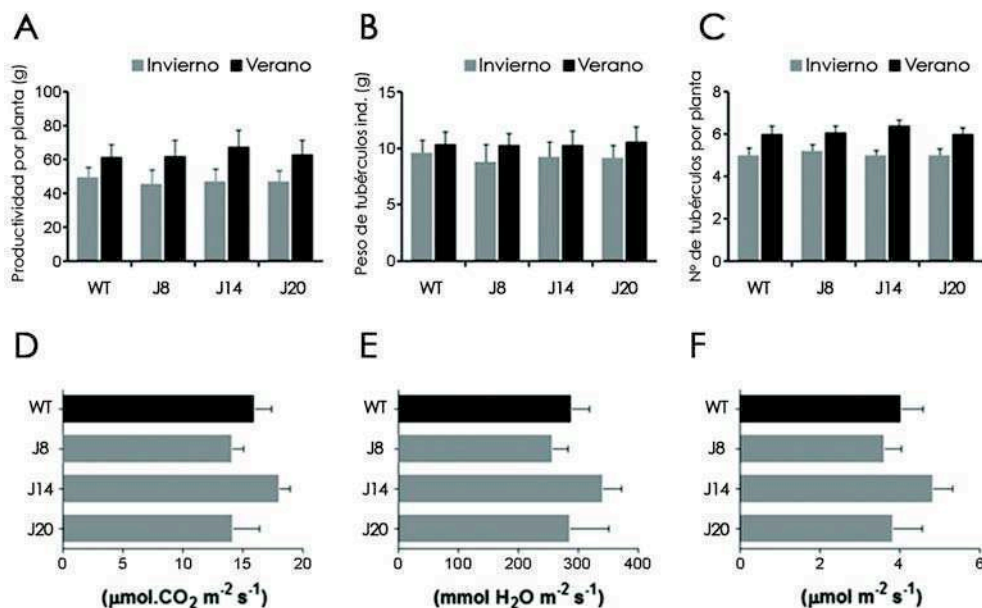
(Figura 8A). Por otra parte, no se observaron diferencias en la morfología ni en el tamaño entre la tubérculos -PPO y WT (Figura 8B). Sin embargo, la actividad enzimática de PPO se redujo significativamente tanto en los tubérculos como en las hojas de las líneas -PPO con respecto a los controles WT (Figura 8C). Para examinar la eficacia del silenciamiento de ARN en varios miembros individuales de la familia de genes de *PPO*, se realizaron mediciones de las abundancias de los distintos transcritos de la familia de genes de *PPO* mediante transcripción inversa y PCR cuantitativa (RT-qPCR), utilizando oligonucleótidos diseñados para amplificar regiones específicas de los genes *POT32*, *POT33* y *NOR333* (Véase Figura 5). Este experimento reveló que, como era esperado para las plantas WT (4), los tres genes se expresaban en tubérculos, mientras que sólo *NOR333* era detectado en hojas (Figura 8D). Mientras que la transcripción de todos los genes de *PPO* evaluados estaba altamente reducida en ambos tejidos de las líneas -PPO (Figura 8D). La presencia de la proteína PPO se determinó mediante análisis de Western blot en extractos proteicos totales extraído de tubérculos. Este análisis permitió visualizar una banda correspondiente a PPO (~60 kDa) que era consistente en las muestras WT, levemente detectable en algunas muestras de la línea J20 y que estaba ausente en las líneas J8 y J14 (Figura 8E). Al mismo tiempo, los extractos proteicos transgénicos presentaban una evidente reducción de su oxidación en comparación con los extractos WT (Figura 8F). Para probar la sensibilidad al pardeamiento de los tubérculos maduros -PPO, tubérculos de 4 meses de edad obtenidos de plantas crecidas en invernadero fueron cortados en rodajas e incubados por 48 horas a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda. Como se observa en la Figura 8G, el pardeamiento enzimático fue en gran medida inhibido en los tubérculos -PPO en comparación con los controles WT.



Página anterior

Figura 8. Análisis de las líneas transgénicas -PPO crecidas bajo condiciones de invernadero. (A) Fenotipo representativo de plantas silvestres (WT) y transgénicas de un mes de edad. (B) Fenotipo representativo de tubérculos WT y -PPO cosechados al cabo de 4 meses. (C) Actividad de PPO en tubérculos y hojas. Los datos se presentan como las actividades relativas con respecto a los controles WT. Las barras de error representan el \pm SEM de seis plantas individuales de cada línea. Todas las líneas -PPO fueron significativamente diferentes ($P \leq 0,005$) a los controles WT de acuerdo con el análisis *t* de Student. (D) Análisis de la expresión individual de los distintos miembros de la familia de genes de PPO por RT-qPCR. Las barras verdes, rojas y amarillas representan los genes *NOR333*, *POT33* y *POT32*, respectivamente. Los resultados mostrados son el promedio de seis determinaciones independientes. Los valores se normalizaron con los obtenidos para *EF-1 α* y se expresan como la abundancia relativa de ARNm en comparación con los controles WT. Todas las desviaciones estándar se encuentran por debajo del 5%. (E) Análisis inmunológico (western blot) de la presencia de proteína PPO de los tubérculos maduros crecidos en condiciones de invernadero. El panel inferior muestra un gel con una tinción de proteínas totales con azul de Coomassie. (F) Oxidación de extractos de proteína total de papa luego de 30 minutos a temperatura ambiente. (G) Fenotipo de rodajas de tubérculos de papa mantenidos dentro de una cámara húmeda a temperatura ambiente por 48 hs.

Con el motivo de evaluar la productividad de las plantas -PPO, se realizaron dos experimentos de productividad bajo condiciones de invernadero con papa semilla de tamaño normalizado. Estos experimentos se realizaron en distintas estaciones del año (invierno y verano) para obtener un conjunto de datos representativos de al menos dos condiciones anuales contrastantes. Como se muestra en la Figura 9A-C, no se encontraron diferencias en el rendimiento (g de tubérculo/planta), ni en el peso individual de los tubérculos, así como tampoco en el número de tubérculos por planta entre las líneas -PPO y las plantas WT. Además, dado que se ha sugerido que PPO podría estar relacionada con los procesos fotosintéticos (18-21), para investigar cualquier posible efecto de la disminución de la actividad de PPO sobre la capacidad fotosintética de *Solanum tuberosum*, se realizaron mediciones de los parámetros fotosintéticos en las plantas -PPO y WT. Con este fin, se evaluó la asimilación de CO₂, la conductancia estomática y la transpiración en hojas totalmente expandidas de plantas de cinco semanas de edad crecidas bajo condiciones de invernadero. De los datos obtenidos en estas mediciones se desprende que ninguno de estos parámetros presenta diferencias estadísticamente significativas entre las líneas -PPO y WT (Figura 9D-F).

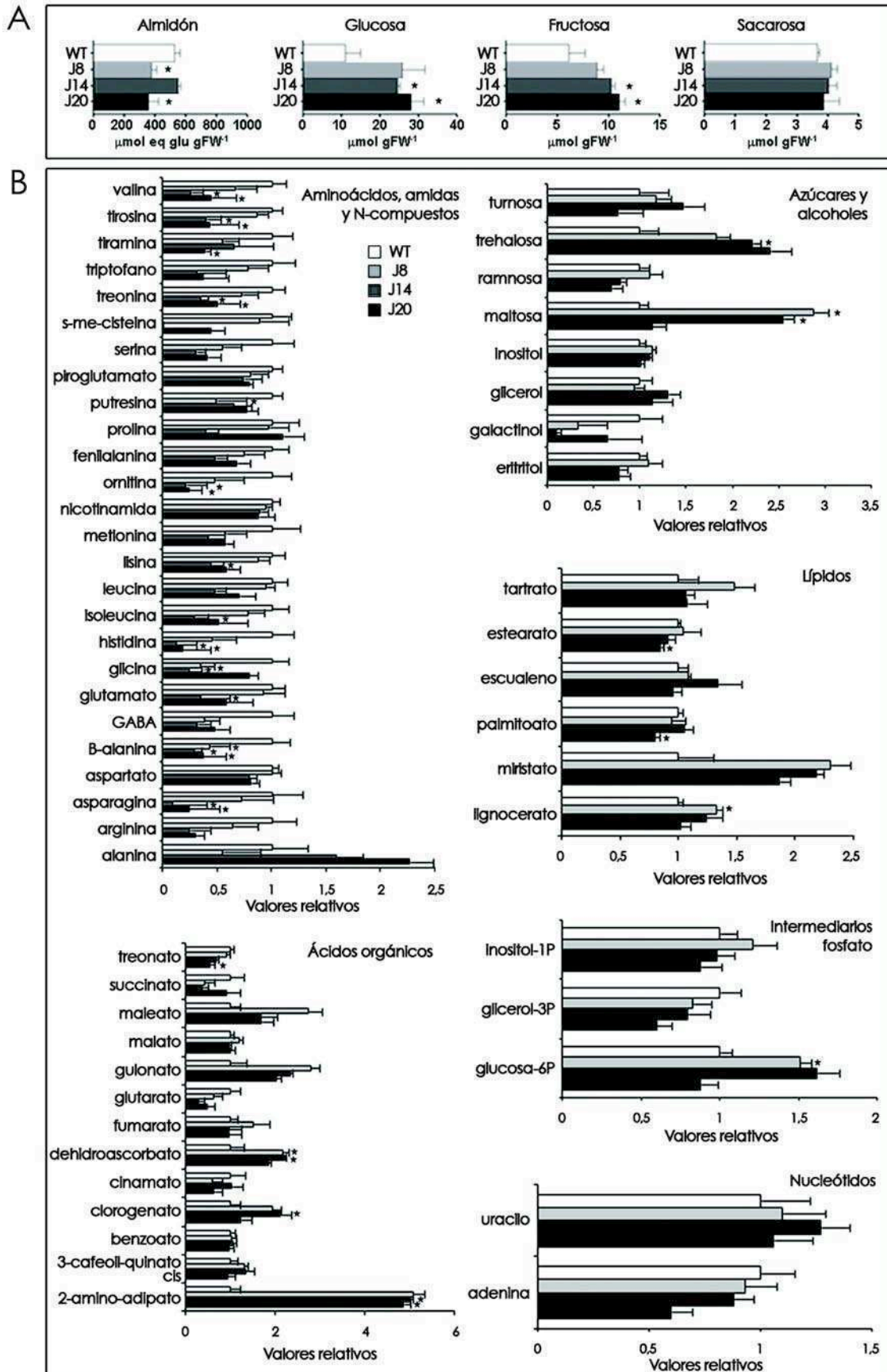


Página anterior

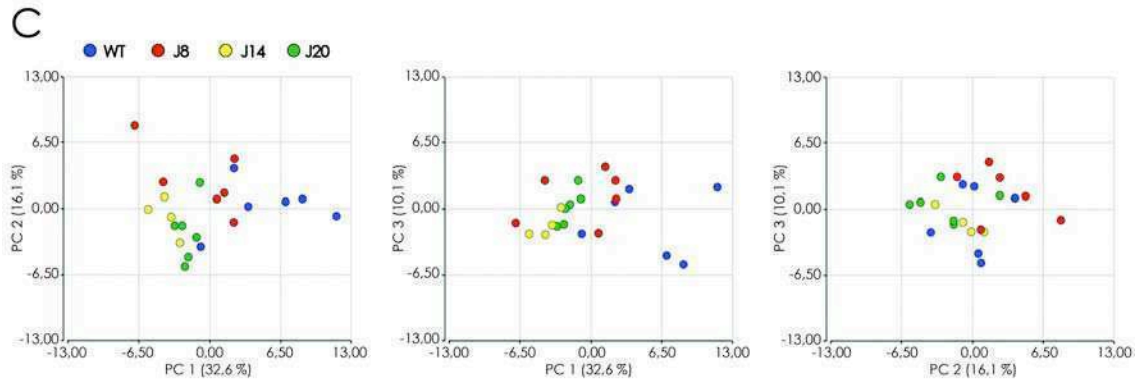
Figura 9. Productividad y fotosíntesis de las líneas transgénicas -PPO. (A) Peso total de tubérculos por planta. (B) Peso individual de cada tubérculo. (C) Número de tubérculos por planta. La evaluación de la productividad se realizó en plantas crecidas en macetas de 4 litros bajo condiciones de invernadero en invierno y en verano. Las barras de error representan el \pm SEM de 25 plantas por línea. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre las líneas WT y transgénicas de acuerdo con el análisis *t* de Student. (D) Asimilación de CO₂ por unidad de área. (E) Conductancia estomática. (F) Transpiración. Las barras de error representan el \pm SEM de seis plantas independientes por línea. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre los controles WT y las líneas transgénicas de acuerdo con el análisis *t* de Student. Los parámetros fotosintéticos fueron medidos bajo condiciones de invernadero.

Los niveles de metabolitos son disímiles en las líneas WT y -PPO

Con el fin de identificar posibles alteraciones metabólicas en las líneas -PPO, se llevó a cabo un completo análisis de la composición metabólica de los tubérculos transgénicos mediante la combinación de técnicas de espectrofotometría y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) (132). Si bien se encontraron disimilitudes en muchos de los metabolitos detectados, sólo unas pocas resultaron ser estadísticamente significativas entre las muestras WT y -PPO (Figura 10A y 10B). En particular, el contenido de aminoácidos se vio generalmente disminuido, mientras que un grupo de azúcares solubles compuesto por glucosa, fructosa, maltosa y trehalosa se encontró aumentado en todas las líneas transgénicas. Unos pocos ácidos orgánicos (2-amino-adipato, dehidroascorbato, clorogenato y treonato) y ácidos grasos (palmitoleato, estearato y lignocerato) mostraron también cambios significativos en los tubérculos -PPO con respecto a los controles WT (Figura 10A y 10B). Para lograr una mejor interpretación de las diferencias metabólicas existentes entre las líneas transgénicas y WT se aplicó un análisis no paramétrico de componentes principales (PCA). Este modelo de PCA, que explica alrededor del 60 % de la varianza de los datos, se muestra en la Figura 10C. El análisis global de PCA mostró una leve separación en el componente principal 1 (PC1, que explica el 32,6 % de la varianza) entre las líneas -PPO y WT y permitió identificar ocho metabolitos con un impacto significativo ($\geq 0,19$ y $\leq -0,19$) en la separación por genotipo, seis aminoácidos (metionina, fenilalanina, histidina, ornitina, arginina y serina) y dos ácidos orgánicos (glutarato y dehidroascorbato). Estas alteraciones metabólicas motivaron la búsqueda de otros genes que pudieran estar siendo también silenciados de forma no intencional. Para ello se examinaron las bases de datos del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y del proyecto de secuenciación genómica de solanáceas (<http://solgenomics.net/>) en busca de secuencias complementarias a la horquilla de silenciamiento utilizada. Esta búsqueda no permitió identificar otras secuencias blanco a parte de las de los genes de PPO. De estos análisis se deduce que las variaciones están principalmente influenciadas por los distintos genotipos y que si bien existen diferencias en el metabolismo primario de los tubérculos transgénicos, estas diferencias son pocas y de pequeña magnitud.



Continúa en la página siguiente



Comienza en la página anterior

Figura 10. Análisis del metabolismo primario de tubérculos WT y -PPO. (A y B) Contenido relativo de metabolitos en tubérculos WT (columnas blancas), J8 (columnas gris claro), J14 (columnas gris oscuro) y J20 (columnas negras). Las barras de error representan el \pm SEM. Las diferencias significativas ($P \leq 0,05$) están indicadas con una estrella (*). (C) Análisis de componentes principales (PCA) de los perfiles metabólicos completos de tubérculos WT (azul), J8 (rojo), J14 (amarillo) y J20 (verde).

Los tubérculos -PPO son más consumidos que los WT y no alteran los parámetros fisiológicos en un modelo murino

Para estudiar si la reducción del pardeamiento y los niveles enzimáticos de PPO en tubérculos de papa producían algún efecto particular sobre la palatabilidad y el consumo de papa, y considerando que podrían existir diferencias en (y debidas a) la ingesta de papa transgénica debido a las alteraciones originadas por la modificación genética (inhibición del pardeamiento y niveles alterados de metabolitos), se realizaron estudios de alimentación en ratones. Dado que para la obtención del fenotipo deseado se utilizó una estrategia de silenciamiento de ARN y ninguna nueva proteína, a excepción de la ya considerada segura HPT (159-161), se introdujo en las líneas -PPO, se decidió realizar un ensayo de seguridad con alimentos totales. Esto significa que en los ensayos se utilizaron tubérculos completos en contra posición con la utilización de proteínas recombinantes purificadas. Los animales fueron alimentados con dietas consistentes en agua, alimento balanceado para roedores (ABR) y papa *ad libitum*, donde la única diferencia entre grupos era la línea de papa suministrada: WT, j8, j14 y j20 para los grupos A, B, C y D, respectivamente. El aspecto y comportamiento general de los ratones fue controlado diariamente y no se observaron diferencias entre los distintos grupos. Llamativamente, todos los grupos de ratones alimentados con dietas suplementadas con tubérculos transgénicos presentaron una ingesta diaria de papa significativamente mayor que los grupos alimentados con dietas suplementadas con tubérculos WT (Figura 11A y 11C). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el consumo de alimento balanceado (Figura 11B y 11D) ni en el crecimiento (aumento de peso corporal) de los ratones entre ninguno de los grupos (Figura 11E). Una vez finalizados los experimentos de alimentación, se realizaron exámenes macroscópicos y del peso total de los órganos que no mostraron diferencias apreciables entre los distintos grupos (Figura 11F y Tabla 1). Además, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre los pesos relativos de los órganos de los grupos control y experimentales (Tabla 1) y los datos fueron comparables con los valores de referencia dados para

ratones sanos (jaxmice.jax.org/strain/000651.htm), sugiriendo la ausencia de toxicidad. El análisis histopatológico de hígado y riñones evidenció que las estructuras normales de los tejidos hepáticos y renales estaban conservadas tanto en los ratones alimentados con papa WT como -PPO (Figura 11G). Los valores obtenidos en los análisis de sangre resultaron ser similares entre todos los grupos (Tabla 2), y el análisis de coprocultivos mostró que la flora intestinal (unidades formadoras de colonias/mg de muestra fecal) de los grupos control y experimentales era similar (Figura 11H), indicando que no existieron efectos adversos sobre la microbiota intestinal (162). La Figura 11I muestra el aspecto contrastante de los tubérculos WT y -PPO que era usualmente observado al momento del recambio diario de alimento cada 24 horas.

Tabla 1. Pesos y pesos relativos de órganos de ratones alimentados con tubérculos de papa WT o -PPO.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Corazón	0,1101 ± 0,015	0,1166 ± 0,008	0,1196 ± 0,012	0,1189 ± 0,009
% Corazón	0,52 ± 0,023	0,55 ± 0,050	0,57 ± 0,073	0,56 ± 0,035
Riñones	0,2834 ± 0,036	0,2963 ± 0,026	0,2912 ± 0,017	0,2833 ± 0,023
% Riñones	1,35 ± 0,062	1,41 ± 0,126	1,40 ± 0,058	1,35 ± 0,084
Hígado	0,9471 ± 0,141	0,9833 ± 0,101	0,9996 ± 0,046	0,9945 ± 0,070
% Hígado	4,53 ± 0,262	4,70 ± 0,557	4,83 ± 0,205	4,74 ± 0,321
Pulmones	0,1694 ± 0,010	0,1707 ± 0,016	0,1785 ± 0,015	0,1786 ± 0,007
% Pulmones	0,81 ± 0,091	0,81 ± 0,071	0,86 ± 0,086	0,85 ± 0,047
Páncreas	0,0999 ± 0,011	0,0884 ± 0,010	0,0932 ± 0,005	0,0905 ± 0,006
% Páncreas	0,47 ± 0,048	0,42 ± 0,039	0,45 ± 0,019	0,43 ± 0,037

Las filas con nombres de “órganos” son los pesos de los órganos (g). Las filas con los nombres “% órganos” son los porcentajes de los pesos de los órganos con respecto a los pesos corporales. Los grupos A, B, C y D fueron alimentados con papas WT, J8, J14 y J20 respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre los grupos de acuerdo con el análisis *t* de Student. Los valores son promedios ± SD.

Página siguiente

Figura 11. Estudios de bioseguridad en ratones. Los grupos A, B, C y D fueron alimentados con dietas suplementadas con tubérculos de las líneas WT, J8, J14 y J20 respectivamente. (A) Consumo diario de papa. (B) Consumo diario de alimento balanceado para medores (ABR). (C) Consumo medio de papa. (D) Consumo medio de ABR. Todos los grupos alimentados con papas -PPO consumieron significativamente ($P \leq 0,05$) más papa que los grupos alimentados con papa WT pero no se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre grupos con respecto al consumo de ABR de acuerdo con el análisis *t* de Student. Las barras de error representan el ± SEM. Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas con una estrella (★). (E) Pesos corporales de los ratones. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) de acuerdo con el análisis de ANOVA de medidas repetidas. Las barras de error representan el ± SEM. (F) Pesos de los órganos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) de acuerdo con el análisis *t* de Student. Las barras de error representan el ± SEM. (G) Resultados histológicos representativos de tejidos de hígado y riñón. Barra: 100 μm. (H) Análisis de la microflora intestinal en cultivos de agar-Levine-EMB (EMB: Eo sin Methylene Blue) y agar-sangre (MBA: Minimal Blood Agar). Cultivos representativos y análisis de las unidades formadoras de colonias (UFC) de la microflora de ratones BALB/c alimentados por 28 días con ABR suplementado con tubérculos WT o -PPO. No se encontraron diferencias apreciables entre los distintos grupos. (I) Aspecto representativo de muestras sobrantes de tubérculos WT y -PPO al momento del recambio diario de alimento cada 24 horas. El estudio de bioseguridad en ratones fue realizado dos veces obteniéndose resultados similares, por lo que se muestra solo un experimento representativo.

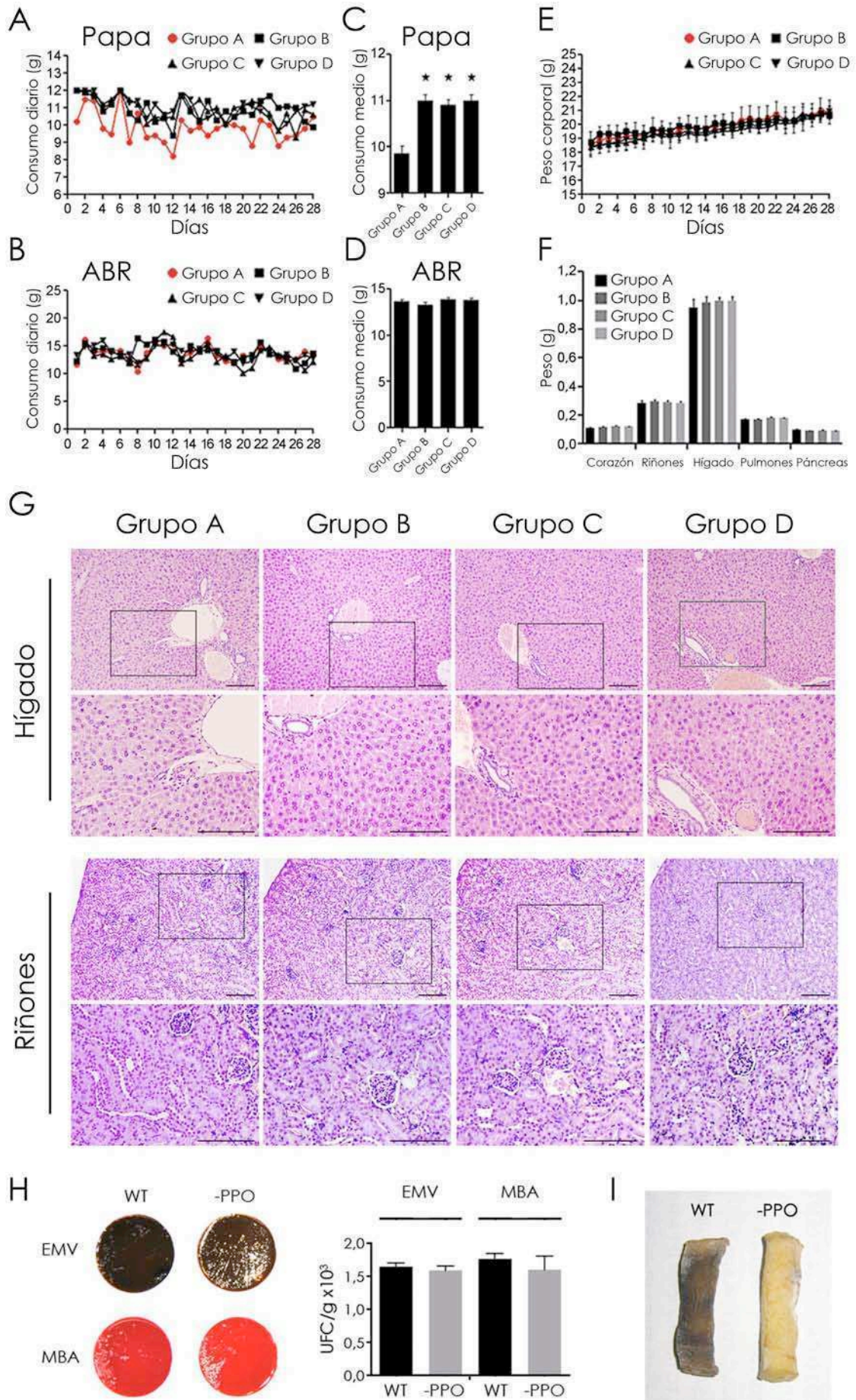


Tabla 2. Análisis bioquímico y hematológico de ratones alimentados con tubérculos de papa WT0 -PPO.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
<i>Bioquímica</i>				
ALT	42,80 ± 12,01	41,80 ± 15,34	41,20 ± 7,39	39,60 ± 2,61
AST	112,2 ± 7,12	113,6 ± 18,31	115,4 ± 40,90	96,8 ± 24,04
ALP	253,3 ± 21,75	274,6 ± 40,87	270,6 ± 26,62	267,6 ± 42,10
γ-GTP	1,50 ± 1,29	1,60 ± 1,51	1,80 ± 0,83	2,0 ± 1,00
TCHO	105,5 ± 6,80	110,2 ± 5,49	104,6 ± 7,98	113,2 ± 11,39
SA	3,12 ± 0,43	3,4 ± 0,18	3,38 ± 0,08	3,47 ± 0,09
TP	4,47 ± 0,73	4,92 ± 0,30	4,88 ± 0,14	5,00 ± 0,08
<i>Hematología</i>				
WBC	3,28 ± 0,25	4,16 ± 1,88	3,70 ± 0,77	4,14 ± 1,38
RBC	7,69 ± 0,69	7,87 ± 0,60	8,09 ± 0,30	8,08 ± 0,18
HGB	13,28 ± 0,42	12,92 ± 0,39	13,56 ± 0,34	13,72 ± 0,39
HCT	37,40 ± 3,46	38,42 ± 3,16	39,10 ± 1,53	39,46 ± 0,79
MCV	48,60 ± 0,37	48,76 ± 0,40	48,32 ± 0,31	48,82 ± 0,40
MCH	15,46 ± 1,46	15,70 ± 1,86	16,76 ± 0,64	17,00 ± 0,44
MCHC	31,82 ± 2,87	32,28 ± 4,05	34,70 ± 1,34	34,04 ± 1,91
RDW	17,06 ± 0,35	16,80 ± 0,33	16,88 ± 0,27	16,68 ± 0,25
PLT	682,2 ± 112,4	635,8 ± 149,4	615,0 ± 294,7	705,2 ± 98,00
MPV	5,68 ± 0,31	5,66 ± 0,58	5,36 ± 0,11	5,60 ± 0,18
PCT	0,25 ± 0,15	0,24 ± 0,09	0,33 ± 0,16	0,42 ± 0,08
PDW	16,46 ± 1,20	16,88 ± 0,98	16,28 ± 0,63	16,54 ± 0,71
NE%	16,95 ± 0,46	16,75 ± 1,25	16,08 ± 1,49	16,82 ± 0,81
LY%	85,73 ± 11,00	86,95 ± 10,45	82,88 ± 10,22	86,48 ± 10,25
MO%	1,67 ± 1,76	1,74 ± 0,94	1,67 ± 1,12	1,62 ± 1,07
EO%	0,75 ± 0,44	0,76 ± 0,16	0,77 ± 0,42	0,68 ± 0,16
BA%	0,52 ± 0,24	0,47 ± 0,26	0,55 ± 0,80	0,42 ± 0,45

ALT: Alanina aminotransferasa (IU/L), AST: aspartato aminotransferasa (IU/L), ALP: fosfatasa alcalina (IU/L), γ-GTP: γ-glutamyl-transpeptidasa (IU/L), TCHO: colesterol total (mg/dl), SA: albúmina (g/dl), TP: proteína total (g/dl), WBC: conteo de glóbulos blancos (10^3 células/ μ l), RBC: conteo de glóbulos rojos (10^6 células/ μ l), HGB: hemoglobina (g/dl), HCT: hematocrito (%), MCV: volumen celular medio (fl), MCH: hemoglobina corpuscular media (pg), MCHC: concentración de hemoglobina corpuscular media (g/dL), RDW: variabilidad de las medidas de glóbulos rojos (%), PLT: plaquetas (10^3 células/ μ l), MPV: volumen plaquetario medio (fl), PCT: masa total de plaquetas (%), PDW: variabilidad de las medidas de plaquetas (%), NE%: porcentaje de neutrófilos (%), LY%: porcentaje de linfocitos (%), MO%: porcentaje de monocitos (%), EO%: porcentaje de eosinófilos (%), BA%: porcentaje de basófilos (%). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre los grupos de acuerdo con el análisis *t* de Student. Los valores son promedios \pm SD.

Análisis bioinformáticos de alergenicidad

Si bien la construcción génica utilizada en este trabajo no fue diseñada para producir proteínas, dado que el análisis de alergenicidad es una parte muy importante del proceso de evaluación de la seguridad de cultivos transgénicos (126, 128), la secuencia del cassette introducido en las líneas transgénicas fue evaluada en sus seis

marcos de lectura mediante enfoques bioinformáticos para identificar posibles coincidencias con secuencia de proteínas alergénicas conocidas (127, 128). Las búsquedas de homología de secuencia en las bases de datos SDAP (Structural Database of Allergenic Proteins), FARRP (Food Allergy Research and Resource Program) y NCBI (National Center for Biotechnology Information-Entrez-protein) no identificaron ningún alineamiento significativo con secuencias de alérgenos conocidos. El mejor alineamiento de secuencias obtenido en la base de datos SDAP fue del 32,5 % contra el alérgeno Asp f5 (CAA83015) de *Aspergillus fumigatus*. Este valor está por debajo del nivel de identidad del 50 % necesario para considerar la ocurrencia de potenciales reacciones cruzadas con alérgenos (163) y por debajo del 35 % de identidad cada 80 o más aminoácidos sugerido por las directrices del Codex Alimentarius de la FAO/OMS (164). En la base de datos de alérgenos FARRP, el mejor valor esperado (valor e) obtenido fue de 1,1 contra la proteína precursora de la gliadina de tipo alfa (170710) de *Triticum aestivum* (trigo). Este valor es 55 veces mayor que el valor significativo de 0,02 para dos homólogos proteicos (127, 128, 165). Además, no se encontraron alineamientos significativos con proteínas alergénicas en la base de datos de proteínas de NCBI (126). En resumen, ninguna de las evaluaciones realizadas indicó riesgos de toxicidad y/o alergenicidad derivados de potenciales traducciones espurias de la construcción. Adicionalmente, no es esperable que existan riesgos de este tipo derivados de la proteína codificada por el gen de selección utilizado (*HPT*: higromicina fosfo transferasa), ya que su seguridad ha sido establecida en trabajos previos (159-161).

Estudios sensoriales

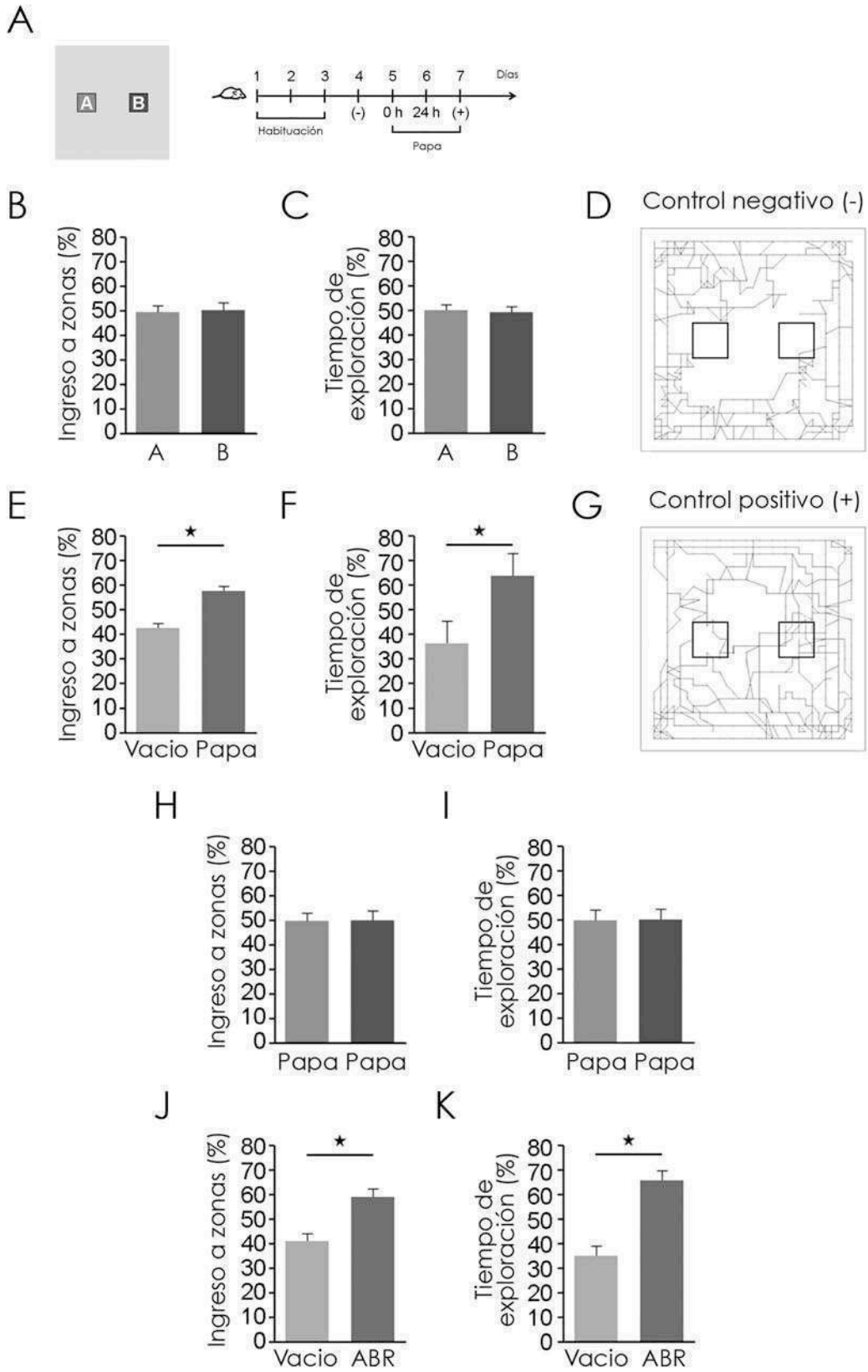
Considerando que la percepción del aroma de los alimentos precede e influye en la ingesta y el sabor de los mismos (166), y dado que la oxidación enzimática altera las propiedades organolépticas de los alimentos (139, 143), se decidió explorar si las diferencias observadas en la ingesta de papa en los experimentos de seguridad alimentaria con ratones estaban influenciadas por un componente olfativo. Para ello, se realizaron experimentos con dos paradigmas experimentales del área de las neurociencias, el "paradigma de campo abierto" (open field test) (139, 166) y el "paradigma de introducción de nariz" (nose-poking preference test) (140, 141). Estos modelos experimentales son comúnmente utilizados para estudiar el comportamiento exploratorio en animales de laboratorio sin la interferencia de un observador (166). Los diseños experimentales utilizados que permitieron correlacionar el comportamiento exploratorio de ratones con preferencias olfativas se muestran en las Figuras 12A y 13E. Además, para complementar los estudios hechos con ratones, también se realizaron análisis sensoriales con voluntarios humanos (143, 144) (Figura 14A-E).

Inicialmente, se diseñó un ensayo modificado del descrito por Smith *et al.* (139), donde dos contenedores de alimento, especialmente diseñados con una malla metálica que evita el contacto físico con el contenido, eran emplazados equidistantemente en el centro de una caja de estudio de campo abierto (Figura 12A) y el comportamiento exploratorio de los ratones era monitoreado en oscuridad total mediante un mallado de rayos infrarrojos instalados dentro de la caja. Dado que este modelo experimental era inédito, primero se validó exponiendo a los ratones a

situaciones en donde ambos contenedores se encontraban vacíos o en donde un contenedor contenía muestras de papa y el otro se encontraba vacío. Esta validación permitió observar que los ratones no tenían interés ni preferencias por ninguno de los dos contenedores de alimento (A o B) cuando estos se encontraban vacíos (Figura 12B y 12C). Además, como se ejemplifica en la Figura 12D, los ratones evitaban cruzar la zona central y en su lugar preferían la periferia y, en particular, las esquinas. Sin embargo, una clara preferencia exploratoria se evidenciaba cuando un contenedor contenía muestras de papa y el otro se encontraba vacío (Figura 12E-G). A su vez, se obtuvieron resultados similares al realizarse controles con ambos contenedores conteniendo muestras de papa o con un contenedor conteniendo alimento balanceado para roedores y el otro contenedor vacío (Figura 9H-K). Ya que estos experimentos se realizaron en oscuridad total y que los ratones sólo podían percibir lo que se encontraba dentro de los contenedores mediante el uso del olfato, se concluyó que el diseño experimental era útil para identificar olores que evocaban respuestas de atracción en ratones y, por lo tanto, permitía la discriminación de preferencias aromáticas.

Página siguiente

Figura 12. Validación del experimento de preferencia olfativa en el paradigma de campo abierto. (A) Representación esquemática, vista desde arriba, de los módulos de campo abierto con las zonas A y B, comprendiendo a los contenedores de alimento y diagrama del procedimiento experimental. Del día 1 al día 3, los ratones fueron habituados a los módulos de campo abierto con los contenedores de alimento vacíos. El día 4, el comportamiento exploratorio de los ratones se controló con los contenedores de alimento vacíos y los datos obtenidos fueron considerados como controles experimentales negativos (-). El día 5, muestras de papa fresca (0 h) se colocaron en los contenedores A o B. El día 6, las muestras de papa oxidada (24 h) se colocaron en las posiciones opuestas con respecto al día 5. El día 7, muestras de papa WT fresca fueron colocadas en un contenedor, mientras que el otro recipiente permaneció vacío y los datos obtenidos fueron considerados como controles experimentales positivos (+). Los días 8 y 9 se realizaron controles adicionales con ambos contenedores conteniendo muestra de papa WT fresca y con alimento balanceado para roedores (ABR) en un único contenedor, respectivamente (no mostrado en el diagrama experimental). Porcentaje de ingresos (B) y tiempo de exploración (C) de los ratones en las zonas A y B con ambos contenedores de alimento vacíos. (D) Trayectoria representativa (5 min) de un ratón participando de un experimento control negativo, con ambos contenedores vacíos. Porcentaje de ingresos (E) y tiempo de exploración (F) de los ratones en las zonas A y B con un contenedor con muestras WT y el otro contenedor vacío. (G) Trayectoria representativa (5 min) de un ratón participando de un experimento control positivo, con un contenedor con muestras WT y el otro contenedor vacío. Los recuadros centrales en las figuras D y G representan las zonas A (a la izquierda) y B (a la derecha). Porcentaje de ingresos (H) y tiempo de exploración (I) de los ratones en las zonas A y B con ambos contenedores con muestras WT. Porcentaje de ingresos (J) y tiempo de exploración (K) de los ratones en las zonas A y B con un contenedor con ABR y el otro contenedor vacío. Las estrellas (★) representan diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,03$) de acuerdo con la prueba *t* de una muestra para diferencia del 50 %. Las barras de error representan el intervalo de ± 95 % de ocho experimentos independientes.



Los ratones tienen preferencia por las papas -PPO cuando los tubérculos presentan deterioro oxidativo

Una vez establecido que el diseño experimental era adecuado para discriminar preferencias olfativas en ratones, se analizaron los datos obtenidos para las líneas WT y -PPO. El análisis del comportamiento demostró que los ratones no tenían ninguna preferencia por las muestras WT o -PPO frescas (0 h) (Figura 13A y 13B). Sin embargo, cuando estos experimentos se repitieron con muestras oxidadas (24 h), los ratones presentaron consistentemente un mayor interés por las muestras transgénicas y estos resultados fueron estadísticamente significativos ($P \leq 0,03$) según la prueba *t* de Student de una muestra para diferencia de 50 % (exploración al azar) (Figura 13C y 13D). Si bien no hubo diferencias significativas entre las muestras de papa fresca, sí hubo una diferencia significativa con respecto a la hipótesis nula para las muestras de papa oxidada, lo que sugiere que existen aromas diferenciales entre las líneas WT y -PPO que son acentuados una vez que el deterioro oxidativo tiene lugar. Además, para confirmar los resultados del paradigma de campo abierto, se realizó un experimento de introducción de nariz, utilizando un tablero con agujeros según lo descrito previamente (140, 141) (Figura 13E). En este experimento, los ratones demostraron una reducción significativa ($P \leq 0,05$) del tiempo de exploración sólo con las muestras WT oxidadas (24 h) (Figura 13F), sugiriendo que las papas -PPO mantienen su calidad aromática por períodos más largos de tiempo que las papas WT.

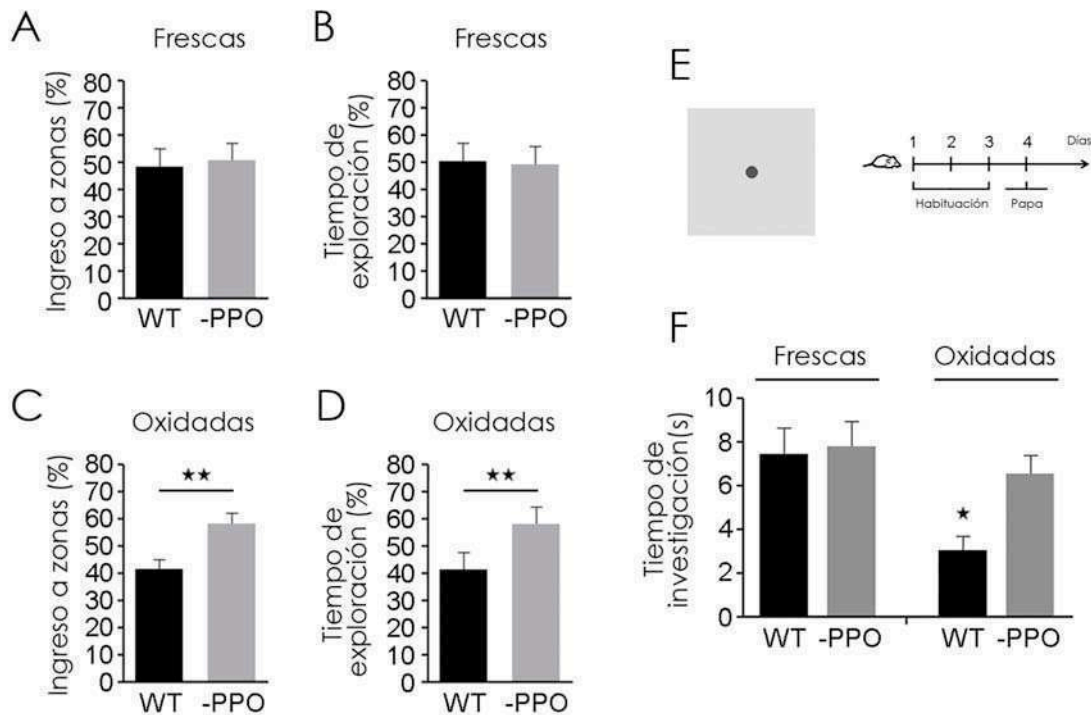


Figura 13. Experimentos sensoriales con ratones. Porcentaje de ingresos (A) y tiempo de exploración (B) de los ratones en las zonas A y B con muestras WT o -PPO frescas (0 h). Porcentaje de ingresos (C) y tiempo de exploración (D) de los ratones en las zonas A y B con muestras WT o -PPO oxidadas (24 h). De A-D, las dos estrellas (★★) representan diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,03$) de acuerdo con la prueba *t* de una muestra para diferencia de 50 % y las barras de error representan el intervalo de ± 95 % de los ocho experimentos independientes. (E) Representación esquemática, vista desde arriba, de los módulos de

tablero con agujeros con un orificio central y diagrama del procedimiento experimental. Del día 1 al día 3, los ratones fueron habituados a los módulos. El día 4, el comportamiento exploratorio de los ratones se monitoreó con muestras experimentales. (F) Resultado de los experimentos con el paradigma del tablero con agujeros. Los tiempos medios de investigación (s) \pm SEM de seis mediciones independientes se muestran para cada tipo de muestra. En este caso, la estrella (★) representa diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) en el tiempo de investigación de acuerdo a la prueba de ANOVA seguida del test de comparación múltiple de Newman-Keuls.

Los seres humanos son capaces de diferenciar las líneas -PPO de las WT por su aroma

Para investigar si las diferencias aromáticas entre las líneas WT y transgénicas eran también apreciadas por seres humanos, se realizó un conjunto adicional de experimentos con voluntarios humanos de ambos sexos (143, 144). Primero, se examinó si los seres humanos eran capaces de discriminar muestras WT oxidadas de muestras -PPO (J8, J14 y J20) equivalentes. En este experimento preliminar, el 100 % de los evaluadores describió de manera inequívoca que las muestras -PPO eran más aromáticas que las muestras WT (Figura 14A) y, en general, los participantes hicieron comentarios positivos sobre el aroma de los tubérculos transgénicos, alegando que creían estar oliendo melón, sandía, pepino o papa. Posteriormente, se llevó a cabo un segundo experimento con un total de 61 participantes divididos en dos grupos, un primer grupo (n=19) fue evaluado con muestras frescas y un segundo grupo (n=42) con muestras oxidadas. Este experimento confirmó que los humanos son capaces de percibir diferencias entre los olores de las muestras WT y -PPO, y que estas diferencias son discriminadas con una mayor precisión cuando las muestras se encuentran oxidadas. El grupo evaluado con muestras frescas presentó un 57,89 % de respuestas correctas en la prueba de discriminación triangular (145) (se consideró que una respuesta era correcta cuando el participante asignaba el olor diferencial al genotipo que estaba representado por una única muestra. Véase Estudios sensoriales y Análisis estadístico de los datos en la sección de Materiales y Métodos), que fue significativo con un valor $P \leq 0,03$, mientras que el grupo evaluado con muestras oxidado presentó un 85,71 % de respuestas correctas, que fue significativo con un valor $P \leq 0,001$ (Figura 14B). Cabe destacar que, a pesar de que los participantes clasificaron todas las muestras con un nivel intermedio de agradabilidad (4,81-6,15) (Figura 14C), hubo un consenso general de que las muestras -PPO tenían un aroma más intenso (Figura 14D) y, además, evocaron la impresión sensorial de un vegetal familiar más a menudo que las muestras WT (Figura 14E). Notoriamente, en este experimento la mayoría de los participantes comentaron creer estar oliendo pasto, tomate, papa o algún vegetal fresco familiar pero no identificado.

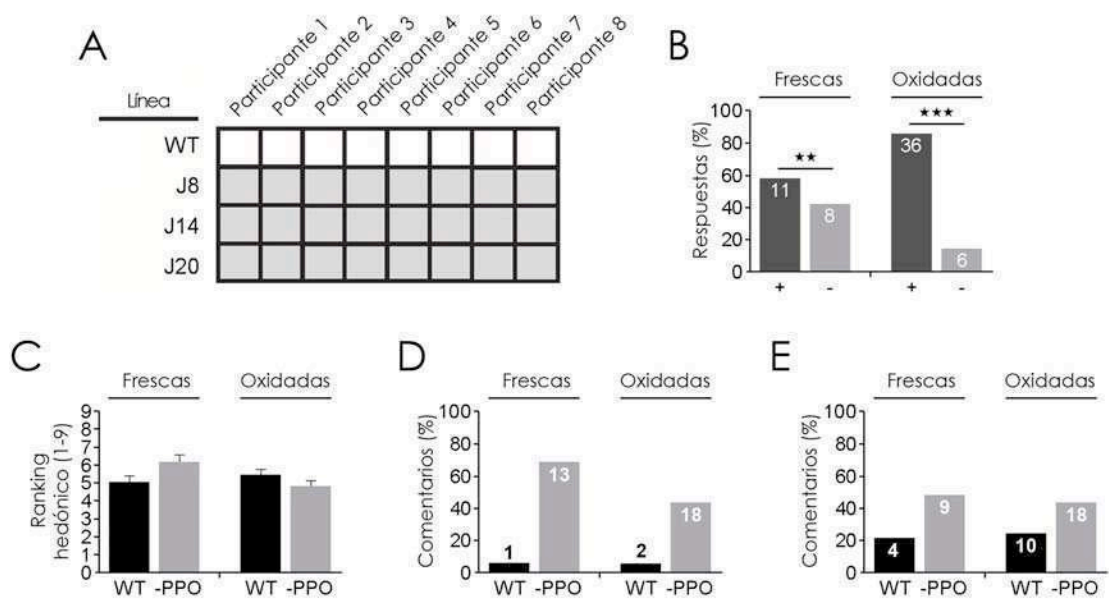


Figura 14. Experimentos sensoriales con humanos. (A) Discriminación olfativa entre las líneas WT y transgénicas. Un casillero lleno indica que el aroma de la muestra fue descrito como más intenso por el participante. (B) Prueba de discriminación triangular con muestras frescas y oxidadas. El grupo evaluado con muestras frescas (n=19) obtuvo 11 respuestas correctas y el grupo evaluado con muestras oxidadas (n=42) obtuvo 25 respuestas correctas, estos valores son estadísticamente significativos con valores de $P \leq 0.03$ (★★) y $P \leq 0.001$ (★★★) respectivamente. El número de respuestas correctas (+) se determinó contando el número de participantes que eligieron la muestra de genotipo único de entre las tres presentadas. El número de respuestas incorrectas (-) es igual al número de participantes que no eligió la muestra de genotipo único de entre las tres presentadas. Se presenta graficado el porcentaje de respuestas correctas e incorrectas y el número de las respuestas correspondientes se muestra dentro de cada barra. (C) Valoración hedónica. Siendo 1: "nada agradable" y 9: "muy agradable". No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de acuerdo a la prueba de ANOVA. (D) Comentarios describiendo que el aroma de la muestra era más intenso. Se presenta graficado el porcentaje de comentarios y el número de las observaciones correspondientes se muestra dentro o arriba de cada barra. (E) Comentarios describiendo que el aroma de la muestra evocaba la impresión sensorial de un vegetal familiar. Se presenta graficado el porcentaje de comentarios y el número de las observaciones correspondientes se muestra dentro de cada barra.

Cyclocephala signaticollis consume más papa -PPO que WT

Los insectos han coevolucionado estrechamente con los vegetales y es bien conocido que los compuestos volátiles ejercen fuertes influencias sobre su comportamiento. Por otro lado, las plantas son los organismos campeones de la producción de compuestos volátiles y, tanto las combinaciones como las cantidades liberadas de estos metabolitos no son triviales, ya que estas sustancias proveen protección, información y, potencialmente, también desinformación (43, 167-170). Por estos motivos, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos con ratones y humanos, se decidió experimentar también con insectos. Para este fin, se eligió trabajar con larvas del tercer estadio (cuando son más voraces) de *Cyclocephala signaticollis* (gusano banco o isocachica), un coleóptero plaga de papa (Figura 15A). El ensayo consistió en alimentar un grupo de larvas con tubérculos WT y otro grupo con tubérculos -PPO. Al cabo de 4 días, el crecimiento de las larvas y el consumo de alimento fueron evaluados. Este experimento no arrojó diferencias con respecto al crecimiento de los insectos entre ninguno de los grupos (Figura 15B). Sin embargo, análogamente a lo previamente

observado en ratones, el consumo de alimento fue evidentemente superior en el grupo alimentado con tubérculos transgénicos (Figura 15C).

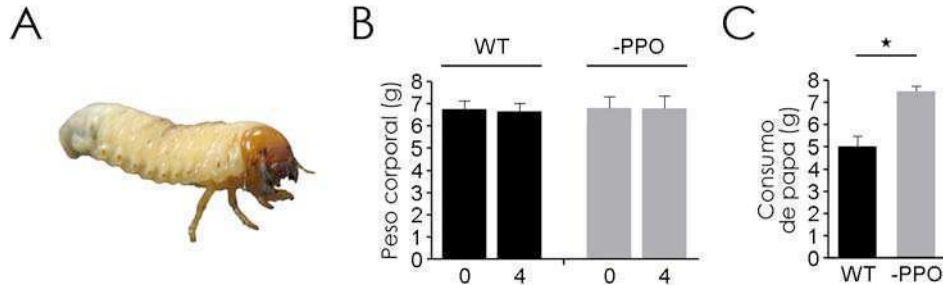


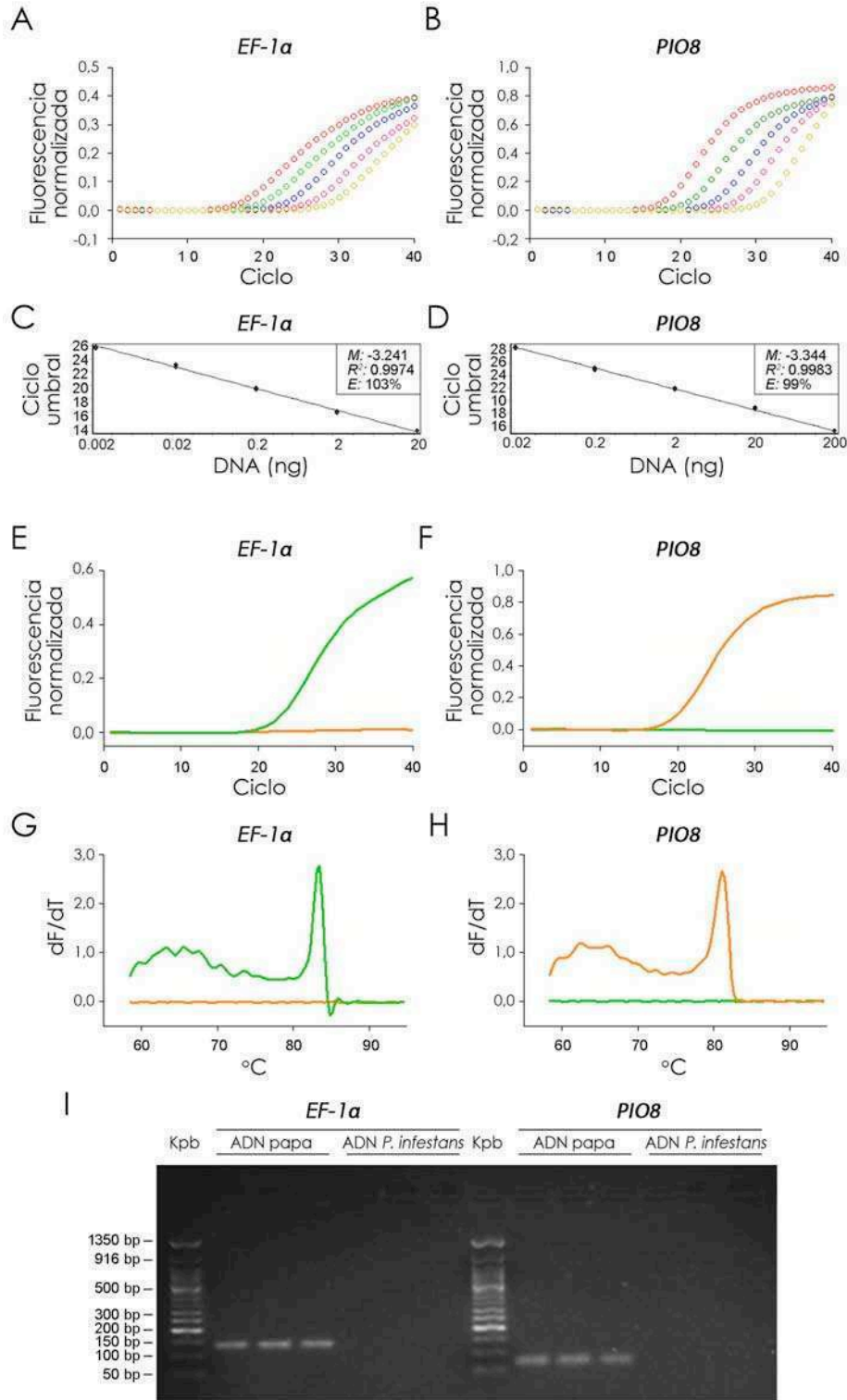
Figura 15. Experimentos con insectos. (A) *Cyclocephala signaticollis*. (B) Peso corporal de las larvas al día de comenzar el experimento (0) y al cabo de cuatro días (4). No se observaron diferencias en el crecimiento de los insectos entre ninguno de los grupos. (C) Consumo medio de papa WT y -PPO. Los insectos alimentados con tubérculos transgénicos consumieron significativamente ($P \leq 0,002$) más papa que los insectos alimentados con tubérculos WT de acuerdo al análisis *t* de Student. Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas con una estrella (*).

Las plantas -PPO son más resistentes a *Phytophthora infestans*

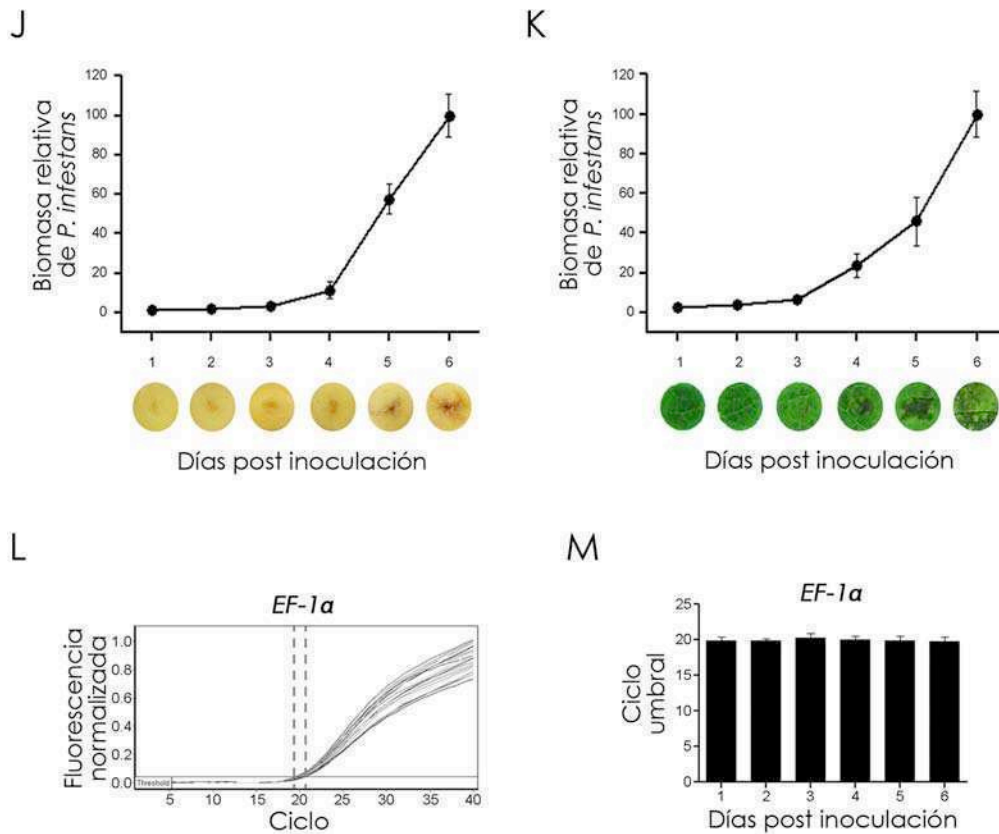
Phytophthora infestans, el agente causal del tizón tardío, es el patógeno más destructivo del cultivo de papa, con brotes severos que también afectan al cultivo de tomate (82, 147, 171). Este patógeno dejó su huella en la historia de la humanidad al ser uno de los principales causantes de la Gran Hambruna Europea y el subsecuente exilio irlandés de mediados del 1800. Se estima que actualmente *P. infestans* genera pérdidas de alrededor de 6,7 mil millones de dólares anuales (82, 172). Además de ser un patógeno amenazante, *P. infestans* es un organismo modelo de oomicetos, por lo que tanto productores, mejoradores e investigadores pueden beneficiarse de metodologías que permitan medir con precisión el crecimiento de este microorganismo (82, 173).

Dado que diversos trabajos sugieren que PPO está involucrada en las respuestas de defensa vegetales, se evaluó la resistencia de las plantas -PPO a *P. infestans*. Si bien tradicionalmente la detección de *P. infestans* se basa en el examen visual del tejido infectado o en el cultivo *in vitro* del patógeno, estos métodos son cuantitativamente inconsistentes, pudiendo conducir a resultados erróneos (123, 174-176). Por este motivo, primero se estableció un método altamente sensible y cuantitativo para estimar la biomasa del patógeno en tejidos infectados. Este método se desarrolló utilizando la misma lógica aplicada a la cuantificación relativa de la expresión génica por RT-qPCR, pero utilizando ADN genómico como molde. En esta metodología, un gen proveniente del patógeno (*PIO8*) se utiliza en forma análoga a un gen de interés (**G**ene **O**f **I**nterest), cuya señal variará según el crecimiento del patógeno y donde un gen proveniente del hospedador (*EF-1 α*) se utiliza en forma análoga al gen normalizador (**H**ouse **K**eeping), cuya señal permanecerá constante durante la infección. Al realizar una extracción de ADN del tejido infectado, obteniendo simultáneamente ADN del patógeno y ADN del hospedador, y normalizar la señal proveniente del

patógeno con la señal proveniente de la planta, se consigue tener una cuantificación precisa de la infección *in planta*. Dado que la mínima cantidad de ADN proveniente del patógeno probada en estos ensayos fue de 2 pg, y que 10 pg de ADN son equivalentes a 10-20 núcleos de *P. infestans* (177), pudo estimarse que la metodología permite cuantificar hasta un mínimo de 2-4 células de *P. infestans*. La validación del método se muestra a continuación en la Figura 16.



Continúa en la página siguiente



Comienza en la página anterior

Figura 16. Validación del método de cuantificación *in planta* para *P. infestans*. (A) Perfil de la curva estándar de la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para el gen *EF-1α* de *S. tuberosum* (Rojo: 200 ng; Verde: 20 ng; Azul: 2 ng; rosa: 0,2 ng; amarillo: 0,02 ng). (B) Perfil de la curva estándar de la qPCR para el gen *PIO8* de *P. infestans* (Rojo: 20 ng; Verde: 2 ng; Azul: 0,2 ng; rosa: 0,02 ng; amarillo: 0,002 ng). *M*: pendiente; *R*²: coeficiente de correlación; *E*: eficiencia de la reacción. (C) curva estándar de la qPCR para el gen *EF-1α*. (D) curva estándar de la qPCR para el gen *PIO8*. Todas las desviaciones estándar estuvieron por debajo del 5%. (E) Perfil de qPCR mostrando la especificidad de *EF-1α*. Verde: qPCR utilizando ADN de *S. tuberosum* como molde. Naranja: qPCR utilizando ADN de *P. infestans* como molde. (F) Perfil de qPCR mostrando la especificidad de *PIO8*. (G) Perfil de desnaturalización mostrando la especificidad de *EF-1α*. (H) Perfil de desnaturalización mostrando la especificidad de ADN de los tejidos infectados. (I) Comida electroforética en un gel de agarosa 4% mostrando la especificidad de las qPCRs para *EF-1α* y *PIO8*. *EF-1α* es un amplicón con un peso esperado de 126 pb y *PIO8* es un amplicón con un peso esperado de 64 pb. (J) Monitoreo por qPCR del crecimiento *in planta* de *P. infestans* en tubérculos. Las imágenes inferiores son discos representativos de las muestras de tubérculos infectados. (K) Monitoreo por qPCR del crecimiento *in planta* de *P. infestans* en hojas. Las imágenes inferiores son discos representativos de las muestras de hojas infectadas. En J y K, los valores promedio obtenidos al sexto día post inoculación se fijaron en 100% y las barras de error representan el \pm SEM de 20 muestras individuales. (L) Dispersión del valor umbral de amplificación de *EF-1α* para muestras representativas a lo largo del experimento. Las líneas entrecortadas indican el rango de dispersión del valor umbral de amplificación entre distintas muestras. (M) Análisis estadístico de la dispersión del valor umbral de amplificación de *EF-1α* para muestras representativas a lo largo del experimento. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) de acuerdo con el análisis de ANOVA. Este análisis demuestra que la cantidad y calidad del ADN de los tejidos infectados se mantiene constante a lo largo del experimento y, por lo tanto, que la cuantificación es precisa y no un artefacto producido por fluctuaciones en el ADN del hospedador. Las barras de error representan el \pm SEM de 20 muestras individuales.

Una vez establecido el método de detección propuesto se prosiguió con la experimentación inoculando muestras de tubérculos WT y -PPO con *P. infestans*. El crecimiento del microorganismo progresó de manera similar en los controles WT y las líneas transgénicas durante los primeros cuatro días de infección. Sin embargo, al quinto y sexto día, todas las líneas transgénicas presentaron una reducción significativa ($P \leq 0,05$) de la carga del patógeno en comparación con los controles WT (Figura 17A). Para estudiar si la construcción de silenciamiento con la que las líneas transgénicas habían sido transformadas estaba silenciando también genes de *P. infestans* y, como consecuencia, dificultando el crecimiento del patógeno, se examinó el genoma de *P. infestans* (82) en busca de secuencias complementarias a la horquilla de silenciamiento de PPO. La búsqueda usando la base de datos del sitio del Broad Institute de Harvard y el MIT (Massachusetts Institute of Technology) (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/phytophthora_infestans/MultiHome.html) (82) no identificó ninguna secuencia blanco en el genoma de *P. infestans*. Sin embargo, una búsqueda en la base de datos del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) permitió identificar tres secuencias parcialmente complementarias de entre 11 y 15 nucleótidos de longitud. Estas secuencias correspondieron al gen de la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa de *P. infestans* (ACCATTAGCTG; GQ247676.1), el gen NUK7 de *P. infestans* (TGTTCTGACTGAGTT; EF137256.1) y el retrotransposón tipo-copia de PICR2 de *P. infestans* (TGTAATIGCAAAA; EU567070.1) (Tabla 3). Si bien la información existente sobre la maquinaria de silenciamiento de ARN de *P. infestans* es aún relativamente limitada (178), dado que las vías de silenciamiento de ARN eucariotas operan con ARNs pequeños de entre 20 y 25 nucleótidos de longitud (60, 61, 179, 180), la longitud de las secuencias identificadas podría no ser suficiente como para desencadenar un evento de silenciamiento génico.

Tabla 3. Secuencias complementarias a la horquilla de silenciamiento de PPO encontradas en el genoma de *P. infestans*.

Base de datos	Secuencia	Longitud (pb)	Nº de acceso	Descripción
Broad Institute	-	-	-	-
NCBI	TGTTCTGACTGAGTT	15	EF137256.1	gen NUK7
NCBI	ACCATTAGCTG	11	GQ247676.1	Subunidad 1 NADH deshidrogenasa
NCBI	TGTAATIGCAAAA	13	EU567070.1	Retrotransposón tipo-copia PICR2

Además, para investigar si el fenómeno observado en las líneas transgénicas estaba influenciado por la expresión alterada de genes de resistencia, se midió por transcripción reversa seguida de PCR (RT-PCR) la expresión de varios genes relacionados a la resistencia a estrés biótico. A excepción de PPO (que fue amplificado utilizando un par de oligonucleótidos diseñados para detectar todas sus variantes. Véase Figura 5), los patrones de expresión fueron muy similares entre las líneas transgénicas y WT, tanto en las muestras no infectadas como infectadas (Figura 17B). Al medir la actividad de PPO en estas muestras, se encontró un incremento de actividad en todas las líneas infectadas, en comparación con los controles no infectados, y este incremento resultó significativamente ($P \leq 0,05$) mayor en las muestras WT infectadas que en las muestras -PPO infectadas (Figura 17C). Sin

embargo, al interpretar este resultado, debe tenerse en cuenta que, independientemente de cualquier inducción de la actividad de PPO vegetal provocada por el escenario infeccioso, estas medidas representan las actividades de PPO de la planta y del patógeno en su conjunto. Por otro lado, dado que la inducción de PPO a causa del daño mecánico es un fenómeno ampliamente conocido (182-184), parte del aumento de la actividad de PPO en las muestras infectadas podría deberse al daño mecánico producido en estos tejidos durante la preparación de las muestras. A su vez, debe obrarse con doble cautela en este caso ya que experimentos de actividad realizados en geles, que permiten visualizar distintas enzimas capaces de catalizar una determinada reacción, sugieren que la medición de actividad de PPO por oxidación de L-DOPA no es totalmente específica para PPO ya que pueden visualizarse bandas equivalentes tanto en las líneas WT como transgénicas (Figura 17D).

Cuando las muestras infectadas fueron examinadas al microscopio, no se logró distinguir el patógeno del tejido de la planta. Sin embargo, bajo luz láser azul (488 nm), una señal de autofluorescencia originada por compuestos fenólicos fue observada más intensamente en las muestras -PPO (Figura 17F). Para obtener una mejor comprensión del proceso de infección, se repitieron los experimentos con una cepa de *P. infestans* que expresa constitutivamente la proteína fluorescente verde (147). Con esta estrategia, fue posible examinar microscópicamente el crecimiento del patógeno y, una vez más, se observaron señales autofluorescentes diferentes entre los tejidos WT y -PPO (Figura 17G-K). Tanto la evaluación por microscopía de fluorescencia como por microscopía confocal permitieron identificar que la autofluorescencia observada en las plantas transgénicas se originaba de células que estaban alrededor del patógeno (Figura 17G recuadro II y Figura 17I y 17K). Estas observaciones sugieren que el aumento de la resistencia a *P. infestans* en las líneas -PPO probablemente involucre la participación de compuestos de defensas fenólicos (48, 49, 52, 181).

La medición de fenoles totales por la técnica de Folin-Ciocalteu (150) reveló un aumento en la cantidad de fenoles en las muestras infectadas (Figura 18A). Sin embargo, a pesar de que los extractos fenólicos de las muestras infectadas eran considerablemente distintos a simple vista, esta técnica no permitió detectar diferencias significativas entre las muestras WT y -PPO (Figura 18A). A raíz de esta limitación, se continuó con un análisis metabólico por GC-MS (132) en un intento de identificar intermediarios fenilpropanoides en las muestras experimentales. En un compromiso por analizar los cambios metabólicos debidos a la infección y detectar predominantemente metabolitos provenientes de la planta, se decidió trabajar con muestras del segundo día post inoculación. Esta elección pareció razonable dado que es común empezar a observar síntomas de la enfermedad al segundo día post infección y que previamente se había establecido que en este punto la biomasa del patógeno no era significativamente diferente entre las distintas líneas ni se incrementaba demasiado con respecto al primer día post inoculación (Figura 17A). Desafortunadamente, esta técnica no permitió detectar metabolitos de la vía de los fenilpropanoides. De todas formas, el análisis comparativo por PCA de los perfiles metabólicos completos de muestras WT y transgénicas infectadas y no infectadas mostró que las plantas WT sufrían mayores alteraciones metabólicas a causa de la infección que las plantas -PPO (Figura 18B). Una descripción de los metabolitos medidos se muestra en la Figura 18C, y el modelo propuesto para explicar la resistencia incrementada en las líneas -PPO se muestra en la Figura 18D.

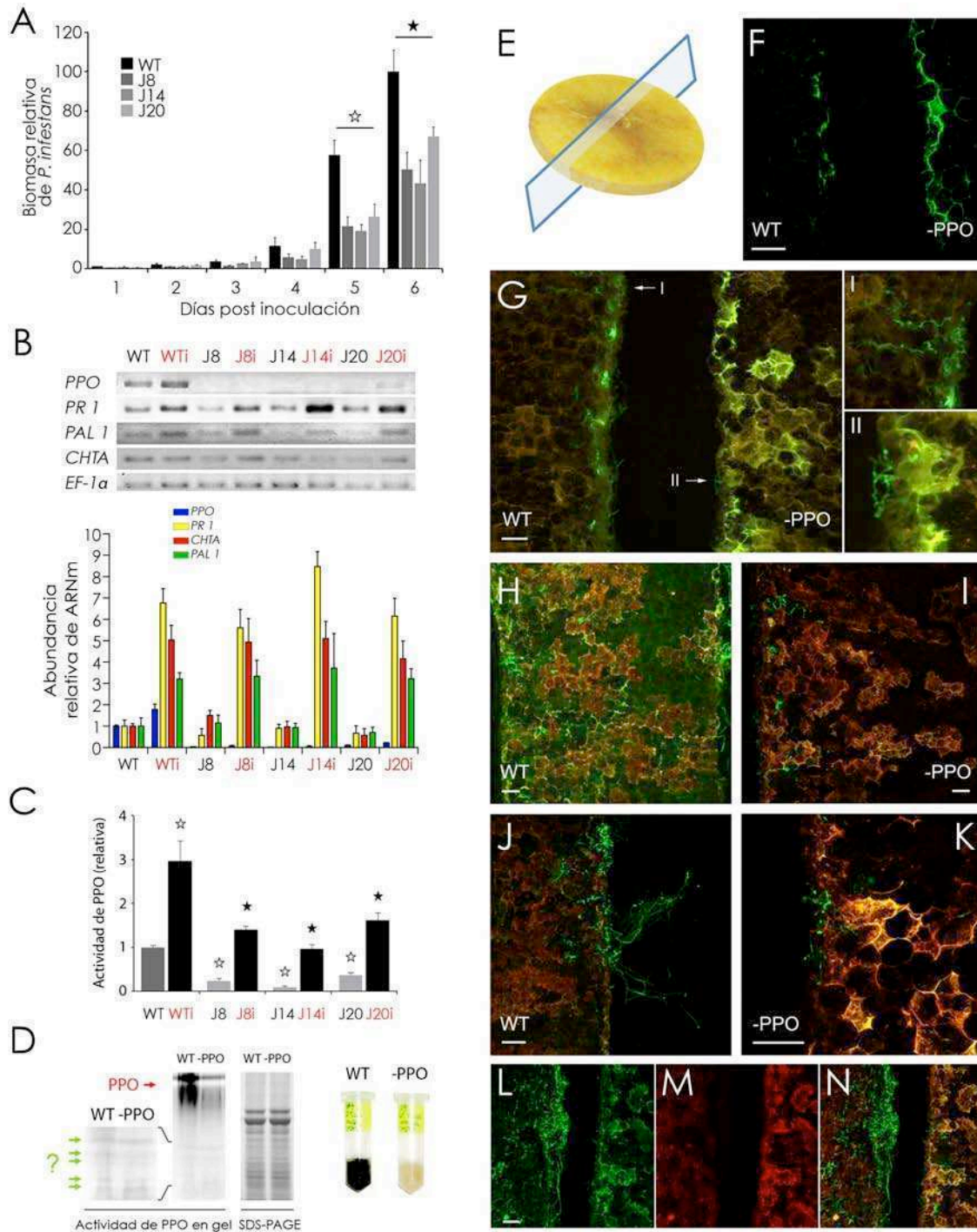


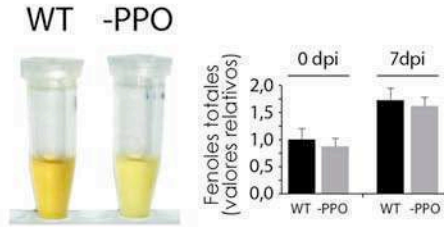
Figura 17. Ensayos de infección con *Phytophthora infestans*. (A) Crecimiento de *P. infestans* en muestras WT y -PPO (J8, J14 y J20). La biomasa del patógeno se determinó mediante qPCR. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los días 1 y 4, pero todas las líneas transgénicas presentaron significativamente ($P \leq 0,05$) menor carga del patógeno que los controles WT al quinto (☆) y sexto día (★) de acuerdo con el análisis *t* de Student. El valor promedio para WT obtenido al sexto día post inoculación se fijó en 100%. Las barras de error representan el \pm SEM de 16 a 20 muestras individuales. (B) Análisis de RT-PCR y RT-qPCR de la abundancia de ARNm de *PPO*, *PR1*, *PAL1* y *CHTA*. *EF-1α* se usó como control endógeno. (C) Actividad de PPO en muestras WT y -PPO no infectadas e infectadas con *P. infestans*. Los datos se presentan como las actividades relativas con respecto a los controles WT. Las barras de error representan el \pm SEM de seis muestras individuales de cada línea. Las muestras con una estrella blanca (☆) fueron significativamente ($P \leq 0,05$) diferentes de la muestra WT no infectada y las muestras con una estrella negra (★) fueron significativamente ($P \leq 0,05$) diferentes de la muestra WT infectada de acuerdo con el análisis *t* de Student. (D) Ensayo de actividad de PPO en gel que sugiere que el ensayo de actividad de PPO por oxidación de L-DOPA no es específico. La flecha roja señala la principal señal detectada, presuntamente originada por las

proteínas PPO, ya que es mínimamente detectada en las muestras transgénicas. El panel de la izquierda es una magnificación de la región inferior del gel, donde pueden verse bandas de menor intensidad, correspondientes a proteínas no identificadas tanto en las muestras WT como -PPO. El panel de la derecha es un gel SDS-PAGE de proteínas totales teñido con azul de Coomassie como control de carga. También se muestra el aspecto de los extractos de proteínas WT y -PPO al cabo de unos minutos. (E) Representación esquemática de los planos analizados por microscopía. (F) Microscopía confocal de muestras WT y -PPO infectadas con *P. infestans* donde puede apreciarse la acumulación diferencial de compuestos autofluorescentes fenólicos. La imagen se obtuvo mediante excitación con luz láser azul, bajo la cual los fenoles vegetales fluorescen de color verde. (G) Microscopía de fluorescencia de muestras WT y -PPO infectadas con GFP-*P. infestans* donde puede observarse el crecimiento del patógeno (en verde) y la acumulación de compuestos autofluorescentes fenólicos (en amarillo). Las regiones indicadas por las flechas se muestran en los paneles I y II para su mejor examen. Las imágenes se obtuvieron mediante excitación con luz UV, bajo la cual los fenoles vegetales fluorescen de color amarillo y GFP-*P. infestans* de color verde. (H) Microscopía confocal de muestras WT infectadas con GFP-*P. infestans* donde se aprecia el crecimiento del patógeno dentro del tejido vegetal. (I) Microscopía confocal de muestras -PPO infectadas con GFP-*P. infestans* donde puede verse que el crecimiento del patógeno colocaliza con células vegetales autofluorescentes. (J) Microscopía confocal mostrando el crecimiento de GFP-*P. infestans* sobre la superficie del tejido WT. (K) Microscopía confocal mostrando el crecimiento de GFP-*P. infestans* sobre la superficie del tejido -PPO. Las imágenes H-K se obtuvieron fusionando las imágenes obtenidas mediante excitación con luz láser azul y verde. Bajo luz láser azul, tanto los fenoles vegetales como GFP-*P. infestans* fluorescen de color verde (L). Bajo luz láser verde, sólo los fenoles vegetales fluorescen de color rojo (M). Cuando se fusionan las imágenes obtenidas con luz láser azul y verde los fenoles vegetales se observan en amarillo/naranja y GFP-*P. infestans* en verde (N). Todas las imágenes son representativas de muestras evaluadas al séptimo día post inoculación. Barra: 200 μm .

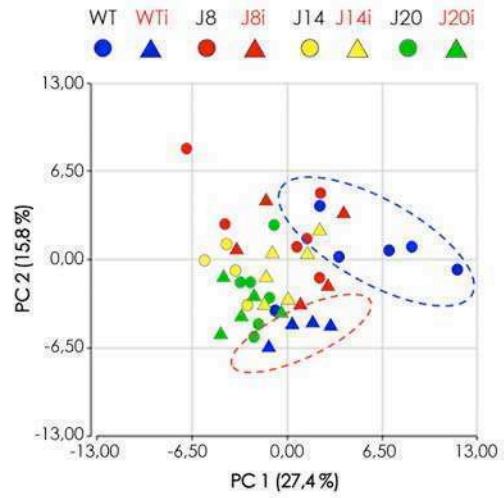
Próximas dos páginas

Figura 18. Análisis de compuestos fenólicos y del metabolismo primario de líneas WT y -PPO infectadas con *P. infestans*. (A) Aspecto y cuantificación de extractos fenólicos totales de muestras WT y -PPO luego de siete días post infección (dpi) con *P. infestans*. Los datos se muestran normalizados a los valores promedio de las muestras WT 0 dpi. (B) Análisis de componentes principales (PCA) comparativo de los perfiles metabólicos completos de muestras WT y -PPO no infectadas (WT, J8, J14 y J20) e infectadas con *P. infestans* (WTi, J8i, J14i y J20i). Las muestras WT presentaron mayores alteraciones metabólicas (indicadas por las elipses entrecortadas) que las líneas transgénicas. Lamentablemente, esta técnica no permitió detectar intermedios fenilpropanoides. (C) Contenido relativo de metabolitos en tubérculos WT (columnas azules), J8 (columnas rojas), J14 (columnas amarillas) y J20 (columnas verdes). Las barras de error representan el \pm SEM. Las diferencias significativas están indicadas con estrellas ($P \leq 0,05$: ★, $P \leq 0,01$: ★★, $P \leq 0,001$: ★★★). Los valores fueron normalizados a los de los controles WT no infectados. (D) Modelo propuesto de la respuesta de defensa diferencial observada en las plantas -PPO. En las células vegetales WT, las respuestas de defensa mediadas por compuestos fenólicos libres son interferidas por la actividad de PPO que promueve su polimerización y precipitación. Por lo tanto, en estas células, la disponibilidad de fenoles libres para mecanismos de defensa se reduce y la infección se propaga rápidamente. En las células -PPO, la disponibilidad de fenoles libres para mecanismos de defensa no es restringida por la actividad de PPO. Por lo tanto, hay mayores cantidades de fenoles libres disponibles para las respuestas de defensa y la infección se propaga de forma más lenta.

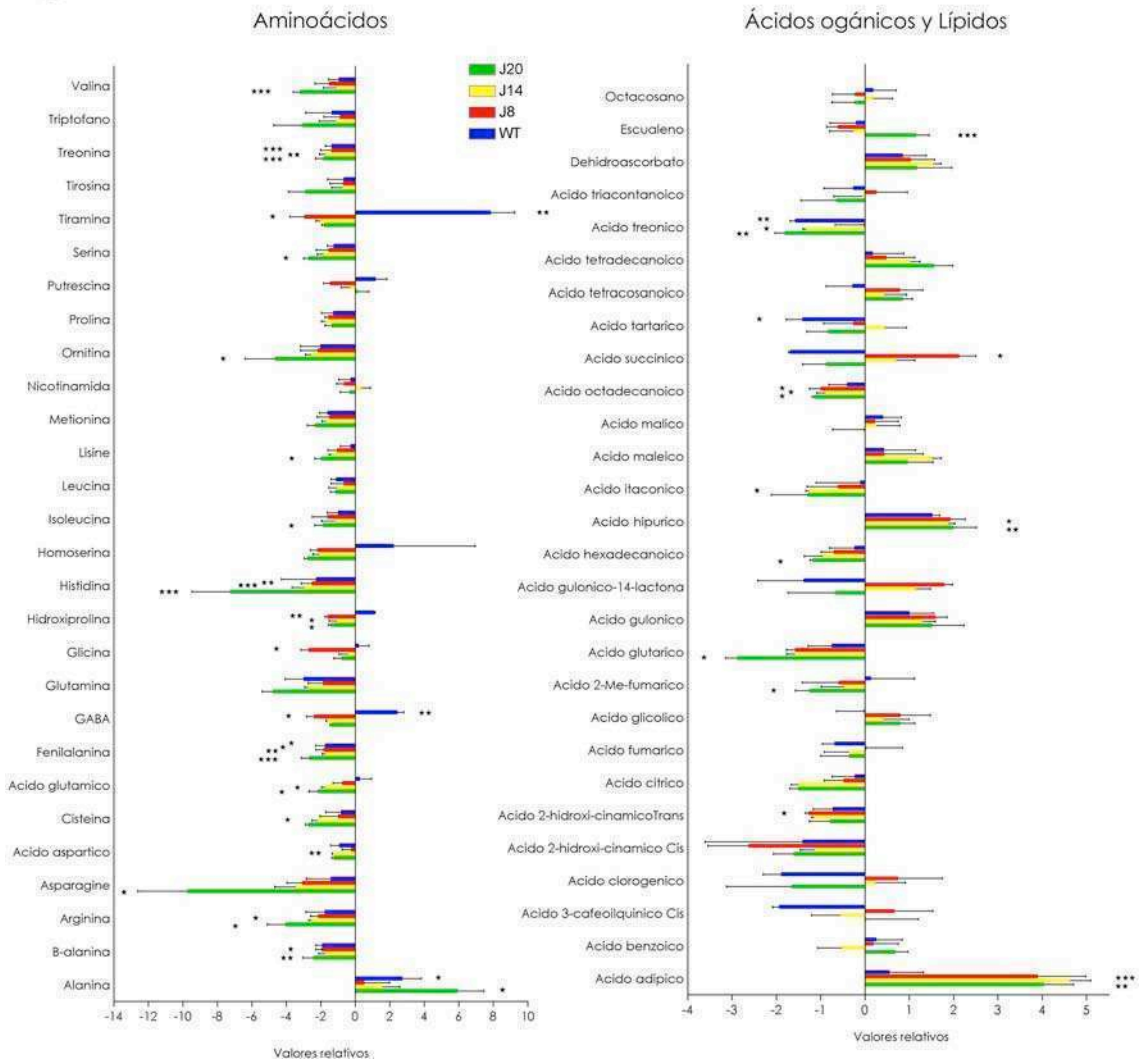
A



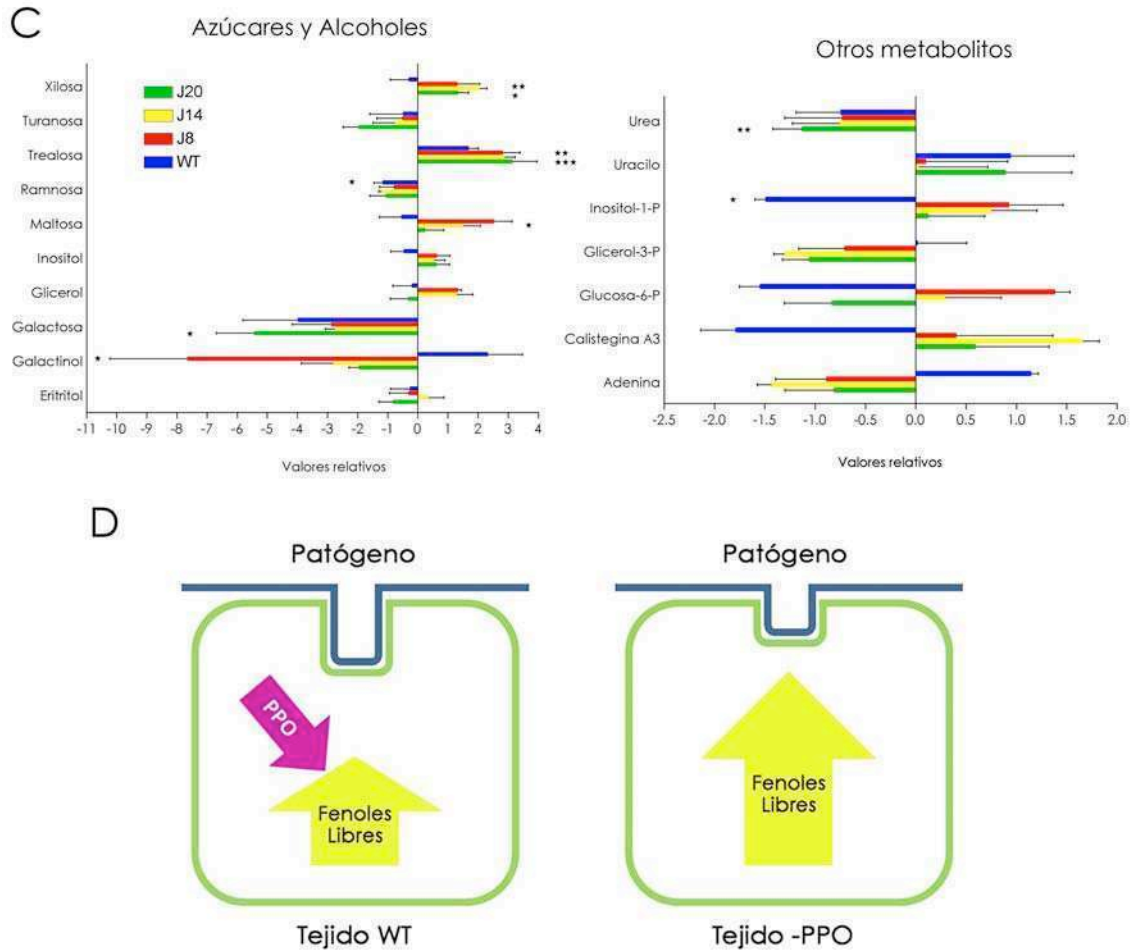
B



C



Continúa en la página siguiente



Filo genia y evo luc ió n de *PPO*

Un examen de los genomas que se encuentran secuenciados o en estado avanzado de secuenciación permitió confirmar que el dominio Tiro sinasa (PFAM00264), compartido por las proteínas de unión a cobre de tipo 3 como las PPO (Véase De las polifenol oxidasa s y sus sustra tos fenó licos en la sección de Introducc ió n), tiene una distribuc ió n muy amplia en los seres vivos (Figura 19). Además del dominio tiro sinasa, las PPO vegeta les poseen otros dos dominios característic os, un dominio DWL (PFAM12142) y un dominio KFDV (PFAM12143). El análisis filogenético de PPO demostró que esta proteína es ubicua en todas las plantas terrestres (a excepc ió n de *Arabidopsis* (14)), pero que, llamativa mente, parece estar ausente en los ancestros de las plantas terrestres, ya que no pudieron encontrarse genes ortólogos en las algas verdes (Figura 20A). A su vez, PPO también parece estar ausente en el resto de los organismos eucariotas; sin embargo, analizando todas las secuencias disponibles en bases de datos, es evidente que el gen de *PPO* (o un gen de proto-*PPO*) está presente en todo un grupo de bacterias. Estos genes bacterianos poseen variaciones de los dominios DWL y KFVD asociados a dominios completos Tiro sinasa y, en casos como el de *Ralstonia solanacearum*, estos dominios son prácticamente idénticos a los de las PPO vegeta les (Figura 20B). De hecho, un análisis filogenético más amplio de PPO

posicionó a *Ralstonia* y este grupo de bacterias en la raíz de la rama de las plantas terrestres (Figura 21). Por otro lado, el gen de PPO de *Ralstonia* se encuentra dentro de una isla genómica (img.jgi.doe.gov) (185). Las islas genómicas son elementos especializados en la transferencia de material genético entre distintos organismos y por lo tanto, la localización de un gen dentro de una isla genómica constituye un fuerte indicio de la ocurrencia de una transferencia horizontal de genes de PPO de bacterias a plantas. A su vez, el porcentaje de bases GC de los genes de PPO de plantas ($44,6 \pm 3,8\%$ en dicotiledóneas, $68,4 \pm 0,6\%$ en monocotiledóneas, $63,3\%$ en *S. moellendorffii* y $51,1\%$ en *P. patens*) es ampliamente superior al de sus genomas ($36,3 \pm 2,3\%$ en dicotiledóneas, $44,1 \pm 3,67\%$ en monocotiledóneas, $45,1\%$ en *S. moellendorffii* y 31% en *P. patens*), como cabría esperar si este gen proviniese de bacterias, las cuales poseen genomas con un alto contenido de GC (Ej. PPO de *Ralstonia*: $63,6\%$, genoma de *Ralstonia*: $66,2\%$).

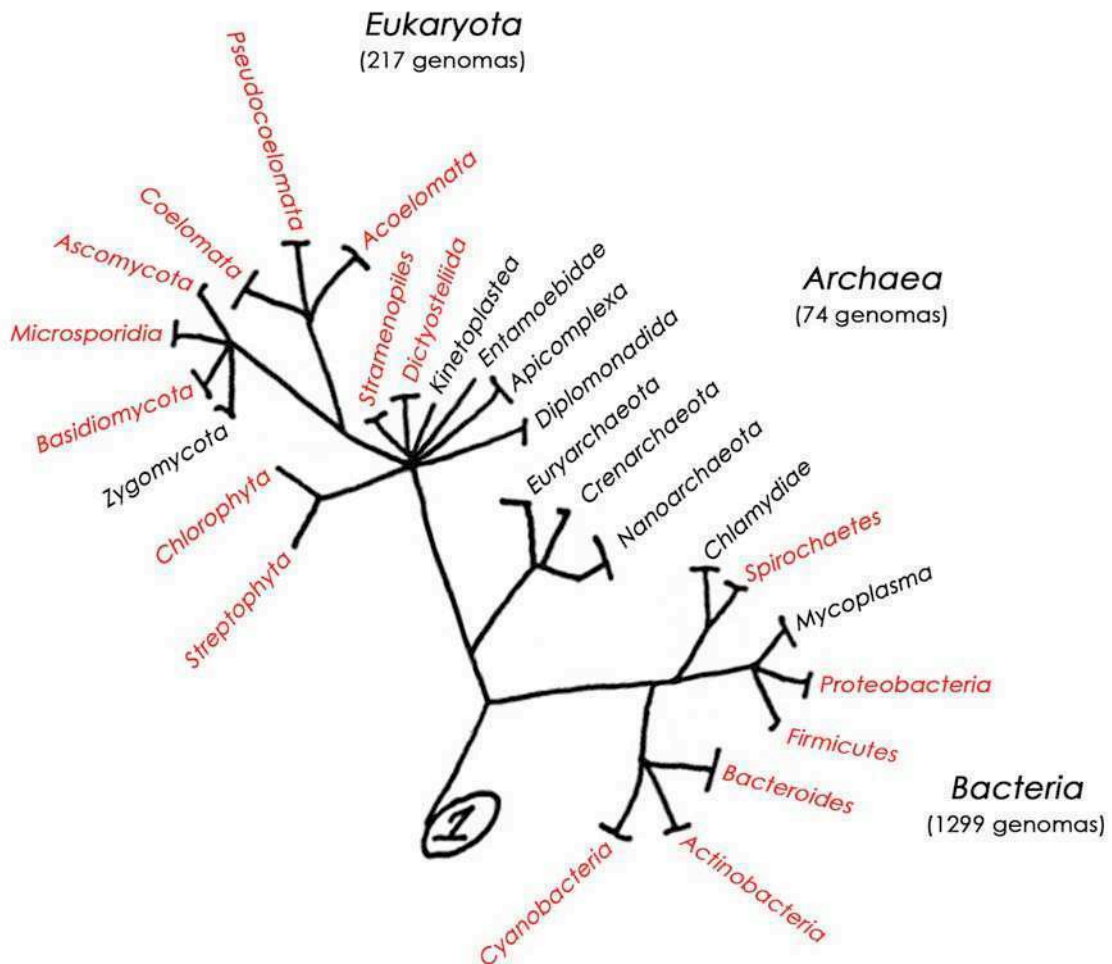


Figura 19. Distribución del dominio Tirosinasa (PFAM00264). Usando como modelo el primer dibujo del “árbol de la vida” (~1837) de Charles Darwin, se muestran en rojo las phyla en donde se encuentra presente el dominio PFAM00264, común a las proteínas de unión a cobre de tipo 3, y en negro las phyla en donde no se ha detectado. Entre paréntesis se indica el número de genomas secuenciados o en estado avanzado de secuenciación que fueron examinados para cada dominio de la vida (Bacteria, Eukaryota y Archaea). El número ① en la base del árbol representa el ancestro que dio origen a las Bacterias, los Eukaryotas y las Archaeas.

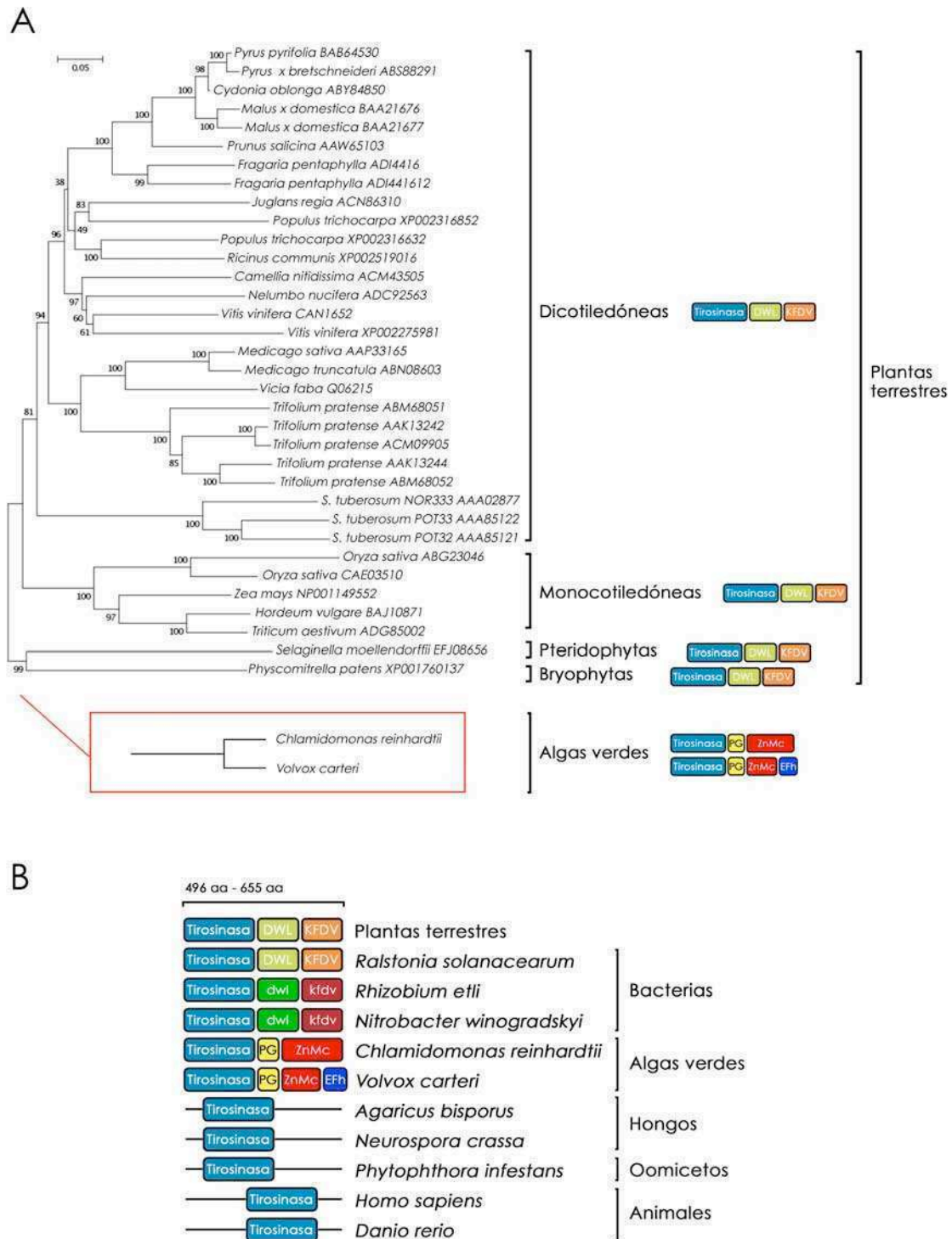
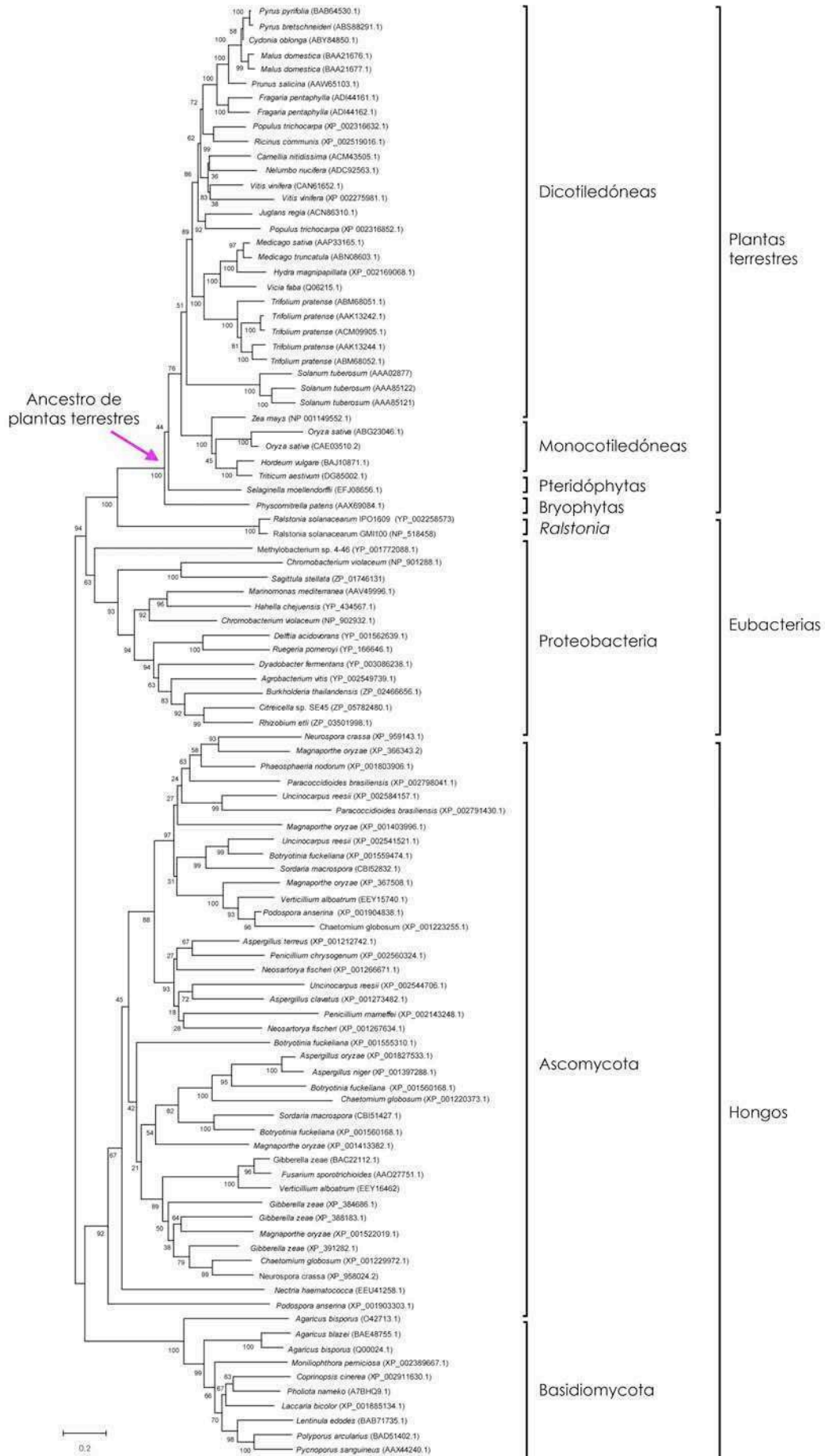


Figura 20. Filogenia y estructura de las polifenol oxidasas (PPO). (A) Análisis filogenético de PPO dentro del clado Viridiplantae. PPO está ampliamente representada en todas las plantas terrestres, aún en las plantas terrestres más ancestrales como las bryophytas y pteridophytas, no obstante, las algas verdes no parecen contar con genes ortólogos de PPO. Se muestra también que mientras todos los organismos pertenecientes al clado Viridiplantae poseen el dominio tirosinasa (PFAM00264), sólo las plantas terrestres poseen los dominios DWL (PFAM12142) y KFDV (PFAM12143). Los números de acceso se indican a continuación de los nombres. Los números de los nodos representan los valores de probabilidades de bootstrap. La barra de escala representa el número medio de sustituciones por sitio. PG: dominio de unión a peptidoglicano (PFAM01471). ZnMc: dominio metaloproteasa dependiente de zinc (CD00203). EFh: dominio de unión a calcio hélice-vuelta-hélice (CD00051). (B) Esquema del alineamiento estructural de distintas proteínas que comparten el dominio Tirosinasa. Los números superiores muestran el rango del tamaño total de las proteínas utilizadas. aa: aminoácidos. dwl y kfdv con letras minúsculas representan dominios similares a DWL y KFDV.



Página anterior

Figura 21. Evidencia filogenética de una posible transferencia horizontal del gen de polifenol oxidasa (PPO) de bacterias a plantas terrestres. *Ralstonia solanacearum* y todo un grupo de bacterias se ubican en la raíz de la rama que agrupa a las plantas terrestres. Los números de acceso se indican entre paréntesis. Los números de los nodos representan los valores de probabilidades de bootstrap. La barra de escala representa el número medio de sustituciones por sitio.

Por otro lado, un análisis de similitud del dominio Tiro sinasa de organismos representantes de diversos phyla demuestra claramente que el dominio Tiro sinasa de las PPO de plantas se encuentra más emparentado al dominio Tiro sinasa de bacterias que al dominio Tiro sinasa de las algas verdes (Figura 22). Por lo tanto, basándonos en todos estos análisis, podemos encontrar fuertes evidencias que sustentan la hipótesis de que, por un lado, el ancestro común de todos los procariontes, si bien poseía proteínas de unión a cobre de tipo 3 similares a PPO, no contaba con los genes que codifican para las PPO vegetales y, por otro lado, de una posible transferencia génica horizontal del gen de PPO desde un grupo de bacterias a alguno de los ancestros de las plantas terrestres.

En conjunto, estos resultados permiten elaborar al menos tres posibles escenarios evolutivos para el origen de las polifenol oxidasas vegetales: 1) Un gen procarionte de PPO fue adquirido por transferencia horizontal por el ancestro del linaje Archaeplastida. Luego, este gen fue perdido en dos oportunidades por el ancestro de las Rhodophytas (Algas rojas) y por el ancestro de las Algas verdes, encontrándose ahora solo en Plantas terrestres (Figura 23A); 2) Un gen procarionte de PPO fue adquirido por transferencia horizontal por el ancestro del clado Viridiplantae. Luego, este gen fue perdido por el ancestro de las Algas verdes, encontrándose ahora sólo en Plantas terrestres (Figura 23B); 3) Un gen procarionte de PPO fue adquirido por transferencia horizontal por el ancestro de las Plantas terrestres (Figura 23C). Si bien aún no es posible tener mayores certezas, el tercer escenario (Figura 23C) es el más parsimonioso de los tres, ya que no implica eventos de pérdida génica, en comparación con los múltiples eventos de pérdida génica necesarios en el primer y el segundo escenario (Figura 23A y 23B respectivamente). A su vez, el hecho de que no existan genes ortólogos a los genes de PPO vegetales en otros organismos eucariotas además de las plantas terrestres desacredita la posibilidad de que este gen estuviese presente en el organismo eucariota ancestral que dio origen a todos los eucariotas. Este último escenario es muy improbable, ya que implicaría múltiples eventos de pérdida génica en prácticamente todos los grupos eucariotas a excepción de las plantas terrestres.

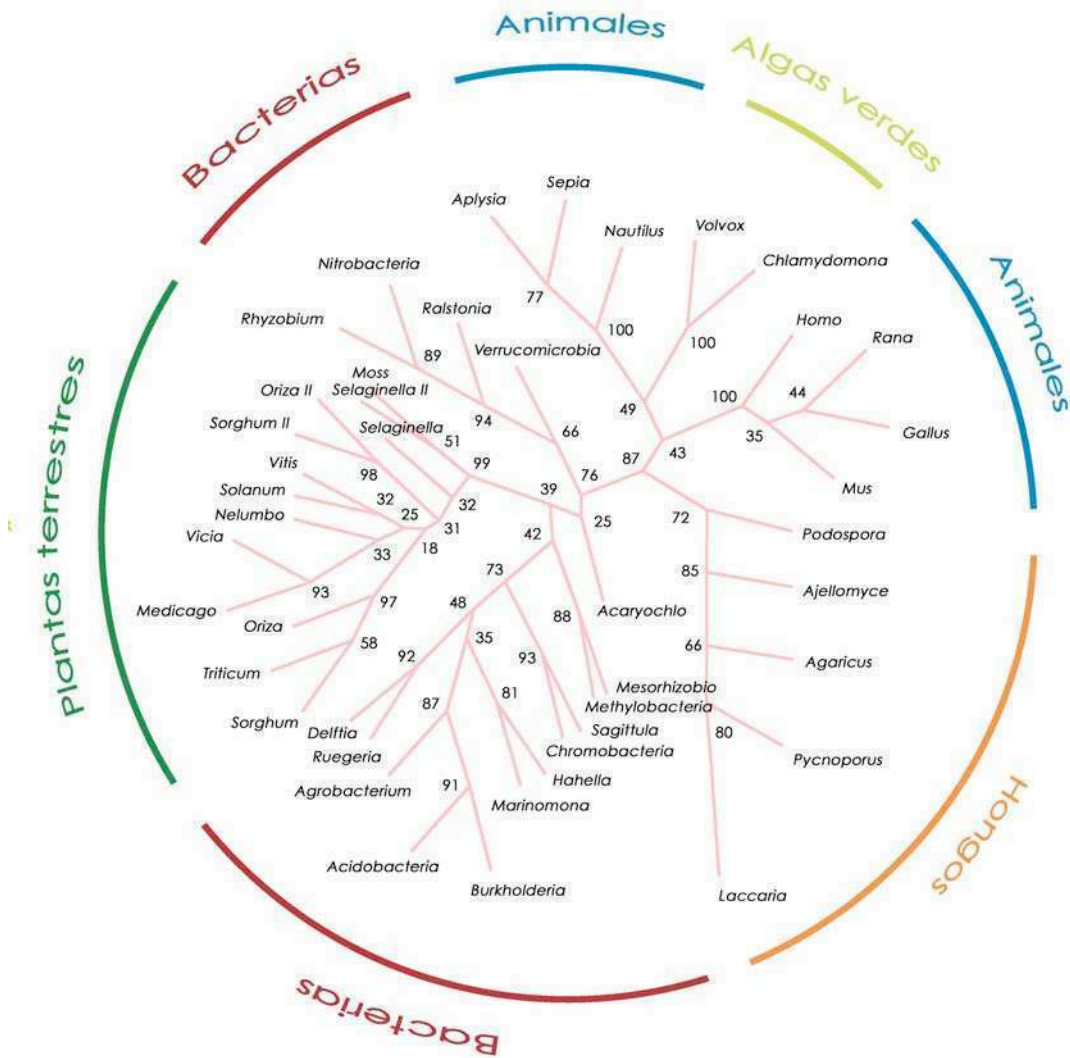


Figura 22. Análisis comparativo del dominio Tiro sinasa. Los dominios Tiro sinasa de las plantas terrestres están más emparentados a los dominios Tiro sinasa de diversas bacterias que a los dominios Tiro sinasa de las algas verdes. El árbol fue construido únicamente con dominios Tiro sinasa. Los números de los nodos representan los valores de probabilidades de bootstrap.

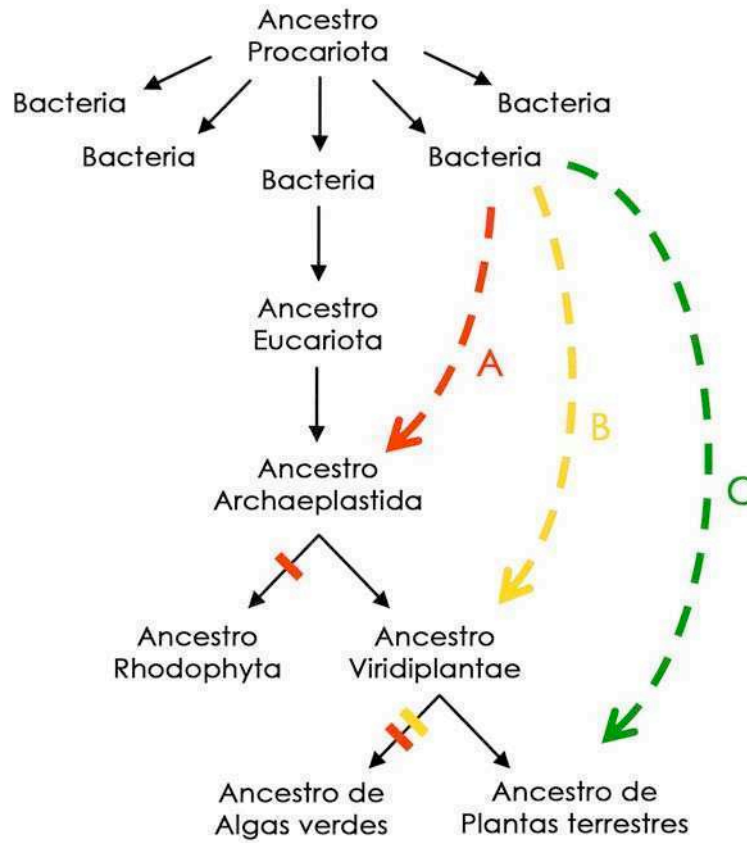


Figura 23. Tres posibles escenarios evolutivos para el origen de las polifenol oxidasas (PPO) vegetales. (A) Un gen procariota de *PPO* fue adquirido por transferencia horizontal por el ancestro del linaje Archaeplastida. Luego este gen fue perdido en dos oportunidades por el ancestro de las Rhodophytas (Algas rojas) y por el ancestro de las Algas verdes, encontrándose ahora solo en Plantas terrestres. (B) Un gen procariota de *PPO* fue adquirido por transferencia horizontal por el ancestro del clado Viridiplantae. Luego este gen fue perdido por el ancestro de las Algas verdes, encontrándose ahora solo en Plantas terrestres. (C) Un gen procariota de *PPO* fue adquirido por transferencia horizontal por el ancestro de las Plantas terrestres. Las flechas negras representan las ramas del árbol filogenético. Las flechas entrecortadas de colores representan los posibles eventos de transferencia génica horizontal del gen de *PPO*. Las rayas de colores transversales a las flechas negras representan los posibles eventos de pérdida del gen de *PPO*. EL mismo código de colores usado para las transferencias génicas horizontales y eventos de pérdida génica.

Discusión

*“Nunca sabemos
si algo está bien o está mal
eso el tiempo lo decide
por selección natural” **

Además de discutir los resultados obtenidos en este trabajo, a lo largo de esta sección intentaré destacar los distintos puntos que considero importantes y que utilizaré para sustentar la racionalidad del modelo que finalmente propondré sobre la evolución y el rol biológico de las enzimas polifenol oxidasas vegetales.

El modelo y el impacto de PPO sobre el metabolismo

La mitad de los cultivos de hortalizas del mundo se pierden debido al deterioro que ocurre en las etapas de post-cosecha (186). La inhibición de pardeamiento en forma industrial se realiza mediante la aplicación de anti-oxidantes, siendo los aditivos a base de sulfitos los más ampliamente utilizados a pesar de tener efectos adversos para la salud humana (89). Por lo tanto, la implementación de cultivos no susceptibles a la oxidación enzimática podría aliviar la utilización industrial de estos aditivos, reduciendo los costos de producción y mejorando al mismo tiempo la salud pública. Además, su adopción podría impactar positivamente en la productividad, disminuyendo las pérdidas post-cosecha y prolongando la vida útil de los vegetales.

La elección de utilizar Spunta vino dada por ser esta la variedad de papa más difundida en Argentina (<http://www.argenpapa.com.ar/default.asp?id=6423>). Con respecto al diseño del vector de silenciamiento para los genes de polifenol oxidasas (PPO), se optó por utilizar un promotor constitutivo porque la expresión de los genes de

* Fragmento de “*Milonga darwiniana*” en “*Diez Teorías que Conmovieron al Mundo: de Copérmico al Big Bang*” por Leonardo Moledo y Esteban Magnani (2009). Capital Intelectual. Buenos Aires.

PPO comienza en las primeras etapas del desarrollo de los tejidos vegetales y porque las enzimas PPO tienen una vida media muy larga (4, 39). Haber escogido un promotor inducible hubiera conllevado el riesgo de que el silenciamiento de ARN se disparara en forma tardía, luego de que las enzimas PPO ya se hubiesen sintetizado. A su vez, considerando la alta identidad que existe entre las distintas variantes de PPO, el haber logrado silenciar simultáneamente todos los genes principalmente expresados en papa (*POB2*, *POB3* y *NOR333*) (4), hace que este sea un buen modelo para investigar el elusivo rol biológico de estas enzimas. De haber silenciado sólo algunas variantes de PPO, cabe la posibilidad de que efectos compensatorios entre las distintas enzimas hubieran encubierto los resultados obtenidos. Queda pendiente el análisis de la expresión de otros genes de PPO una vez que el ensamblado del genoma de *S. tuberosum* esté terminado y puedan examinarse otras secuencias de interés. Alternativamente, estudios de transcripción global (187, 188) podrían dar una mayor certeza sobre el grado de silenciamiento alcanzado, aunque considerando la baja actividad de PPO detectada en las líneas transgénicas, puede especularse que este ha sido prácticamente completo. Además, en concordancia con los resultados de expresión y actividad, los niveles de proteína PPO y pardeamiento enzimático se redujeron notablemente en los tubérculos de las líneas transgénicas. Vale la pena mencionar que, aún con estas alteraciones tan drásticas en la actividad de una enzima a la que durante décadas se le ha intentado asignar un rol metabólico, tanto la morfología y el crecimiento, como así también la productividad fueron indistinguibles entre las líneas -PPO y los controles silvestres (WT, de sus siglas en inglés Wild Type). Además, los parámetros fotosintéticos fueron comparables entre las plantas -PPO y WT, revelando una conservación de este importante proceso anabólico en las líneas transgénicas y desterrando la creencia de que PPO cumple una función importante en los procesos fotosintéticos (18-21), al menos en condiciones libres de estrés. Estos resultados son concordantes con informes previos realizados en otras especies vegetales, donde se reportó que la alteración de la actividad de PPO no parece influir en el crecimiento ni en el desarrollo normal de la planta (32, 92, 189). Además, la ausencia de estas enzimas en *Arabidopsis thaliana* (14) parece señalar hacia esta misma dirección.

Al ahondar en el estudio del metabolismo de estas plantas, se encontró que una gran proporción de los metabolitos detectados presentaban cambios que, si bien no eran mayores, eran significativos entre los tubérculos WT y -PPO; y que tanto el número de metabolitos alterados como la magnitud de estos cambios correlacionaban bien con los niveles de actividad enzimática de las distintas líneas. Dado que estos experimentos se realizaron bajo condiciones ambientales controladas, estos resultados sugieren que PPO sería, al menos en parte, responsable de las modificaciones metabólicas observadas. No obstante, debe tenerse en cuenta la variabilidad individual de las distintas plantas, ya que fenómenos de alta heterogeneidad composicional han sido puestos en evidencia por estudios similares (101, 102). Incluso con un panorama de estas características, algunos resultados del estudio de los perfiles metabólicos parecen proporcionar evidencias convincentes de que las diferencias metabólicas observadas son seguramente consecuencia de la reducción en la actividad de esta enzima: 1) el ácido clorogénico, el principal sustrato de la reacción de pardeamiento enzimático (190), se encontró aumentado en los tubérculos transgénicos; 2) los niveles del metabolito sensor del estrés oxidativo, dehidroascorbato (191), estaban alterados en los tubérculos -PPO; y 3) se encontró

una alta correlación entre el contenido de aminoácidos libres y el nivel de inhibición de la actividad de PPO. Esta última observación ya ha sido reportada en trabajos donde se estudiaron relaciones entre distintos genotipos de papa con diferentes niveles de pardeamiento (91, 192). Por lo tanto, considerando las evidencias disponibles, podemos arribar a la suposición de que, si bien PPO puede ejercer influencias sobre el estado de las redes metabólicas, no es una enzima fundamental del metabolismo de plantas.

Seguridad y percepción de las papas sin pardeamiento

Con más de una década transcurrida desde la introducción de las primeras plantas transgénicas, el mejoramiento de cultivos a través de ingeniería genética sigue siendo un tema de interés público (98, 106, 193) que ha llevado al desarrollo de minuciosas medidas de evaluación antes de que un cultivo modificado sea considerado seguro. El modelo de evaluación actual ha sido ampliamente aplicado y ha demostrado ser satisfactorio para los cultivos transgénicos de primera generación, donde se asume que sólo una característica del cultivo es modificada. Sin embargo, como los cultivos biotecnológicos de la próxima generación serán más complejos, existe la duda de si el modelo actual de evaluación será también adecuado para ellos. Hasta ahora, este problema no había sido abordado con un caso concreto, por lo que se decidió poner a prueba este interrogante con una prueba de concepto. El modelo de papas -PPO desarrollado en este trabajo era adecuado para abordar esta problemática porque, por un lado, se analizaba un cultivo modificado para conseguir una mejora de calidad y, al mismo tiempo, se estudiaba un cultivo donde se habían silenciado varios miembros de una familia génica de función biológica desconocida y, por lo tanto, se potenciaba la ocurrencia de modificaciones metabólicas impredecibles. Antes de este trabajo, sólo unos pocos estudios habían explorado el concepto de equivalencia sustancial (Véase Seguridad y percepción de los cultivos biotecnológicos en la sección de Introducción) en cultivos biotecnológicos de próxima generación (101, 102); sin embargo, nunca antes se habían reportado estudios de seguridad comparativa en cultivos biotecnológicos complejos.

Teniendo en cuenta las diferencias metabólicas encontradas en las distintas líneas transgénicas, se tomó fundamental investigar estos tubérculos en un contexto de consumo alimentario para identificar posibles efectos no intencionales de relevancia toxicológica y/o nutricional. Además, era tentador especular si las papas -PPO sabrían distintas a las WTy, por lo tanto, si tendrían algún efecto en la ingesta. Curiosamente, cuando se realizaron los experimentos de alimentación en ratones, todos los grupos alimentados con dietas suplementadas con papas -PPO consumieron en promedio un ~11 % más papa que los ratones alimentados con dietas suplementadas con papa WT. Esto podría estar originado por características organolépticas diferenciales entre los tubérculos WTy -PPO, derivadas de diferencias como las observadas en los niveles de azúcares y ácidos orgánicos. Por otra parte, estas diferencias también pueden ser debidas, al menos en parte, a la reducción de pardeamiento en los tubérculos -PPO, demorando el deterioro oxidativo y haciendo que estos tubérculos sean más palatables por períodos de tiempo más largos que los WT. Notablemente, no se observaron diferencias significativas en el consumo de alimento balanceado para

medores ni en el crecimiento entre los distintos grupos. Considerando que los tubérculos de papa están compuestos en un ~80 % de agua, podemos especular que el consumo diferencial de papa -PPO observado probablemente no represente un aporte calórico significativo.

Cuando se analizaron los parámetros fisiológicos en los órganos vitales y la sangre de los ratones, no se encontraron signos de toxicidad ni alteraciones del metabolismo. Por otra parte, las distintas dietas tampoco tuvieron efectos adversos sobre la flora microbiana intestinal. Considerando el peso medio de un humano de 70 kg, el promedio mundial de consumo anual per cápita de papa (estimado en 31,3 kg; <http://www.potato2008.org/en/world/index.htm>), y que en estos experimentos los ratones presentaron un peso promedio de 19,6 g y mostraron un consumo medio diario de 2,2 g de papa, es de esperar que se haya logrado un margen de seguridad de exposición de 91,4 veces en estos experimentos de alimentación, equivalente a una ingesta humana de 7,8 kg de papa/persona/día. Además, si bien no es esperado que se expresen proteínas a partir del vector de silenciamiento, los resultados del análisis *in silico* realizado en varias bases de datos, y la falta de toxicidad y alergenicidad del producto del gen selector (159-161), sugieren que no existen riesgos de alergenicidad derivada de la secuencia utilizada en este estudio. Con respecto a este tema, queda pendiente el análisis de las secuencias flanqueantes de los sitios de inserción de la horquilla de silenciamiento, que podría arrojar luz sobre la posible ocurrencia de rearme o escisiones génicas no deseadas y la potencial generación de proteínas de fusión.

Al haber obtenido estos resultados y considerando que la percepción del aroma precede e influye fuertemente a la ingesta de alimentos (194), se decidió estudiar el posible papel del olor de la papa sobre la preferencia de los ratones por las líneas -PPO. Los resultados de los experimentos sensoriales realizados con ratones y humanos mostraron claramente que las reacciones de oxidación catalizadas por PPO alteran el aroma del tubérculo de papa. La evidente preferencia de los ratones por las papas -PPO cuando las muestras están oxidadas parece indicar que, a pesar de cualquier posible diferencia aromática basal entre las distintas líneas, los tubérculos transgénicos conservan una mayor cantidad de compuestos volátiles clave que contribuyen al olor de la papa durante períodos de tiempo mayores que en las líneas WT. Esto también se ve reflejado en los resultados obtenidos con humanos, donde los participantes fueron capaces de discriminar entre las muestras WT y -PPO con una mayor precisión cuando las muestras estaban oxidadas y comentaron que las líneas -PPO presentaban un aroma más intenso que las WT. La falta de diferencias significativas en la prueba de calificación hedónica puede explicarse por el hecho de que la evaluación de los olores en humanos es muy subjetiva debido a variaciones intraespecíficas en la capacidad de detectar y describir los olores (168). A su vez, también podría ser una consecuencia de la utilización de panelistas no entrenados. Además, el olor de la papa cruda puede no representar un estímulo significativamente agradable para los seres humanos, como las puntuaciones intermedias dadas a todas las muestras parecen indicar. Sin embargo, vale la pena mencionar que los participantes evocaron la impresión sensorial de un vegetal conocido más a menudo cuando oían las muestras transgénicas que cuando oían las muestras WT.

Aunque las bases moleculares de la preferencia olfativa por las líneas transgénicas no se estudiaron como parte de este trabajo, varios metabolitos que contribuyen al aroma se encuentran alterados en las líneas -PPO. Por ejemplo, el ácido mirístico, que es utilizado en la fabricación de perfumes y saborizantes, y que además ha demostrado ser un olfatraayente de *Anopheles gambiae* (195) está aumentado más de dos veces en las líneas transgénicas. Por otra parte, los aminoácidos fenilalanina, metionina, valina, leucina e isoleucina, los cuales son conocidos precursores de compuestos volátiles de plantas (196, 197), también se encuentran alterados en las líneas transgénicas. Estas alteraciones aminoacídicas podrían ser indicativas de un cambio metabólico hacia la producción de compuestos volátiles. Además, se puede especular que la inhibición de la reacción de pardeamiento enzimático estaría previniendo la polimerización y precipitación de fenoles volátiles y/u otros compuestos volátiles (197), que permanecerían libres, contribuyendo al aroma más intenso de las líneas transgénicas. En consonancia con estas especulaciones, estudios previos han demostrado que no sólo la calidad del aroma, sino también la intensidad del aroma (concentraciones de volátiles) pueden influir en las preferencias olfativas (138, 140, 198-200). Estos resultados también sugieren que el mayor consumo de tubérculos -PPO observado en los experimentos de alimentación en ratones también está influenciado, al menos en parte, por aromas diferenciales que se acentúan entre las líneas una vez que tienen lugar las reacciones oxidativas catalizadas por PPO. Quedan pendientes los estudios de los perfiles de compuestos volátiles que permitirán identificar las moléculas responsables de estas observaciones. Aunque es bien sabido que las PPO catalizan reacciones oxidativas que alteran las propiedades organolépticas de los alimentos [8,9], la importancia del pardeamiento enzimático y su relación con el aroma no había sido previamente estudiada, viéndolo *a posteriori*, resulta totalmente lógico que esta enzima que cataliza la polimerización de moléculas aromáticas tuviera efectos sobre la composición de compuestos volátiles y el aroma.

De todos estos resultados podemos obtener un variado menú de conclusiones prácticas: 1) La aplicación de los criterios actuales de evaluación parece proporcionar información suficiente como para poder valorar adecuadamente la seguridad de un cultivo transgénico complejo, aún cuando los cultivos transgénicos y WT no sean sustancialmente equivalentes; 2) La evidencia de equivalencia fenotípica no necesariamente coincide con la existencia de equivalencia metabólica; 3) Las papas -PPO, además de tener una vida útil mayor y conservar su aroma por tiempos más prolongados, son aptas para el consumo y no parecen representar un riesgo para la salud; y 4) La actividad de las enzimas PPO altera el consumo, el aroma y la atractividad de los tejidos vegetales.

Implicancias ecológicas

Interesantemente, *Cyclocephala signatilis* también mostró preferencia por las líneas transgénicas en los estudios de alimentación, donde los insectos alimentados con tubérculos -PPO consumieron significativamente más papa que los insectos alimentados con tubérculos WT. Los resultados de estos experimentos son concordantes con estudios previos realizados en insectos (30-32), pero más interesante aún es que éstos están en total armonía con los resultados obtenidos en ratones y

humanos, dando un indicio de la magnitud del potencial alcance de los fenómenos derivados de la actividad de PPO. Estos resultados, sumados al hecho de que los compuestos fenólicos no tienen, aparentemente, un rol defensivo *per se* en la resistencia de plantas contra herbívoros (55, 56), indicarían que es PPO quien, haciendo uso de los compuestos fenólicos, modula, al menos en parte, este tipo de mecanismos defensivos. De las evidencias derivadas de los estudios realizados en animales se deduce como corolario que, desde el punto de vista de un fitófago, la actividad de PPO reduce la palatabilidad y la atractividad de los tejidos vegetales y, desde el punto de vista de la planta, PPO cumple un rol disuasivo ante el ataque de organismos depredadores. Muchos trabajos han apoyado la hipótesis de que la oxidación mediada por PPO disminuye la calidad nutricional de los tejidos vegetales (26, 30, 41, 201-203). Si bien esto no fue evidente en los experimentos *in vivo* realizados en esta tesis, es sugestivo pensar que si PPO efectivamente produce este efecto, el hecho de que además produzca una disminución en la motivación del depredador, podría estar hablando de un mecanismo de interacción evolutiva que, por un lado, reduciría la depredación en vegetales y, por otro lado, promovería la búsqueda de alimentos más nutritivos en animales.

En los experimentos realizados con *Phytophthora infestans*, las líneas de papa transgénicas mostraron una mayor resistencia a este patógeno que las plantas WT, retrasando la progresión de la infección por mecanismos que parecen involucrar, al menos en parte, la participación de compuestos fenólicos. La observación de compuestos fenólicos autofluorescentes y su rol en la defensa de plantas contra microorganismos ha sido ampliamente reportada en la bibliografía (48, 49, 52, 181). En el modelo propuesto en la Figura 18D, las respuestas de defensa mediadas por compuestos fenólicos libres son interferidas por la actividad de PPO, que promueve su polimerización y precipitación en las plantas WT. Por lo tanto, la disponibilidad de fenoles libres para mecanismos de defensa se ve reducida y la infección se propaga rápidamente. En las plantas -PPO, la disponibilidad de fenoles libres para mecanismos de defensa no está restringida por la actividad de PPO. Por consiguiente, hay mayores cantidades de fenoles libres disponibles para las respuestas de defensa y la infección se propaga de forma más lenta. Estas alteraciones del estado oxidativo de los compuestos fenólicos de las células vegetales que rodean al patógeno invasor podrían contribuir en la defensa, generando un ambiente hostil a *P. infestans*. En total correspondencia con este modelo, se ha reportado que algunos microorganismos son capaces de tolerar mejor diversos compuestos fenólicos antimicrobianos gracias a que poseen enzimas tirosinasas similares a PPO, con las cuales pueden detoxificar estos compuestos fenólicos (204, 205). Coherentemente, cepas de *Streptomyces* a las que se les han mutado los genes que codifican para estas enzimas PPO se vuelven hipersensibles a muchos compuestos fenólicos vegetales (204). Alternativa o paralelamente, la mayor disponibilidad de compuestos fenólicos antioxidantes podría estar mitigando los daños causados por las especies reactivas del oxígeno ocasionadas por el estrés oxidativo derivado de la infección, permitiendo que otros mecanismos de defensa se desempeñen más eficientemente en las células vegetales transgénicas. En concordancia con los resultados obtenidos por microscopía, las plantas -PPO presentan niveles basales de ácido clorogénico que duplican a los de los controles WT. Este metabolito podría estar actuando como una fitoanticipina (206), como ha sido previamente demostrado en estudios realizados con plantas transgénicas de tomate (54) y tabaco (50, 51). También, los mayores niveles de xilosa

presentes en las plantas transgénicas son coherentes con un aumento en los niveles de compuestos fenilpropanoides. Esta correlación positiva entre los niveles de xilosa y el contenido de compuestos fenólicos fue previamente reportada en un estudio realizado con distintas especies de gramíneas (207). De todas formas, no es posible descartar otros factores que estén contribuyendo en los mecanismos de defensa, ya que por ejemplo se ha demostrado que la trehalosa, un metabolito que se encuentra aumentado más del dos veces en las líneas -PPO, mejora la resistencia al patógeno *Blumeria graminis f.sp. tritici* en trigo (208). La alteración de los demás metabolitos no es aún clara y experimentos de análisis metabólico por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) se encuentran actualmente en desarrollo para intentar comprender mejor las alteraciones en las distintas redes metabólicas.

En contraste con los resultados de este trabajo, dos estudios realizados con plantas transgénicas de tomate asociaron la reducción de la actividad de PPO con una mayor susceptibilidad a *Pseudomonas syringae* y el aumento de la actividad de PPO con una mayor resistencia a esta misma bacteria (33, 34). Sin bien los resultados presentados en estos trabajos son convincentes, los autores no consiguieron encontrar pruebas fehacientes que permitieran explicar estos resultados ni exploraron el estado de otros mecanismos de defensa en estas plantas (33, 34). Más aún, no es sencillo hacer comparaciones directas ya que las especies de plantas y patógenos utilizadas fueron diferentes en uno y otro estudio. Bien podría ser el caso que *P. syringae* tenga mecanismos de infección y tolerancia totalmente diferentes a los de *P. infestans*. Asimismo, los resultados obtenidos en este trabajo difieren de los reportados por Rommens *et al.* (209), donde no se encontraron diferencias evidentes en la progresión del tizón tardío entre una línea de papa, de la variedad Ranger Russet, silenciada para PPO y tubérculos controles WT. Estas discrepancias pueden ser atribuibles a diferencias experimentales, tales como la variedades de papa, el tamaño del inóculo, la determinación de la progresión de la enfermedad y la patogenicidad de las cepas de *P. infestans* utilizadas. Además, a sabiendas de que el efecto de la actividad de PPO sobre el crecimiento de *P. infestans* no es total, podría explicarse por qué éste no fue observado por estos autores.

Evolución y propuesta de un posible rol biológico

En respuesta al ataque de patógenos o depredadores, las plantas activan un complejo conjunto de acontecimientos bioquímicos y celulares. Sin embargo, el que una planta sea resistente o no al ataque de un agresor depende de su capacidad para administrar una gran cantidad de mecanismos que han sido moldeados a lo largo de la evolución. Dado que el aumento de los compuestos fenólicos se considera una adaptación celular al estrés y un mecanismo de defensa contra patógenos, los resultados obtenidos con *P. infestans* sugieren que las defensas antimicrobianas mediadas por compuestos fenilpropanoides son menos competentes en presencia de PPO. Teniendo en cuenta que los procesos metabólicos pueden superponerse (107), podemos interpretar esto como un ejemplo de *interferencia metabólica*, consecuencia de la adquisición y el apilamiento evolutivo de diferentes, aunque interconectados, mecanismos que son capaces de interactuar bajo determinadas

circunstancias. Concretamente, en el modelo propuesto, PPO interfiere con los mecanismos de respuesta a estrés, reduciendo el recurso de fenoles libres disponibles para respuestas defensivas. Sugestivamente, los resultados hasta ahora incongruentes obtenidos en un curioso estudio, donde plantas de tomate silenciadas para los genes de PPO mostraron ser más tolerantes al estrés hídrico (38), pueden ser también explicados con este modelo: Al no estar presente PPO, existiría una mayor disponibilidad de compuestos fenólicos antioxidantes para contrarrestar los efectos nocivos del estrés oxidativo ocasionado por la sequía. Precisamente esta observación, que las plantas transgénicas mostraban signos de un menor estrés oxidativo, fue reportada por los autores de este trabajo (38). En línea con el modelo propuesto, otros estudios han reportado que la aclimatación al estrés térmico ocasiona una reducción de la actividad de PPO y un aumento de los compuestos fenólicos antioxidantes en tomate y melón (*Citrullus lanatus*) (210). Estas mismas observaciones fueron reportadas para árboles de olivo (*Olea europaea*) sometidos a condiciones de estrés hídrico y salino (35-37).

Si tomamos el primer supuesto de que las enzimas PPO no son importantes en el metabolismo vegetal (establecido durante la caracterización de las plantas -PPO y por (14, 32, 92, 189)), le sumamos el segundo supuesto de que bajo ciertas condiciones de estrés estas enzimas disminuyen la aptitud biológica de las plantas (establecido por los experimentos con *P. infestans* y por (38)), y contrastamos ambos con la amplia distribución y conservación evolutiva de PPO (establecidas por los estudios de filogenia de este trabajo), podemos encontrar fuertes evidencias que van en contra de hipotetizar que estas enzimas forman parte del grupo de caracteres no-adaptativos. En otras palabras, independientemente de si las enzimas PPO aparecieron como fruto de una adaptación o de una exaptación, las evidencias indican que si no fueran evolutivamente mantenidas mediante fuerzas de presión de selección, estas enzimas hubieran tendido a perderse a lo largo de la historia evolutiva a causa de la conjunción de no ser metabólicamente relevantes y de presentar desventajas para la aptitud biológica. Por lo tanto, deben existir presiones positivas de selección importantes que justifiquen la amplia distribución y conservación de estas enzimas en el reino vegetal.

Considerando las evidencias recopiladas por este y otros trabajos (5, 26, 30-32, 41, 202, 203), que demuestran que la actividad de PPO disminuye el aporte de nutrientes, la palatabilidad y la atractividad de los tejidos vegetales, podemos proponer que las presiones positivas que mantienen evolutivamente a las enzimas PPO en plantas consisten en eventos de depredación. A su vez, la lógica implica que, si esta suposición fuera cierta, entonces PPO actuaría como un mecanismo que promueve la preservación de tejidos en organismos pluricelulares y que carecería de sentido en organismos unicelulares o que no forman tejidos y que una vez depredados finaliza su historia. En total acuerdo con esta predicción, la búsqueda en los genomas secuenciados de los ancestros directos de las plantas terrestres, las algas verdes *Chlamydomonas reinhardtii* (211) y *Volvox carterii* (212), no permitió identificar genes ortólogos de PPO.

Conclusiones

A lo largo de esta tesis se abordaron tanto aspectos biológicos como prácticos del estudio de las polifenol oxidasas (PPO) vegetales. Durante la caracterización de plantas transgénicas de papa silenciadas para la familia de genes de *PPO*, se logró establecer la seguridad de este cultivo mejorado, instaurando un debate sobre la relevancia de los conceptos actualmente utilizados para la evaluación de la seguridad de cultivos transgénicos. De forma inédita, mediante la implementación de modelos animales y paradigmas neurobiológicos también se demostró que las enzimas PPO son capaces de modificar la composición de los compuestos volátiles en plantas, alterando el aroma de los tejidos vegetales. A su vez, se demostró que la alteración de la actividad de PPO no tiene grandes implicancias en el metabolismo de las plantas, pero sí en la modulación de las interacciones ecológicas entre plantas, microorganismos y organismos fitófagos.

A nivel práctico, se desarrolló una metodología extremadamente precisa y sensible para estudiar la enfermedad más devastadora del cultivo de papa, el tizón tardío, que permitió identificar que las plantas -PPO son más resistentes a este patógeno mediante mecanismos que parecen involucrar la participación de compuestos fenólicos. A raíz de estos hallazgos, se formuló un nuevo mecanismo de acción que permite explicar tanto los resultados de este trabajo como otros intrigantes resultados previamente descritos que hasta ahora no eran bien comprendidos. Seguramente esta contribución será de utilidad para el futuro desarrollo de nuevos cultivos más resistentes al estrés biótico y abiótico.

Aunque es mucho lo que aún permanece oscuro, de la síntesis de los experimentos realizados durante el transcurso de este estudio, podemos especular que, para los organismos sésiles como las plantas, una estrategia aceptable para contrarrestar el ataque de depredadores es volverse menos nutritivas, menos palatables y menos atractivas al momento de ser atacadas, reduciendo así la motivación y la aptitud biológica del depredador y, como consecuencia, minimizando el daño de los tejidos vegetales. En este sentido, PPO, en combinación con los metabolitos de la vía de fenilpropanoides, desempeñaría un papel en estos mecanismos. Mientras la planta no es depredada, tanto enzimas como sustratos se mantendrán aislados dentro de sus respectivos compartimentos intracelulares. Sin embargo, una vez ocurrido un daño en

los tejidos, PPO y sus sustratos fenólicos reaccionarán, dando lugar a nuevas moléculas altamente reactivas que a su vez reaccionarán con otros componentes celulares, polimerizando y precipitando en forma de complejos similares a la melanina. Estas reacciones sucesivas, tomarán los tejidos menos nutritivos y palatables al entrecruzarse íntimamente los nutrientes celulares en este polímero y, además, alterarán la composición de los compuestos volátiles, tomando menos atractivo el aroma (y tal vez también el aspecto) de los tejidos (Figura 24).

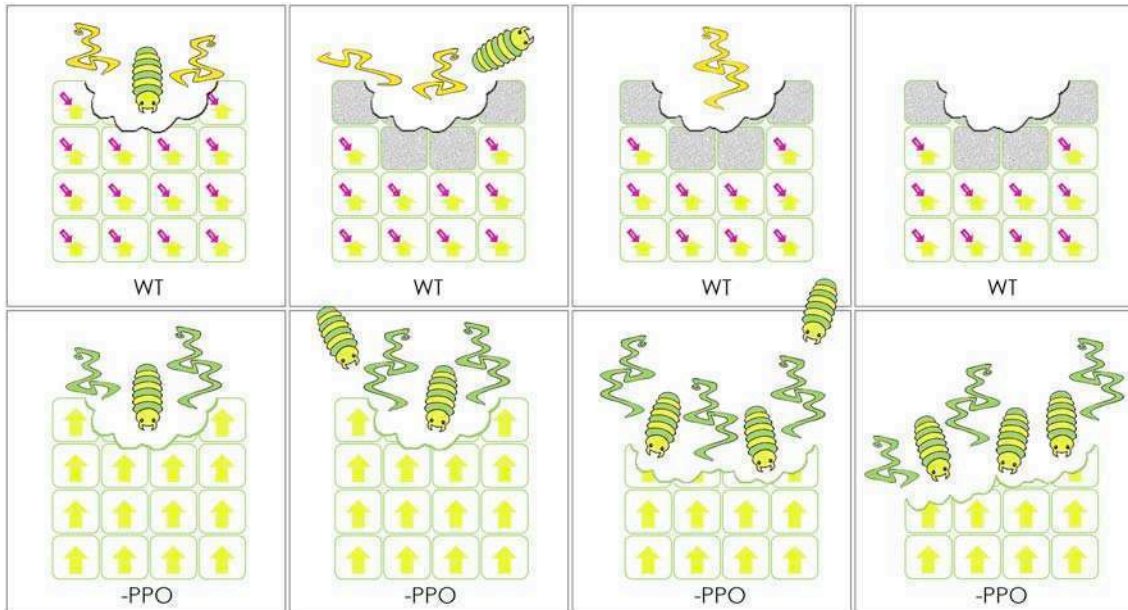


Figura 24. Modelo propuesto del rol biológico de PPO como un sistema de defensa de amplio espectro contra la depredación en plantas. Al ser los tejidos vegetales de una planta silvestre (WT, de sus siglas en inglés Wild Type) dañados por un fitófago, PPO y sus sustratos fenólicos son liberados de sus respectivos compartimentos intracelulares y reaccionan dando lugar a nuevas moléculas altamente reactivas que a su vez reaccionarán en forma secundaria con otros componentes celulares, polimerizando y precipitando en forma de complejos de color oscuro similares a la melanina. Como consecuencia de estas reacciones, los tejidos se tomarán menos nutritivos y menos palatables al entrecruzarse íntimamente los nutrientes celulares en este polímero. En paralelo, las reacciones desencadenadas por PPO también alterarán la composición de los compuestos volátiles, tomando el aroma de los tejidos vegetales menos atractivo para los depredadores. En conjunto, esta serie de eventos reducirá la motivación y la aptitud biológica del depredador, minimizando en consecuencia el daño de los tejidos vegetales. Las plantas sin PPO (-PPO), al carecer de este sistema de defensa, serán depredadas en una mayor proporción que las plantas WT y, eventualmente, acabarán extinguiéndose. Las células de los tejidos vegetales se encuentran representadas como cuadrados verdes, PPO en forma de flechas fucsias y los compuestos fenólicos como flechas amarillas. Los gusanos de color verde representan un animal depredador de plantas. Los dibujos zigzagantes naranjas y verdes que emanan de los tejidos representan los compuestos aromáticos liberados a raíz del daño mecánico originado por los agresores en los tejidos WT y -PPO respectivamente.

Un escenario hipotético para la evolución de las proteínas de unión a cobre de tipo 3 como PPO es que hace unos 3.500 millones de años, cuando surgió la fotosíntesis y la atmósfera de la Tierra cambió sus condiciones anaeróbicas a aeróbicas, estas proteínas ayudaron a mantener las concentraciones tóxicas de oxígeno intracelular bajas (7, 9). A medida que los organismos fueron evolucionando y el árbol de la vida fue ramificándose, estas proteínas fueron sometidas a diferentes presiones evolutivas que dieron lugar a proteínas muy diversas (7, 9-13). En la rama verde de la vida, PPO se

heredó como un rasgo ancestral de las plantas terrestres, posiblemente a causa de un evento de transferencia horizontal desde bacterias, y fue reciclado y conservado a través de la evolución de las plantas como un mecanismo de protección contra la depredación. Más tarde, PPO se perdió en algunas especies como *Arabidopsis thaliana* (14), probablemente, como resultado de la aparición de otros mecanismos de protección más eficientes o por el cambio de las presiones de selección.

Firmas

Dr. Fernando Bravo-Almonacid

Dra. Mirtha Flawiá

Lic. Brardo Lorente

Bibliografía

1. C. Darwin, *London, UK: John Murray*, (1859).
2. R. Goodacre, *et al.*, *Trends Biotechnol* **22**, 245 (2004).
3. D. B. Kell, *Trends Genet* **18**, 555 (Nov, 2002).
4. P. W. Thygesen, I. B. Dry, S. P. Robinson, *Plant Physiol* **109**, 525 (Oct, 1995).
5. E. Jobstl, J. O'Connell, J. P. Fairclough, M. P. Williamson, *Biomacromolecules* **5**, 942 (2004).
6. G. Bertrand, *Compt Rend Acad Sci Paris* **122**, 1215 (1896).
7. E. Jaenicke, H. Decker, *Chembiochem* **5**, 163 (2004).
8. H. Claus, H. Decker, *Syst Appl Microbiol* **29**, 3 (2006).
9. H. Decker, N. Terwilliger, *J Exp Biol* **203**, 1777 (2000).
10. T. Bumster, *J Comp Physiol B* **172**, 95 (2002).
11. T. Bumster, K. Scheller, *J Mol Evol* **42**, 713 (1996).
12. H. Decker *et al.*, *Gene* **398**, 183 (2007).
13. T. Klambunde, C. Eicken, J. C. Sacchetti, B. Krebs, *Nat Struct Biol* **5**, 1084 (1998).
14. L. Pourcel *et al.*, *Plant Cell* **17**, 2966 (2005).
15. H. Decker, T. Schweikardt, F. Tucek, *Angew Chem Int Ed Engl* **45**, 4546 (2006).
16. R. J. Deeth, C. Dieckh, *J Biol Inorg Chem* **15**, 117 (2010).
17. Y. Matoba, *et al.*, *J Biol Chem* **281**, 8981 (2006).
18. K. C. Vaughn, A. R. Lax, S. O. Duke, *Physiol Plant* **72**, 659 (1988).
19. K. C. Vaughn, S. O. Duke, *Physiol Plant* **60**, 106 (1984).
20. N. E. Tober, *Plant Physiol* **51**, 234 (1973).
21. A. Trebst, B. Depka, *Photosynth Res* **46**, 41 (1995).
22. A. M. Mayer, *Phytochemistry* **67**, 2318 (2006).
23. S. P. Kowalski, N. T. Fannetta, A. T. Hirzel, J. C. Steffens, *Plant Physiol* **100**, 677 (1992).
24. H. Yu, S. P. Kowalski, J. C. Steffens, *Plant Physiol* **100**, 1885 (1992).
25. Y. Han *et al.*, *J Chem Ecol* **35**, 176 (2009).
26. G. W. Felton, K. Donato, R. J. DelVecchio, S. S. Duffey, *J Chem Ecol* **15**, 2667 (1989).
27. T. Ruuhola, S. Yang, *Ann Bot* **97**, 29 (2006).
28. T. Ruuhola, S. Yang, V. Ossipov, E. Haukioja, *Oecologia* **154**, 725 (2008).
29. T. Schamtke, S. Thiesse, R. Dolch, W. Doland, *Biochem Syst Ecol* **29**, 1025 (2001).
30. A. Bhoneong, M. J. Stout, J. Attajarusit, P. Tantaawat, *J Chem Ecol* **35**, 28 (2009).
31. S. Mahanil, J. Attajarusit, M. J. Stout, P. Thipyapong, *Plant Sci* **174**, 456 (2008).
32. J. Wang, C. P. Constabel, *Planta* **220**, 87 (2004).
33. L. Li, J. C. Steffens, *Planta* **215**, 239 (2002).
34. P. Thipyapong, M. D. Hunt, J. C. Steffens, *Planta* **220**, 105 (2004).
35. C. Ben Ahmed, *et al.*, *J Agric Food Chem* **58**, 4216 (2010).
36. C. Ben Ahmed, *et al.*, *J Agric Food Chem* **57**, 11484 (2009).
37. A. Soffo, B. Dicho, C. Xilyannis, A. Masia, *Funct Plant Biol* **32**, 45 (2005).
38. P. Thipyapong, J. Melkonian, D. W. Wolfe, J. C. Steffens, *Plant Sci* **167**, 693 (2004).
39. C. W. B. Bachem *et al.*, *Biotechnology* **12**, 1101 (1994).
40. M. Friedman, *J Agric Food Chem* **44**, 631 (1996).
41. F. A. Tomás-Barberán, J. C. Espín, *J Sci Food Agric* **81**, 853 (2001).
42. G. Emiliai, M. Fondi, R. Fani, S. Grubaldo, *Biol Direct* **4**, 7 (2009).

43. M. Dicke, I. T. Baldwin, *Trends Plant Sci* **15**, 167 (2010).
44. J. L. Ferrer, M. B. Austin, C. Stewart, Jr., J. P. Noel, *Plant Physiol Biochem* **46**, 356 (2008).
45. R. A. Dixon, N. L. Paiva, *Plant Cell* **7**, 1085 (1995).
46. R. A. Dixon *et al.*, *Mol Plant Pathol* **3**, 371 (2002).
47. L. Tamagnone *et al.*, *Plant Cell* **10**, 135 (1998).
48. S. La Camera *et al.*, *Immunol Rev* **198**, 267 (2004).
49. R. Huckelhoven, *Annu Rev Phytopathol* **45**, 101 (2007).
50. G. L. Shadle *et al.*, *Phytochemistry* **64**, 153 (2003).
51. E. A. Maher *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 7802 (1994).
52. K. Yao, V. De Luca, N. Brisson, *Plant Cell* **7**, 1787 (1995).
53. V. A. Halim *et al.*, *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 1346 (2007).
54. R. Niggeweg, A. J. Michael, C. Martin, *Nat Biotechnol* **22**, 746 (2004).
55. J. L. Biel *et al.*, *J Agric Food Chem* **45**, 4500 (1997).
56. K. S. Johnson, G. W. Felton, *J Chem Ecol* **27**, 2579 (2001).
57. A. J. Her, D. C. Baucombe, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **69**, 363 (2004).
58. D. Baucombe, *Nature* **431**, 356 (2004).
59. A. Frizzi, S. Huang, *Plant Biotechnol J* **8**, 655 (2010).
60. E. J. Chapman, J. C. Carrington, *Nat Rev Genet* **8**, 884 (2007).
61. Q. Liu, Z. Paro, *Annu Rev Biochem* **79**, 295 (2010).
62. M. A. Matzke, M. Primig, J. Timovsky, A. J. Matzke, *EMBO J* **8**, 643 (1989).
63. C. Napoli, C. Lemieux, R. Jorgensen, *Plant Cell* **2**, 279 (1990).
64. A. R. van der Krol, L. A. Mur, M. Beld, J. N. Mol, A. R. Stuitje, *Plant Cell* **2**, 291 (1990).
65. N. Romano, G. Macino, *Mol Microbiol* **6**, 3343 (1992).
66. H. Ngo, C. Tschudi, K. Gull, E. Ullu, *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 14687 (1998).
67. J. R. Kennerdell, R. W. Carthew, *Cell* **95**, 1017 (1998).
68. A. Fire *et al.*, *Nature* **391**, 806 (1998).
69. A. Wargelius, S. Ellingsen, A. Fjose, *Biochem Biophys Res Commun* **263**, 156 (1999).
70. F. Wianny, M. Zemicka-Goetz, *Nat Cell Biol* **2**, 70 (2000).
71. S. M. Elbashir, W. Lendekel, T. Tuschl, *Genes Dev* **15**, 188 (2001).
72. M. Kusaba, *Curr Opin Biotechnol* **15**, 139 (2004).
73. I. Small, *Curr Opin Biotechnol* **18**, 148 (2007).
74. S. Mansoor, I. Amin, M. Hussain, Y. Zafar, R. W. Briddon, *Trends Plant Sci* **11**, 559 (2006).
75. A. Eamens, M. B. Wang, N. A. Smith, P. M. Wetherose, *Plant Physiol* **147**, 456 (2008).
76. D. Chowdhury, C. D. Novina, *Adv Immunol* **88**, 267 (2005).
77. H. Vaucheret, *Genes Dev* **20**, 759 (2006).
78. C. A. Hastorf, *Cambridge University Press*, (1993).
79. C. M. Rommens *et al.*, *Plant Biotechnol J* **6**, 870 (2008).
80. S. Chakraborty *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 17533 (2010).
81. E. Mullins, *et al.*, *Trends Plant Sci* **11**, 254 (2006).
82. B. J. Haas *et al.*, *Nature* **461**, 393 (2009).
83. G. Dancs, M. Kondrak, Z. Banfalvi, *BMC Plant Biol* **8**, 65 (2008).
84. S. Jobling, *Curr Opin Plant Biol* **7**, 210 (2004).
85. J. Gonzalez-Gutierrez, *et al.*, *Bioresour Technol* **101**, 2007 (2010).
86. C. A. Cardona, O. J. Sanchez, *Bioresour Technol* **98**, 2415 (2007).
87. A. Kraak, *Ind Crops Prod* **1**, 107 (1992).
88. J. R. Whitaker, C. Y. Lee, *American Chemical Society Symposium Series 600, in Enzymatic Browning and Its Prevention*. Washington, D. C.: American Chemical Society, 2 (1995).
89. D. G. Peroni, A. L. Boner, *Clin Exp Allergy* **25**, 680 (1995).
90. J. S. Weir *et al.*, *Theor Appl Genet* **115**, 245 (2007).
91. M. Steinfath *et al.*, *Plant Biotechnol J* **8**, 900 (2010).
92. C. Coetzer, D. Corsini, S. Love, J. Pavlek, N. Tumer, *J Agric Food Chem* **49**, 652 (2001).
93. M. Graham *et al.*, *Acta Hort* **529**, 133 (2000).
94. C. James, *Ithaca, NY: International Service for the Acquisition of Agric-biotech Applications*, (2009).
95. E. J. Kok, H. A. Kuiper, *Trends Biotechnol* **21**, 439 (2003).
96. A. R. Femie, R. N. Thethey, A. J. Krotzky, L. Willmitzer, *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 763 (2004).
97. H. A. Kuiper, E. J. Kok, K. H. Engel, *Curr Opin Biotechnol* **14**, 238 (2003).
98. EFSA, *Food Chem Toxicol* **46 Suppl 1**, S2 (2008).
99. F. Cellini *et al.*, *Food Chem Toxicol* **42**, 1089 (2004).
100. I. J. Colquhoun, *et al.*, *Trends Genet* **22**, 525 (2006).
101. J. M. Baker *et al.*, *Plant Biotechnol J* **4**, 381 (Jul, 2006).
102. G. S. Catchpole *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 14458 (2005).

103. S. B. Lehrer, G. A. Bannon, *Allergy* **60**, 559 (2005).
104. S. Park *et al.*, *Plant Biotechnol J* **7**, 106 (2009).
105. T. Dominguez *et al.*, *Plant Physiol* **153**, 655 (2010).
106. G. D. Graff, D. Zilberman, A. B. Bennett, *Nat Biotechnol* **27**, 702 (2009).
107. M. Iriti, F. Faoro, *Int J Mol Sci* **10**, 3371 (2009).
108. S. V. Wesley *et al.*, *Plant J* **27**, 581 (2001).
109. N. A. Smith *et al.*, *Nature* **407**, 319 (2000).
110. E. Romano *et al.*, *Physiol Mol Biol Plants* **7**, 133 (2001).
111. J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.*, (1989).
112. S. Sheerman, M. W. Bevan, *Plant Cell Rep* **7**, 13 (1988).
113. M. M. Hamdi, *et al.*, *Biotechnol Agron Soc Environ* **7**, 183 (2003).
114. T. Murašige, F. Skoog, *Physiol Plant* **15**, 473 (1962).
115. M. M. Bradford, *Anal Biochem* **72**, 248 (1976).
116. S. N. Niranjana-Raj, B. R. Sarosh, H. S. Shetty, *Func t Plant Biol* **33**, 563 (2006).
117. U. K. Laemmli, *Nature* **227**, 680 (1970).
118. L. Marqués, A. Fleuret, J. Cleyet-Mareil, J. J. Macheix, *Phytochemistry* **36**, 1117 (1994).
119. K. Edwards, C. Johnstone, C. Thompson, *Nucleic Acids Res* **19**, 1349 (1991).
120. M. G. Murray, W. F. Thompson, *Nucleic Acids Res* **8**, 4321 (1980).
121. E. M. Southern, *J Mol Biol* **98**, 503 (1975).
122. L. Esc hen-Lippold *et al.*, *Phytochemistry* **68**, 797 (2007).
123. H. S. Judelson, P. W. Tooley, *Phytopathology* **90**, 1112 (2000).
124. N. P. Gomes *et al.*, *Genes Dev* **20**, 601 (2006).
125. N. Nicot, J. F. Hausman, L. Hoffmann, D. Evers, *J Exp Bot* **56**, 2907 (2005).
126. R. E. Goodman *et al.*, *Nat Biotechnol* **26**, 73 (2008).
127. A. K. Singh, S. Praveen, B. P. Singh, A. Varma, N. Arora, *Transgenic Res* **18**, 877 (2009).
128. R. E. Goodman, *Mol Nutr Food Res* **50**, 655 (2006).
129. R. E. Goodman, J. Wise, *Linc hn: Food Allergy Research and Resource Programme, Food Science and Technology, University of Nebraska-Linc hn.*, 1 (2006).
130. A. R. Femie, A. Roscher, R. G. Ratcliffe, N. J. Kruger, *Planta* **212**, 250 (2001).
131. U. Roessner *et al.*, *Plant Cell* **13**, 11 (2001).
132. U. Roessner, C. Wagner, J. Kopka, R. N. Tiehewey, L. Willmitzer, *Plant J* **23**, 131 (2000).
133. J. Lise c, N. Schauer, J. Kopka, L. Willmitzer, A. R. Femie, *Nat Protoc* **1**, 387 (2006).
134. A. Luedemann, K. Strašburg, A. Eban, J. Kopka, *Bioinformatics* **24**, 732 (2008).
135. D. R. Juberg, *et al.*, *Regul Toxicol Pharmacol* **54**, 154 (2009).
136. C. A. Mathiesus *et al.*, *Regul Toxicol Pharmacol* **55**, 309 (2009).
137. H. C. Peters, H. Hu, O. Pongs, J. F. Stomm, D. Isbrandt, *Nat Neurosci* **8**, 51 (2005).
138. K. Kobayakawa *et al.*, *Nature* **450**, 503 (2007).
139. D. R. Smith, D. R. Buruss, A. W. Johnson, *Behav Brain Res* **201**, 22 (2009).
140. N. Mandairon *et al.*, *J Neurosci Methods* **180**, 296 (2009).
141. N. Mandairon, J. Poncelet, M. Bensa fi, A. Didier, *PLoS One* **4**, e4209 (2009).
142. A. Veyrac, V. Nguyen, M. Marien, A. Didier, F. Jourdan, *Leam Mem* **14**, 847 (2007).
143. R. Davidovich-Rikana ti *et al.*, *Nat Biotechnol* **25**, 899 (2007).
144. X. Niu *et al.*, *BMC Plant Biol* **8**, 100 (2008).
145. B. A. Underwood *et al.*, *Plant Physiol* **138**, 255 (2005).
146. A. B. Andreu, *et al.*, *Pest Manag Sci* **62**, 162 (2006).
147. A. Si-Ammour, B. Mauch-Mani, F. Mauch, *Mol Plant Pathol* **4**, 237 (2003).
148. C. E. Caten, J. L. Jinks, *Can J Bot* **46**, 329 (1968).
149. H. S. Judelson, F. A. Blanco, *Nat Rev Microbiol* **3**, 47 (2005).
150. V. L. Singleton, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventos, *Methods Enzymol* **299**, 152 (1999).
151. J. J. Campanella, L. Bitinka, J. Smalley, *BMC Bioinformatics* **4**, 29 (2003).
152. K. Tamura, J. Dudley, M. Nei, S. Kumar, *Mol Biol Evol* **24**, 1596 (2007).
153. M. A. Larkin *et al.*, *Bioinformatics* **23**, 2947 (2007).
154. J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson, *Nucleic Acids Res* **22**, 4673 (1994).
155. N. Saitou, M. Nei, *Mol Biol Evol* **4**, 406 (1987).
156. H. A. Schmidt, K. Stimmer, M. Vingron, A. von Haesele, *Bioinformatics* **18**, 502 (2002).
157. J. C. Senare *et al.*, *PLoS One* **5**, e10716 (2010).
158. E. B. Roessler, R. M. Panbom, J. L. Sidel, H. Stone, *J Food Sci* **43**, 940 (1978).
159. W. Petersen, P. Umbeck, K. Hokanson, M. Halsey, *Environ Biosafety Res* **4**, 89 (2005).
160. Q. Zhuo, J. H. Piao, Y. Tan, J. Xu, X. G. Yang, *Biomed Environ Sci* **22**, 22 (2009).
161. Y. Lu *et al.*, *J Food Sci* **72**, M228 (2007).
162. M. Osusky *et al.*, *Nat Biotechnol* **18**, 1162 (2000).

163. R. C. Aalberse, *J Allergy Clin Immunol* **106**, 228 (2000).
164. Codex Alimentarius Commission, *Rome*, 47 (2003).
165. W. R. Pearson, T. Wood, Z. Zhang, W. Miller, *Genomics* **46**, 24 (1997).
166. A. O. Koob, J. Cirillo, C. F. Babb, *J Neurosci Methods* **157**, 330 (2006).
167. I. T. Baldwin, *Curr Biol* **20**, R392 (2010).
168. N. Dudareva, E. Pichersky, *Curr Opin Biotechnol* **19**, 181 (2008).
169. E. Pichersky, N. Dudareva, *Trends Biotechnol* **25**, 105 (2007).
170. M. Dicke, J. J. van Loon, R. Soler, *Nat Chem Biol* **5**, 317 (2009).
171. J. Song *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 9128 (2003).
172. A. J. Havorkort *et al.*, *Potato Res* **51**, 47 (2008).
173. A. E. Domance, D. A. Inglis, *Plant Dis* **81**, 1206 (1997).
174. M. H. Jyan, L. C. Huang, P. J. Ann, R. F. Liu, *Plant Pathol Bull* **11**, 45 (2002).
175. M. Nicolaisen *et al.*, *J Microbiol Methods* **76**, 234 (2009).
176. C. L. Thout, J. B. Ristano, M. Madritch, T. Wangsomboondee, *Plant Dis* **89**, 1042 (1997).
177. P. W. Tooley, C. D. Theisen, *Exp Mycol* **11**, 19 (1987).
178. A. M. Ah-Fong, C. A. Bommann-Chung, H. S. Judelson, *Fungal Genet Biol* **45**, 1197 (2008).
179. G. J. Hannon, *Nature* **418**, 244 (2002).
180. G. Meister, T. Thusch, *Nature* **431**, 343 (2004).
181. M. Bennett *et al.*, *Plant J* **9**, 851 (1996).
182. P. Thipyapong, M. Hunt, J. C. Steffens, *Phytochemistry* **40**, 673 (1995).
183. A. M. Mayer, E. Harel, *Phytochemistry* **18**, 193 (1979).
184. M. Haruta, J. A. Pedersen, C. P. Constabel, *Physiol Plant* **112**, 552 (2001).
185. P. Stevens, J. D. van Elsas, *Antonie Van Leeuwenhoek* **98**, 359 (2010).
186. M. V. Martinez, J. R. Whitaker, *Trends Food Sci Technol* **6**, 195 (1995).
187. B. J. Haas, M. C. Zody, *Nat Biotechnol* **28**, 421 (2010).
188. Z. Wang, M. Gerstein, M. Snyder, *Nat Rev Genet* **10**, 57 (2009).
189. P. Thipyapong, M. J. Stout, J. Attajarusit, *Molecules* **12**, 1569 (2007).
190. M. Friedman, *J Agric Food Chem* **45**, 1523 (1997).
191. C. Pignocchi, C. H. Foyer, *Curr Opin Plant Biol* **6**, 379 (2003).
192. D. L. Corsini, J. J. Pavek, B. Dean, *Am J Potato Res* **69**, 423 (1992).
193. I. Potrykus, *Nature* **466**, 561 (2010).
194. D. M. Small, M. G. Veldhuizen, J. Felsted, Y. E. Mak, F. McGlone, *Neuron* **57**, 786 (2008).
195. R. C. Smallegange, *et al.*, *J Chem Ecol* **35**, 933 (2009).
196. S. A. Goff, H. J. Klee, *Science* **311**, 815 (2006).
197. W. Schwab, R. Davidovich-Rikana, E. Lewinsohn, *Plant J* **54**, 712 (2008).
198. L. Amiri, T. Dark, K. M. Nocer, C. L. Kirstein, *Dev Psychobiol* **33**, 157 (1998).
199. A. Arab *et al.*, *J Chem Ecol* **33**, 1845 (2007).
200. H. Panhuber, *Physiol Behav* **28**, 149 (1982).
201. J. L. Bi, J. B. Murphy, G. W. Felton, *J Chem Ecol* **23**, 97 (1997).
202. S. Duffey, G. Felton, *American Chemical Society, Washington, DC.*, 166 (1991).
203. T. Oza, T. H. Lileya, E. Haslam, *Phytochemistry* **26**, 2937 (1987).
204. H. Y. Yang, C. W. Chen, *PLoS One* **4**, e7462 (2009).
205. H. Lyr, *Nature* **195**, 289 (1962).
206. H. D. VanElten, J. W. Mansfield, J. A. Bailey, E. E. Farmer, *Plant Cell* **6**, 1191 (1994).
207. E. A. Buritta, A. S. Bittner, J. C. Streeter, M. J. Anderson, *J Dairy Sci* **67**, 1209 (1984).
208. P. Reignault *et al.*, *New Phytol* **149**, 519 (2001).
209. C. M. Rommens, J. Ye, C. Richard, K. Swords, *J Agric Food Chem* **54**, 9882 (2006).
210. R. M. Rivero *et al.*, *Plant Sci* **160**, 315 (2001).
211. S. S. Merchant *et al.*, *Science* **318**, 245 (2007).
212. S. E. Prochnik *et al.*, *Science* **329**, 223 (2010).