



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Metabolismo de esteroides esterificados en plantas: implicación en el desarrollo y la respuesta a estrés

Alma Delia Burciaga Monge

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

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

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



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

**METABOLISMO DE ESTEROLES ESTERIFICADOS EN  
PLANTAS: IMPLICACIÓN EN EL DESARROLLO Y LA  
RESPUESTA A ESTRÉS.**

ALMA DELIA BURCIAGA MONGE

2019



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMACIA I CIÈNCIES DE LA ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORADO: BIOTECNOLOGIA

**METABOLISMO DE ESTEROLES ESTERIFICADOS EN PLANTAS:  
IMPLICACIÓN EN EL DESARROLLO Y LA RESPUESTA A ESTRÉS.**

Memoria presentada por Alma Delia Burciaga Monge para optar al título de doctor por  
la Universidad de Barcelona

Dr. Teresa Altabella Artigas

Director

Dr. Albert Ferrer Prats

Director

Alma Delia Burciaga Monge

Doctorando

ALMA DELIA BURCIAGA MONGE

2019



*A Ernesto Ávila Alcalá*



## AGRADECIMIENTOS

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México me otorgó los recursos en los plazos establecidos para realizar un doctorado en el extranjero. Los recursos para el desarrollo de la tesis doctoral fueron obtenidos de los proyectos otorgados (AGL2013-43522-R y AGL2017-88842-R) al grupo de investigación por el Ministerio de Economía y Competitividad en España.

Sin importar el orden de mención, todos fueron y serán importantes en mi vida personal y profesional. Gracias a mis amigos Kike, Diana M., Blanca, Cristina, Pamela, Rocío, Janette, Yazmín, Mary, Luis, Ulises, Sara, Diana J., Alberto, Anahí, Layla, Ana, Diego, que en la distancia me apoyaron, escucharon y aconsejaron. Gracias Lalo, porque me escuchaste con paciencia y sin prejuicios, y cerrabas la conversación con la mejor analogía o la más graciosa frase motivacional.

Gracias a mis padres, Delia y Alberto por constantemente animarme a conseguir mis metas, por enseñarme que vale más un gesto que mil palabras y que logra más siendo honesto, dedicado y disciplinado. A mis abuelos, mis tíos, primos, a mis padres y hermanos. A todos gracias por su apoyo incondicional. Gracias por enviarme de vuelta a Barcelona llena de abrazos y buenos deseos. Gracias abuela, por cada bolsa de ingredientes mexicanos que me dabas en las vacaciones.

Gracias Sonia y Judith por recibirme estos últimos meses en su hogar tan cálidamente, compartir piso con ustedes ha hecho más llevadera la escritura de la tesis.

A los compañeros de laboratorio y nuevos amigos Laura, Nidia, Ángel, Liliana, Victoria, Joan, María, Marta, Naroa, Elena, Elisabetta, Daniel. Mi sincero agradecimiento por compartir su conocimiento, por enseñarme nuevas técnicas, por ayudarme a procesar mis muestras (para no irme demasiado tarde a casa) y por permitirme formar parte del equipo de laboratorio. Por reírse de mí y conmigo, por las cervezas, café y cenas que compartimos. Por su paciencia y disposición, gracias a las personas que estuvieron bajo mi tutela por periodos cortos o por casi un año. Especialmente aprecio la ayuda de Joan Manel que siempre estuvo dispuesto a aprender y a echar una mano en diferentes experimentos.

A mis directores de tesis Albert Ferrer y Teresa Altabella, a Montserrat Arró y Albert Boronat, les doy las gracias por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación. Aprecio mucho que reconocieran mi trabajo, que señalaran cuando algo había hecho bien y también cuando estaba equivocada. No siempre me tome bien los fracasos y no festeje apropiadamente mis logros. Ahora concluida la tesis me siento satisfecha y completamente agradecida. La trayectoria fue difícil, el camino fue intenso. Hubo momentos de soledad y frustración, pero fueron muchos más los momentos con sensación de satisfacción, ilusión, tranquilidad y alegría. La vida da muchas vueltas, te puede dar un revés pero también nuevas oportunidades. Llegue siendo una Química con especialidad clínica que pensaba su futuro profesional en un hospital. Ahora, soy una Química que tuvo la oportunidad de aprender de metabolismo en plantas en uno de los mejores institutos de investigación y fascinarse con todo lo que hay por hacer y comprender.



## RESUMEN

Los esteroides son una familia de compuestos triterpénicos que se presentan en forma libre o conjugada, como ésteres, glicósidos y acilglicósidos de esteroides. Cada especie vegetal tiene su propio perfil cualitativo y cuantitativo de esteroides libres y conjugados, aunque en las distintas fracciones el  $\beta$ -sitosterol, el estigmasterol y el campesterol son los esteroides más abundantes. Los esteroides libres y sus derivados glicosilados se localizan en las membranas celulares, principalmente en la membrana plasmática, donde actúan como componentes estructurales que contribuyen a mantener la fluidez y la permeabilidad de las mismas. Por otra parte, los esteroides esterificados se acumulan en cuerpos lipídicos citoplasmáticos, constituyendo una reserva de esteroides que se almacena o se moviliza en función de las necesidades celulares (exceso o defecto) de esteroides libres y glicosilados en las membranas celulares.

La esterificación de los esteroides está mediada por las esteroil aciltransferasas, enzimas que desempeñan un papel muy relevante en el mantenimiento de la homeostasis de los esteroides en las membranas celulares. Hay evidencias que indican que los niveles de los esteroides esterificados experimentan cambios importantes durante la senescencia de los tejidos vegetales y cuando las plantas se enfrentan a situaciones de estrés. Sin embargo, el conocimiento acerca de las esteroil aciltransferasas de plantas es todavía limitado. Hasta hace muy poco tiempo sólo se habían clonado y caracterizado dos esteroil aciltransferasas de *Arabidopsis*: una fosfolípido:esteroil aciltransferasa (PSAT1) y una acil CoA:esteroil aciltransferasa (ASAT1). Recientemente, en una tesis doctoral previa de nuestro grupo de investigación se identificaron y comenzaron a caracterizar las enzimas ASAT1 y PSAT1 de tomate (SIASAT1 y SIPSAT1). A partir de estos antecedentes, en este trabajo de Tesis Doctoral se ha seguido avanzando en el estudio de la función biológica de las esteroil aciltransferasas de plantas ASAT1 y PSAT1, empleando *Arabidopsis thaliana* y *Solanum lycopersicum* (cv Micro-Tom), prestando especial atención al estudio de su función y la de los esteroides esterificados en el crecimiento, desarrollo y la respuesta frente al estrés.

Los resultados obtenidos mediante complementación funcional de los mutantes *asat1-1* y *psat1-2* de *Arabidopsis* con las proteínas SIPSAT1 y SIASAT1 han confirmado la diferente capacidad de estas proteínas para esterificar esteroides mayoritarios finales e intermediarios, respectivamente. Además, en semillas y hojas de los mutantes de tomate con la enzima SIPSAT1 inactivada (CR-*psat1*) obtenidas mediante el sistema de edición génica CRISPR/Cas9, se observa una reducción muy marcada del contenido de esteroides esterificados que se correlaciona con un incremento en los niveles de esteroides libres y en el caso de las hojas, con una clara disminución del número de cuerpos lipídicos, en comparación con lo observado en plantas wild type. Sin embargo, estos cambios no se producen en las líneas de tomate que tienen inactivada la enzima

SIASAT1 (CR-*asat1*). Estos resultados apoyan la idea de que, tal y como se ha propuesto en *Arabidopsis*, la SIPSAT1 participa de forma más activa que la SIASAT1 en la síntesis de esteroides esterificados y en la homeostasis de esteroides libres. La pérdida de función de SIASAT1 produce un ligero retraso en el inicio de la germinación sin que se afecte la tasa final de la misma. Sin embargo, la inactivación de SIPSAT1 afecta a ambos parámetros e induce un fenómeno de germinación atípica, en el que se observa la aparición de los cotiledones previa a la de las radículas, con las consiguientes anomalías en el establecimiento de las plántulas. Las líneas CR-*psat1* presentan también un fenotipo de enanismo moderado y alteraciones en la morfología de las hojas.

Por otra parte, la reducción del contenido de esteroides esterificados en *Arabidopsis* se traduce en mayor sensibilidad a la infección con *Pseudomonas syringae*, ya que el mutante *psat1-2*, pero no el *asat1-1*, es más sensible a la bacteria que las plantas wild type. En tomate la pérdida de función de PSAT1 parece incrementar la sensibilidad a estrés salino, ya que el crecimiento de los mutantes CR-*psat1* en presencia de concentraciones elevadas de NaCl es menor que el de las plantas wild type, un efecto que no se observa en los mutantes CR-*asat1*.

En conjunto los resultados de este trabajo sugieren que los esteroides esterificados y SIPSAT1 desempeñan un papel importante tanto en el desarrollo y crecimiento de las plantas como en la respuesta a diferentes tipos de estrés, y establecen las bases para estudios posteriores dedicados a comprender el mecanismo de acción de los esteroides esterificados y las esteroil aciltransferasas en estos procesos fisiológicos.

## ABSTRACT

Sterols are a family of triterpenoid compounds that occur as free form or conjugated like steryl esters, steryl glycosides and acylated steryl glycosides. Each plant species has its own qualitative and quantitative profile of free and conjugated sterols, although the most abundant sterols in the different fractions are  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol and campesterol. Free sterols and their glycosylated derivatives are localized in cell membranes, mainly in the plasma membrane, where they act as key structural components involved in maintaining membrane fluidity and permeability. On the contrary, steryl esters accumulate in cytoplasmic lipid droplets, where they served as a reservoir of sterols that can be stored or mobilized depending on the cellular needs (excess or shortage) of free and glycosylated sterols in cell membranes.

The synthesis of steryl esters is catalyzed by sterol acyltransferases that are essential players in maintaining sterol homeostasis in cell membranes. There is ample evidence that steryl esters levels undergo significant changes during plant tissues senescence and when plants face different type of stress, in spite of which the current knowledge about sterol acyltransferases in plants is still limited. Until very recently, two *Arabidopsis* sterol acyltransferases were the only plant sterol acyltransferases cloned and characterized, phospholipid:sterol acyltransferase (PSAT1) and acyl-CoA:sterol acyltransferase (ASAT1). Recently, in a previous work carried out in our research group, the tomato enzymes ASAT1 and PSAT1 (SIASAT1 and SIPSAT1) were identified, cloned and preliminary characterized. Using this knowledge as background, in this PhD Thesis project, progress has been made in the study of the biological function of the plant sterol acyltransferases ASAT1 and PSAT1 using *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum* (cv Micro-Tom), paying special attention to the study of their function, and the role of steryl esters in plant growth, development and response to stress.

The results obtained by functional complementation of the *Arabidopsis* *asat1-1* and *psat1-2* mutants with SIPSAT1 and SIASAT1 have confirmed the different ability of these enzymes to esterify sterol end products and sterol precursors, respectively. Besides, in seeds and leaves of mutants with inactive SIPSAT1 (CR-*psat1*) generated using CRISPR/Cas9 genome editing system, there is a strong reduction in the content of steryl esters that correlates with a moderate increase in free sterol levels, while in leaves there is also a decrease of the number of lipid droplets compared to the one observed in wild type leaves. These changes did not occur in the tomato mutant lines with inactive SIASAT1 (CR-*asat1*). Altogether these results provide further support to the proposal that SIPSAT1 participates more actively than SIASAT1 in the biosynthesis of steryl esters and free sterol homeostasis. Loss of function of SIASAT1 causes a delay of seed germination but has no effect on the final germination percentage. However,

the inactivation of SIPSAT1 affects both parameters and induces an atypical germination phenomenon, where cotyledones emerge first than the radical leading to anomalies on seedling establishment. The CR-*psat1* lines show also a mild dwarf phenotype and alterations on leaf morphology.

Reduces levels of steryl esters in Arabidopsis lead to a higher sensitivity of plants to the infection of *Pseudomonas syringae*, since the *psat1-2* mutant, but not the *asat1-1* mutant, is more sensitive to this bacterial pathogen than the wild-type plants. In tomato, loss of function of SIPSAT1 increases the sensitivity to salt stress, because CR-*psat1* mutant plants are less tolerant to NaCl than wild type plants, an effect that was not observed in the case of CR-*asat1* mutants.

Altogether, the results obtained from this work suggest that steryl esters and SIPSAT1 play an important role both in plant growth and development and also in plant response to different type of stress. This work set the bases for further studies aimed at a better understanding of the mechanism of action of steryl esters and sterol acyltransferases in these physiological processes.

# CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABLAS .....	iii
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Esteroles: Características químicas, diversidad y función. ....	3
1.2. Biosíntesis de fitoesteroles.....	6
1.3. Esteroles conjugados en plantas.....	10
1.3.1. Esteroles glicosilados.....	11
1.3.2. Esteres de esteroides .....	13
1.3.2.1. Biosíntesis de esteroides de esteroides.....	16
1.3.3. Hidrolisis de esteroides conjugados .....	18
1.4. Esteroides y respuesta a estrés en plantas.....	19
1.5. El tomate como cultivo de interés agronómico y planta modelo en investigación .....	20
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
2.1. Objetivo general.....	23
2.2. Objetivos específicos .....	23
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
3.1 Caracterización funcional de enzimas involucradas en la biosíntesis de esteroides esterificados en tomate .....	27
3.1.1 Las acil-CoA:esterol aciltransferasas de tomate SIASAT1 y SIASAT8 no complementan el fenotipo del mutante de <i>Arabidopsis psat1-2</i> carente de actividad fosfolípido:esterol acil transferasa .....	27
3.1.1.1. Efecto de la expresión de las candidatas SIASAT2, SIASAT5 y SIASAT8 sobre el contenido de esteroides esterificados en semillas del mutante <i>asat1-1</i> .....	28
3.1.1.2. Obtención de líneas del mutante <i>psat1-2</i> que sobreexpresan SIASAT1 y SIASAT8 .....	31
3.1.1.3. Evaluación de la toxicidad de mevalonato en el mutante <i>psat1-2</i> que sobreexpresa SIASAT1 y SIASAT8.....	33
3.1.2 Obtención de secuencias codificantes de enzimas ASAT quiméricas.....	34
3.1.2.1 Diseño y obtención de las proteínas quiméricas ATA y TAT.....	34
<b>CAPITULO II .....</b>	<b>39</b>
3.2. Implicación de los esteroides conjugados en la respuesta a estrés biótico causado por infección con <i>Pseudomonas syringae</i> en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	39
3.2.1. Respuesta de los mutantes <i>asat1-1</i> y <i>psat1-2</i> de <i>A. thaliana</i> a la infección con <i>P. syringae</i> .....	39
3.2.2. Generación de líneas mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> con genes SGT y ASAT inactivados .....	41
3.2.2.1. Obtención de mutantes dobles y triples por polinización cruzada.....	41
3.2.2.2. Genotipado de las plantas obtenidas del cruce de mutantes <i>asat1-1</i> con <i>ugt80A2</i> , <i>ugt80B1</i> y <i>ugt80A2B1</i> .....	42
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>49</b>
3.3. Efecto de las alteraciones en el metabolismo de esteroides esterificados sobre el crecimiento, desarrollo y respuesta a estrés de plantas de tomate con pérdida de función de SIPSAT1 y SIASAT1 .....	49

3.3.1. Construcciones CRISPR/Cas y diseño de los RNA guía.....	49
3.3.2. Obtención de transformantes primarios.....	50
3.3.3. Detección y caracterización de las mutaciones inducidas por CRISPR/Cas9.....	52
3.3.3.1. Obtención de líneas mutantes CR- <i>asat1</i> homocigóticas.....	55
3.3.3.2. Obtención de líneas mutantes CR- <i>psat1</i> homocigóticas.....	57
3.3.4. Perfil de esteroides en los mutantes de tomate con pérdida de función SIPSAT1 y SIASAT1.....	61
3.3.4.1. Contenido de esteroides en semillas.....	61
3.3.4.2. Contenido de esteroides en hojas.....	64
3.3.5. Visualización y cuantificación de cuerpos lipídicos en hojas.....	67
3.3.6. Análisis de los niveles de mRNA SIASAT1 y SIPSAT1 en las líneas mutantes CR- <i>psat1</i> y CR- <i>asat1</i> .....	69
3.3.7. Fenotipo de los mutantes CR- <i>asat1</i> y CR- <i>psat1</i> y características de productividad.....	71
3.3.8. Ensayos de germinación.....	74
3.3.9. Viabilidad de las semillas.....	76
3.3.10. Evaluación de la respuesta a estrés salino de los mutantes CR- <i>asat1</i> y CR- <i>psat1</i> .....	78
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>81</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>99</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>103</b>
6.1. Material vegetal.....	105
6.1.1. Mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	105
6.1.2. Cultivo en tierra de tomate cv Micro-Tom.....	105
6.1.3. Cultivo <i>in vitro</i> de tomate cv Micro-Tom.....	106
6.1.4. Cultivo en tierra de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	106
6.1.5. Obtención de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	106
6.1.6. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	107
6.1.7. Obtención de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	107
6.1.7.1. Selección de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transgénicas.....	108
6.1.8. Obtención de dobles y triples mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> por polinización cruzada.....	110
6.1.9. Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i> para tratamiento con mevalonolactona.....	110
6.1.10. Infección de <i>Arabidopsis thaliana</i> con <i>Pseudomonas syringae</i> .....	111
6.1.10.1. Inoculación del patógeno en hojas de roseta por infiltración.....	111
6.1.10.2. Inoculación del patógeno en planta por inmersión.....	112
6.2. Material microbiológico.....	113
6.2.1. Células competentes.....	113
6.2.2. Medios de cultivo.....	113
6.3. Análisis de la expresión génica.....	114
6.3.1. Extracción de RNA de plantas.....	114
6.3.2. Extracción de RNA de semillas.....	114
6.3.3. Síntesis de cDNA.....	115
6.3.4. PCR semicuantitativa.....	115
6.3.5. PCR cuantitativa (qPCR).....	116
6.4. Técnicas de clonación.....	118
6.4.1. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR.....	118

6.4.2. Amplificación de fragmentos de DNA para clonación.....	119
6.4.3. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa .....	119
6.4.4. Clonación en el vector pGEM-T Easy.....	119
6.4.5. PCR solapante para la construcción de secuencias químéricas codificantes para proteínas ASAT. ....	120
6.4.6. Clonación empleando el sistema Gateway .....	122
6.4.7. Transformación de <i>E. coli</i> por shock térmico.....	124
6.4.8. Análisis de clones recombinantes por PCR de colonia .....	124
6.4.9. Miniprep para la extracción de DNA plasmídico.....	124
6.5. Expresión transitoria de proteínas en <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	125
6.5.1. Transformación de <i>A. tumefaciens</i> .....	125
6.5.2. Agroinfiltración de <i>N. benthamiana</i> .....	125
6.5.3. Análisis de la localización subcelular.....	126
6.6. Generación de plantas de tomate transgénicas con genes ASAT1 y PSAT1 inactivados .....	126
6.6.1. Diseño de gRNA y vectores CRISPR/Cas9 .....	126
6.6.2. Transformación de cotiledones de tomate.....	128
6.6.3. Aclimatación de plantas de tomate procedentes de cultivo <i>in vitro</i> .....	129
6.6.4. Extracción de DNA genómico de hojas de tomate .....	129
6.6.5. Detección de mutaciones inducidas por CRISPR/Cas9 .....	130
6.7. Análisis de embriones.....	131
6.8. Tinción de cuerpos lipídicos .....	131
6.9. Evaluación de la respuesta a estrés salino en plantas transgénicas de tomate .....	132
6.10. Análisis de esteroides.....	133
6.10.1. Extracción de esteroides de tejido vegetal .....	133
6.10.2. Cuantificación de esteroides por GC-MS .....	135
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>137</b>
<b>8. ANEXO .....</b>	<b>159</b>



## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUCCIÓN

Figura 1. Estructura química básica de un estero. ....	3
Figura 2. Estructura química de los principales fitosteroles. ....	4
Figura 3. Ruta simplificada de la biosíntesis de fitosteroles. ....	9
Figura 4. Biosíntesis de los esteroides conjugados a partir de los esteroides libres. ....	10
Figura 5. Modelo de biogénesis y expansión de LDs. ....	15
Figura 6. Desarrollo del fruto de tomate. ....	22

### CAPÍTULO I

Figura 7. Contenido de esteroides libres y esterificados en semillas de <i>Arabidopsis</i> wild type, del mutante <i>asat1-1</i> y de <i>asat1-1</i> que expresa <i>SIASAT1</i> , <i>SIASAT2</i> , <i>SIASAT5</i> y <i>SIASAT8</i> . ....	29
Figura 8. Niveles de mRNA de <i>SIASAT1</i> y <i>SIASAT8</i> en los transformantes primarios del mutante de <i>Arabidopsis psat1-2</i> . ....	31
Figura 9. Niveles de mRNA <i>SIASAT1</i> y <i>SIASAT8</i> en plantas mutantes de <i>Arabidopsis asat1-1</i> y <i>psat 1-2</i> retransformadas con los transgenes para expresar <i>SIASAT1</i> y <i>SIASAT8</i> . ....	32
Figura 10. Efecto del mevalonato sobre plántulas de diferentes líneas del mutante de <i>Arabidopsis psat1-2</i> retransformadas con los transgenes para expresar <i>SIPSAT1</i> , <i>SIASAT1</i> y <i>SIASAT8</i> . ....	34
Figura 11. Modelo de la topología de inserción a membrana de <i>SIASAT</i> y <i>AtASAT</i> . ....	35
Figura 12. Representación de las proteínas <i>SIASAT1</i> , <i>AtASAT1</i> y las quimeras <i>ATA</i> y <i>TAT</i> . ....	36
Figura 13. Modelo de la topología de inserción a membrana de las proteínas quiméricas <i>ATA</i> y <i>TAT</i> . ....	37
Figura 14. Análisis por microscopía laser confocal de células de <i>N. benthamiana</i> que expresan transitoriamente las fusiones proteicas <i>ATA-GFP</i> , <i>TAT-GFP</i> , <i>SIASAT1-YFP</i> , <i>AtASAT1-YFP</i> y <i>T3RE</i> . ....	38

### CAPÍTULO II

Figura 15. Ensayo de infección con <i>Pst</i> DC3000 en plantas de <i>A. thaliana</i> . ....	39
Figura 16. Ensayo de infección con <i>Pst</i> DC3000 en plantas de <i>A. thaliana</i> . ....	40
Figura 17. Representación esquemática de las inserciones de T-DNA en los alelos mutantes <i>ugt80A2</i> , <i>ugt80B1</i> y <i>asat1-1</i> . ....	42
Figura 18. Genotipado por PCR para identificar el alelo <i>ugt80A2</i> en las plantas procedentes de los cruces <i>ugt80A2xasat1-1</i> y <i>ugt80A2B1xasat1-1</i> . ....	43
Figura 19. Genotipado por PCR para identificar el alelo <i>ugt80B1</i> en las plantas procedentes de los cruces <i>ugt80B2xasat1-1</i> y <i>ugt80A2B1xasat1-1</i> . ....	44
Figura 20. Genotipado por PCR de plantas del mutante <i>ugt80A2xasat1-1</i> (línea 6-1-1). ....	46

### CAPÍTULO III

Figura 21. Representación esquemática del T-DNA de los vectores binarios CRISPR/Cas9 empleados para inactivar <i>SIASAT1</i> y <i>SIPSAT1</i> . ....	49
Figura 22. Secuencia y posición de los sgRNA empleados para inactivar los genes <i>SIASAT1</i> y <i>SIPSAT1</i> . ....	50

Figura 23. Identificación de plantas transgénicas T0 CR- <i>asat1</i> y CR- <i>psat1</i> .	51
Figura 24. Amplificación del fragmento que incluye la secuencia diana de la endonucleasa Cas9 en plantas transgénicas T0 CR- <i>asat1</i> y CR- <i>psat1</i> .	52
Figura 25. Mutaciones inducidas en la primera generación de plantas CR- <i>asat1</i> y CR- <i>psat1</i> .	54
Figura 26. Mutaciones inducidas por CRISPR/Cas9 en las líneas homocigotas CR- <i>asat1</i> .	55
Figura 27. Representación esquemática de la proteína SIASAT1 nativa y las proteínas SIASAT1 truncadas en las plantas CR- <i>asat1</i> 34-2 y CR- <i>asat1</i> 35-2/3/5.	57
Figura 28. Genotipado por RFLP de plantas transgénicas CR- <i>psat1</i> .	58
Figura 29. Mutaciones inducidas en las líneas homocigotas CR- <i>psat1</i> .	60
Figura 30. Representación esquemática de las proteínas SIPSAT1 nativa y SIPSAT1 truncadas en las plantas CR- <i>psat1</i> 28-3-2 y CR- <i>psat1</i> 31-19.	60
Figura 31. Contenido de esteroides mayoritarios libres y conjugados en semillas de tomate wild type, CR- <i>asat1</i> y CR- <i>psat1</i> .	63
Figura 32. Contenido total de esteroides en semillas de tomate wild type, CR- <i>asat1</i> y CR- <i>psat1</i> .	63
Figura 33. Contenido de cicloartenol esterificado en semillas de tomate wild type, CR- <i>asat1</i> y CR- <i>psat1</i> .	64
Figura 34. Contenido de esteroides mayoritarios libres y conjugados en hojas de tomate wild type, CR- <i>asat1</i> y CR- <i>psat1</i> .	66
Figura 35. Contenido total de esteroides en hojas de tomate wild type, CR- <i>asat1</i> y CR- <i>psat1</i> .	66
Figura 36. Contenido de cicloartenol esterificado en hojas de tomate wild type, CR- <i>asat1</i> y CR- <i>psat1</i> .	67
Figura 37. Cuerpos lipídicos en hojas de tomate wild type, CR- <i>asat1</i> y CR- <i>psat1</i> .	68
Figura 38. Niveles de mRNA SIASAT1 y SIPSAT1 en las plantas mutantes CR- <i>psat1</i> y CR- <i>asat1</i> , respectivamente.	70
Figura 39. Niveles de mRNA de los genes putativos SIASAT en las plantas mutantes CR- <i>asat1</i> y CR- <i>psat1</i> .	70
Figura 40. Parámetros evaluados en plantas transgénicas de tomate.	71
Figura 41. Características fenotípicas de las plantas CR- <i>asat1</i> y CR- <i>psat1</i> en fase vegetativa.	73
Figura 42. Evaluación del rendimiento de las plantas CR- <i>asat1</i> y CR- <i>psat1</i> .	74
Figura 43. Evaluación de la germinación de las semillas de las líneas CR- <i>asat1</i> y CR- <i>psat1</i> .	75
Figura 44. Efecto de la inactivación de SIASAT1 y SIPSAT1 en la germinación de las semillas.	76
Figura 45. Evaluación de la viabilidad de las semillas de las plantas CR- <i>asat1</i> y CR- <i>psat1</i> por tinción con sales de tetrazolio.	77
Figura 46. Efecto del estrés por NaCl en plántulas de tomate wild type, CR- <i>asat1</i> y CR- <i>psat1</i> cultivadas <i>in vitro</i> .	78
Figura 47. Efecto del estrés por NaCl en plantas de tomate wild type, CR- <i>asat1</i> y CR- <i>psat1</i> cultivadas en tierra.	80

## MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 48. Métodos de selección de plántulas transformantes de Arabidopsis.	109
Figura 49. PCR solapante.	121

## LISTA DE TABLAS

### CAPÍTULO I

Tabla 1. Perfil de esteroides esterificados y libres en extractos de semillas de Arabidopsis. ....	30
--	----

### CAPÍTULO II

Tabla 2. Relación de mutantes dobles y triples de Arabidopsis con los genes ASAT, PSAT y SGT inactivados.....	47
---	----

### CAPÍTULO III

Tabla 3. Plantas transgénicas obtenidas en la transformación de cotiledones de tomate.....	53
Tabla 4. Segregación de las mutaciones inducidas por CRISPR/Cas9 en el gen diana <i>SIASAT1</i> . ....	56
Tabla 5. Segregación de mutaciones inducidas por CRISPR/Cas9 en el gen diana <i>SIPSAT1</i> .....	58
Tabla 6. Cuantificación (%) de las frecuencias de aparición de InDels en la región diana de las plantas descendientes de la planta 28-3 empleando la herramienta TIDE .....	59
Tabla 7. Contenido de esteroides mayoritarios libres y conjugados en semillas de los mutantes <i>CR-asat1</i> y <i>CR-psat1</i> de tomate.....	62
Tabla 8. Contenido de esteroides mayoritarios libres y conjugados en hoja de los mutantes <i>CR-asat1</i> y <i>CR-psat1</i> de tomate. ....	65
Tabla 9. Parámetros morfométricos de plantas wild type, y mutantes <i>CR-asat1</i> y <i>CRpsat1</i> . ....	72

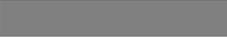
### MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 10. Antibióticos y suplementos utilizados en la preparación de medios para cultivos bacterianos.....	113
Tabla 11. Primers para PCR semicuantitativa. ....	115
Tabla 12. Primers para qPCR en muestras de tomate y Arabidopsis. ....	117
Tabla 13. Primers utilizados para genotipar mutantes por inserción de T-DNA de Arabidopsis. ....	118
Tabla 14. Primers para la generación de las quimeras ATA y TAT.....	122
Tabla 15. Primers para comprobación de secuencias codificantes de las quimeras de ASAT. ....	123
Tabla 16. Primers para la generación de sgRNAs. ....	127
Tabla 17. Primers para la comprobación de construcciones CRISPR/Cas9. ....	128
Tabla 18. Primers para genotipado de plantas de tomate transgénicas generadas por CRISPR/Cas9. ....	130

### ANEXO

Tabla S1. Perfil de esteroides en extractos de semillas de tomate. ....	163
Tabla S2. Perfil de esteroides en extractos de hojas de plantas de tomate. ....	165



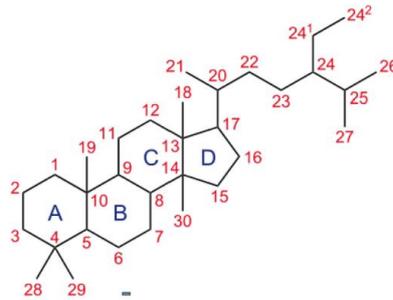


# 1.INTRODUCCIÓN



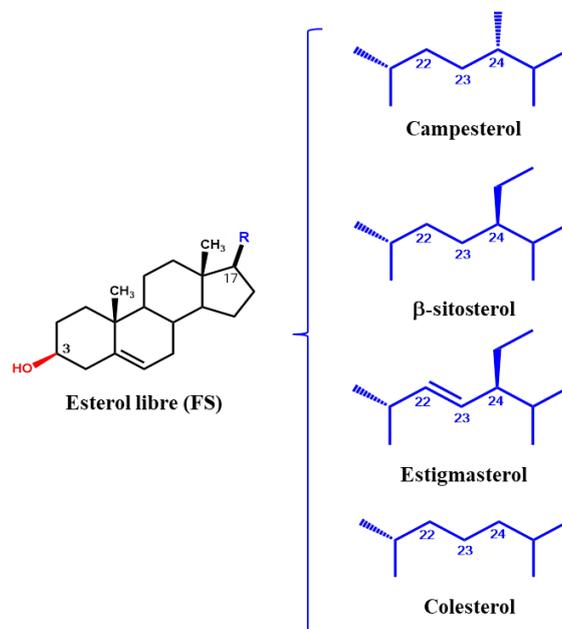
### 1.1. Esteroles: Características químicas, diversidad y función.

Los esteroides son compuestos anfipáticos de naturaleza isoprenoide que se encuentran presentes en todos los organismos eucariotas, cuya estructura química común se basa en el ciclopentanoperhidrofenantreno, un núcleo rígido formado por cuatro anillos, con un grupo hidroxilo en la posición C3 y una cadena lateral alifática de longitud variable (8-10 carbonos) unida al carbono 17 (Figura 1).



**Figura 1. Estructura química básica de un esteroide.** Carbonos numerados de acuerdo a la nomenclatura IUPAC 1989 (Moreau et al., 2018).

A diferencia de los animales y los hongos, que acumulan colesterol y ergosterol, respectivamente, las plantas presentan una mezcla compleja de esteroides, denominados genéricamente fitosteroides, cuyas principales diferencias residen en el grado de sustitución e insaturación de la cadena lateral y en la presencia de dobles enlaces en los anillos. Teniendo en cuenta estas diferencias y su estereoquímica, actualmente se han descrito más de 250 esteroides diferentes en vegetales (Nes, 2011). De los cuales los más abundantes son  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol y campesterol (Figura 2). En la mayoría de especies vegetales el esteroide mayoritario es el  $\beta$ -sitosterol (Moreau et al., 2018), mientras que el colesterol (Figura 2) se encuentra entre los minoritarios (Sonawane et al., 2016), a excepción de en algunos miembros de la familia *Solanaceae*, que presentan niveles considerablemente altos de este esteroide (Hartmann, 2004; Sonawane et al., 2016).



**Figura 2. Estructura química de los principales fitoesteros.** Núcleo estructural de los esteroides libres (izquierda) y cadenas laterales alifáticas (R) unidas a la posición C-17 en los principales fitoesteros (derecha): campesterol, β-sitosterol, estigmasterol y colesterol (Adaptado de Ferrer et al., 2017).

Dependiendo del número de grupos metilo que presenten en la posición C4, los fitoesteros se clasifican en: 4,4-dimetil-, 4-monometil- o 4-demetil esteroides, según presenten 2, 1 o ningún grupo metilo en dicha posición. La mayoría de los fitoesteros son 4-demetil esteroides (Moreau et al., 2018). La diversidad estructural de los fitoesteros en plantas superiores incrementa por las diferencias en la alquilación del carbono 24 en la cadena lateral alifática unida a C17, que puede considerarse única para los esteroides vegetales, y puede incorporar un grupo metilo o etilo. La incorporación de un grupo etilo es más común (>70% de esteroides) que la metilación (<30% de esteroides) (Nes, 2011). Dependiendo de esta característica, los esteroides pueden clasificarse en tres grupos: 24-demetilesteroides, sin sustituyente en el C24 de la cadena lateral como es el caso del colesterol (27 carbonos); 24-metilesteroides, que presentan un grupo metilo en la posición mencionada, como el campesterol (28 carbonos), y 24-etilesteroides, con un grupo etilo en C24, como ocurre en el β-sitosterol y el estigmasterol (29 carbonos). Además, el estigmasterol contiene un doble enlace entre los carbonos 22 y 23 de la cadena lateral (Figura 2).

Los fitoesteros junto con los glicerolípidos (principalmente fosfolípidos) y los esfingolípidos, son componentes esenciales de la membrana plasmática vegetal donde interactúan con las colas hidrofóbicas (cadenas de ácidos grasos) de los otros lípidos, restringiendo su movimiento (efecto de ordenamiento) (Hartmann, 2004), por lo que se considera que la composición de esteroides y sus proporciones relativas determinan las propiedades biofísicas de las membranas, tales como la fluidez y la permeabilidad (Grosjean et al., 2015; Roche et al., 2008). De forma que pequeñas diferencias en la

composición de los esteroides, pueden dar lugar a diferencias significativas en las propiedades mecánicas de la membrana (Hodzic et al., 2008) y consecuentemente, pueden producirse alteraciones en proteínas unidas a la misma, incluyendo enzimas, canales, receptores u otros componentes de la vía de transducción de señales (Schaller, 2003). Además de la importancia de los esteroides en la determinación de las propiedades biofísicas de las membranas, sus niveles y proporciones relativas en la membrana plasmática tiene también un papel prominente en las respuestas adaptativas de las plantas a diferentes tipos de estrés abiótico (Beck et al., 2015; Mishra et al., 2013; Pandey et al., 2014; Kumar et al., 2015; Posé et al., 2009; Urbany et al., 2013; Wagatsuma et al., 2015; Wang et al., 2012), así como en la interacción planta-patógeno (Castillo et al., 2019; Griebel & Zeier, 2010; Kopischke et al., 2013; Wang et al., 2012).

Particularmente, el  $\beta$ -sitosterol y el estigmasterol participan en el mantenimiento de estructura y estabilidad de la membrana plasmática, mientras que el campesterol es el precursor de los brassinosteroides (Boutté & Grebe, 2009; Schaller, 2003), los cuales están implicados en la regulación del desarrollo y en la respuesta a estrés de las plantas (Fujioka & Yokota, 2003; Vriet et al., 2015).

En plantas el contenido de colesterol suele ser varios cientos de miles de veces menor que en animales, pero no es en absoluto despreciable (Sonawane et al., 2016) y además de ser componente de las membranas, es también precursor de metabolitos especializados como los glicoalcaloides esteroideos (Bergensträhle et al., 1996) asociados a funciones de defensa frente a diferentes tipos de plagas (Milner et al., 2011), y los fitoecdisteroides, hormonas presentes en plantas que se ha sugerido que tienen una función protectora frente a insectos herbívoros y/o nematodos (Dinan, 2001). De hecho, las plantas del género *Solanum* como patata y tomate, que producen los glicoalcaloides esteroideos  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -tomatina, respectivamente, acumulan colesterol como un esteroide mayoritario (Sonawane et al., 2016).

Además de su función estructural, los esteroides desempeñan un papel esencial en la modulación del crecimiento y desarrollo de las plantas, no solo porque el campesterol es el precursor de las hormonas brassinosteroides, sino también porque los cambios en la composición de esteroides afectan directamente a una serie de procesos celulares, como el desarrollo del patrón vascular y estomático (Carland et al., 2002; Jang et al., 2000; Qian et al., 2013), la división, expansión y polaridad celular (He et al., 2003; Men et al., 2008), la modulación de la conectividad célula a célula (Grison et al., 2015), la regulación hormonal (Kim et al., 2010; Souter et al., 2002), la síntesis de celulosa durante la formación de la pared celular (Peng et al., 2002; Schrick et al., 2004), el tráfico de vacuolas (Li et al., 2015), la viabilidad del polen (Ischebeck, 2016) e incluso el desarrollo de plastidios (Babiychuk et al., 2008; Manzano et al., 2016). Además, a los fitoesteroides se les ha dedicado una especial atención debido a los beneficios que

aportan a la salud humana por su actividad hipocolesterolemica (He et al., 2018; Jones et al., 2018) y su potencial actividad antitumoral (Bradford & Awad, 2007).

La membrana plasmática (MP), además de definir el límite de la célula, provee de soporte estructural para transportadores y receptores, funciona como superficie de intercambio de iones y moléculas de señalización, y es el primer punto de contacto de las interacciones huésped-patógeno. Los esteroides, junto con los esfingolípidos y determinadas proteínas de membrana, no se distribuyen homogéneamente en la membrana plasmática, sino que se concentran preferentemente en microdominios especializados conocidos como balsas lipídicas (Grennan, 2007; Malinsky et al., 2013; Tapken & Murphy, 2015; Traw et al., 2003), que pueden servir como plataformas de anclaje para complejos proteicos, incrementando su estabilidad y actividad (Tapken & Murphy, 2015).

La distribución y el tamaño de las balsas lipídicas en la MP dependen del tipo de célula (Simons & Toomre, 2000), aunque su tamaño se estima en el rango de nanómetros, pueden agruparse en complejos de mayor tamaño y más estables (Harder & Engelhardt, 2004; Mayor & Rao, 2004). Estos microdominios de membrana se caracterizan por su reducida solubilidad en detergentes iónicos, como el Tritón X-100 (London & Brown, 2000; Peskan et al., 2000), por lo que se denominan fracciones de membrana resistente a detergente o DRM (por sus siglas en inglés, detergent-resistant membranes) (Cacas et al., 2012). El análisis proteómico de los DRM de plantas ha demostrado que sus perfiles de proteínas son diferentes a los de la membrana plasmática completa y sugiere su participación en una variedad de procesos celulares (Simon-Plas et al., 2011; Takahashi et al., 2013; Tapken & Murphy, 2015; Zauber et al., 2014), como la comunicación intercelular (Grison et al., 2015), la señalización y las interacciones planta-patógeno (Mongrand et al., 2004), la polaridad celular, el tráfico de proteínas y la transducción de señales (Laloi et al., 2007; Mongrand et al., 2010).

## 1.2. Biosíntesis de fitoesteroides

Para producir la diversidad de fitoesteroides presentes en las plantas, estas han desarrollado un vía biosintética de esteroides que difiere de la que tiene lugar en animales. Todos los isoprenoides, incluidos los esteroides, se sintetizan a partir de dos moléculas precursoras de 5 carbonos: isopentenil difosfato (IPP) y su isomero, dimetilalil difosfato (DMAPP) (Suzuki & Muranaka, 2007). En plantas, estos precursores pueden ser sintetizados por dos vías distintas: la ruta del mevalonato (MVA) que tiene lugar en el citosol-retículo endoplasmático, y la del metileritritol 4-fosfato (MEP) que se lleva a cabo en los plástidos (Lichtenthaler et al., 1997). A pesar de ocurrir en compartimentos celulares separados y operar independientemente, en determinadas circunstancias las vías del MVA y del MEP mantienen un intercambio limitado de IPP y de DMAPP (Boronat, 2010). Este intercambio podría deberse a la

necesidad de coordinar y regular la síntesis de una variedad de terpenoides a partir de un solo sustrato en común, el IPP (McCaskill & Croteau, 1998).

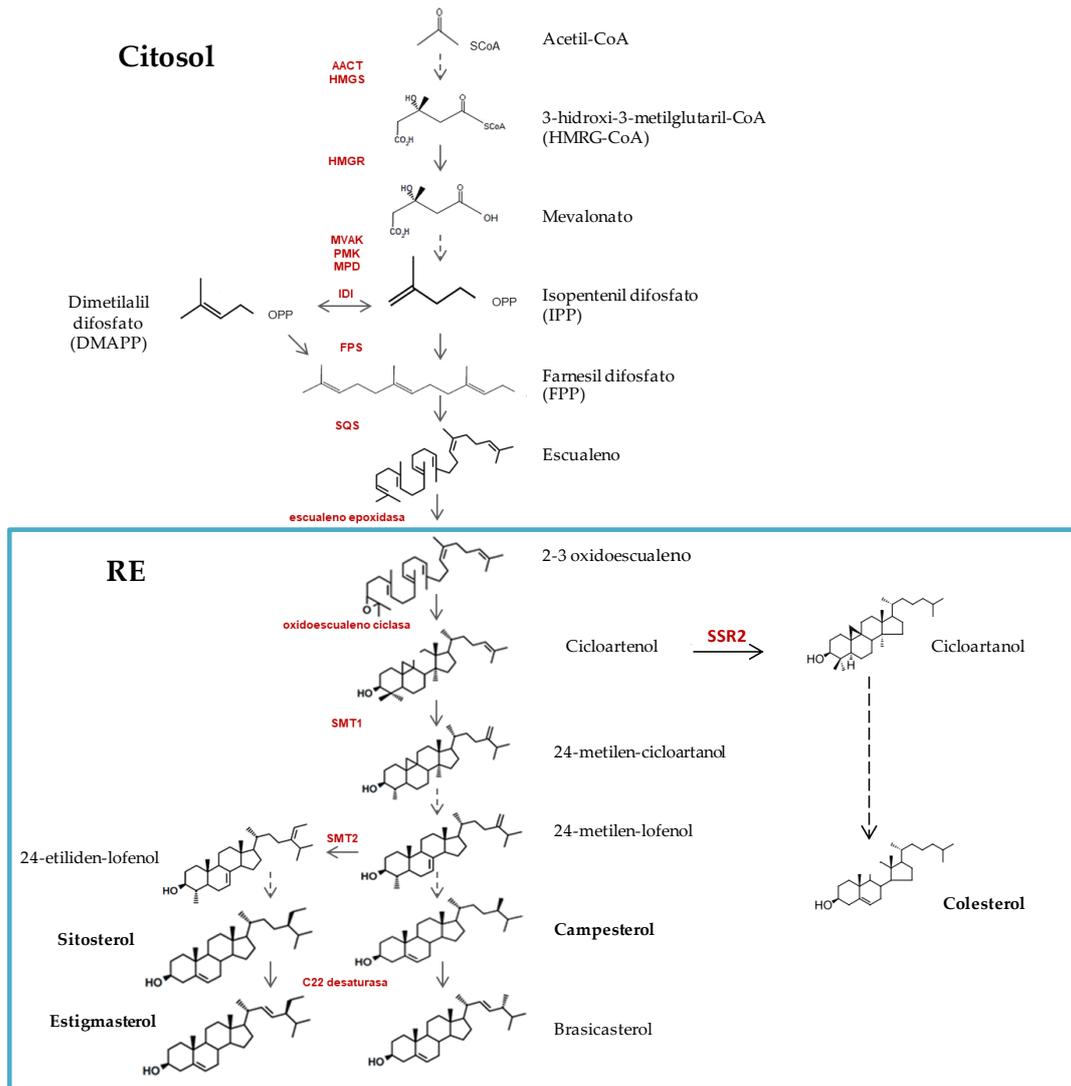
La vía del MVA es la responsable de la síntesis de sesquiterpenos y triterpenos, entre los que se encuentran los esteroides (Piironen et al., 2000). Esta ruta comienza con la condensación de tres unidades de acetil-CoA para formar 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA), catalizada por las enzimas: acetoacetil-CoA tiolasa (AACT) que condensa dos moléculas de acetil-CoA para producir acetoacetil-CoA, y 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMGS) que cataliza la condensación de una tercera molécula de acetil-CoA para generar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) (Miziorko, 2011). El HMG-CoA es reducido a MVA por acción de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGR), la enzima que cataliza la principal reacción reguladora en la biosíntesis de isoprenoides en general, y de esteroides en particular (Benveniste, 2002).

El MVA se convierte en IPP a través de tres pasos enzimáticos que incluyen dos fosforilaciones y una descarboxilación. La MVA quinasa (MVK) convierte MVA en MVA-5-fosfato, la fosfomevalonato quinasa (PMK) cataliza la formación de difosfomevalonato, y la mevalonato pirofosfato decarboxilasa (MPD) cataliza la conversión dependiente de ATP del difosfomevalonato en IPP que, a su vez se isomeriza a DMAPP por acción de la IPP isomerasa (IDI) (Figura 3). A partir de la condensación secuencial de una molécula de DMAPP con dos moléculas de IPP se forma el farnesil difosfato (FPP) mediante la acción de la enzima farnesil difosfato sintasa (FPS). El FPP es un compuesto que se encuentra en un punto de ramificación de vías metabólicas que conducen a la formación de sesquiterpenos, como las fitoalexinas sesquiterpénicas, y diversos triterpenos, entre los que se encuentran los esteroides y los brasinosteroides, prenildifosfatos de cadena larga como los dolicoles, y los poliprenoles. Además, el FPP sirve como sustrato para la prenilación de proteínas. La escualeno sintasa (SQS) cataliza la primera reacción específica de la formación de esteroides, que consiste en la condensación de dos unidades de FPP para formar escualeno, un compuesto de 30 carbonos que es el precursor de los diferentes triterpenos (Benveniste, 2002; Vranová et al., 2013).

A partir del escualeno, múltiples reacciones catalizadas por enzimas unidas a la membrana del retículo endoplásmico conducen a la síntesis de esteroides (Vranová et al., 2013). El escualeno se oxida para formar 2,3 oxidoescualeno (OS), en una reacción catalizada por la escualeno epoxidasa, que es la primera etapa de oxigenación en la ruta biosintética de esteroides (Benveniste, 2002). El OS se cicla mediante la acción de la OS ciclasa para formar cicloartenol, que representa un punto de bifurcación entre la ruta del síntesis de colesterol y la de los C-24 alquil- esteroides (fitoesteroides) (Benveniste, 2002; Schaller, 2004; Sonawane et al., 2016) (Figura 3). El cicloartenol puede ser reducido por la esterol reductasa de la cadena lateral 2 (SSR2) y generar

cicloartanol, que será el precursor del colesterol, o metilado por acción de la C-24 esterol metiltransferasa 1 (SMT1) para formar 24-metilen cicloartanol, precursor de los alquil-esteroles (Sawai et al., 2014).

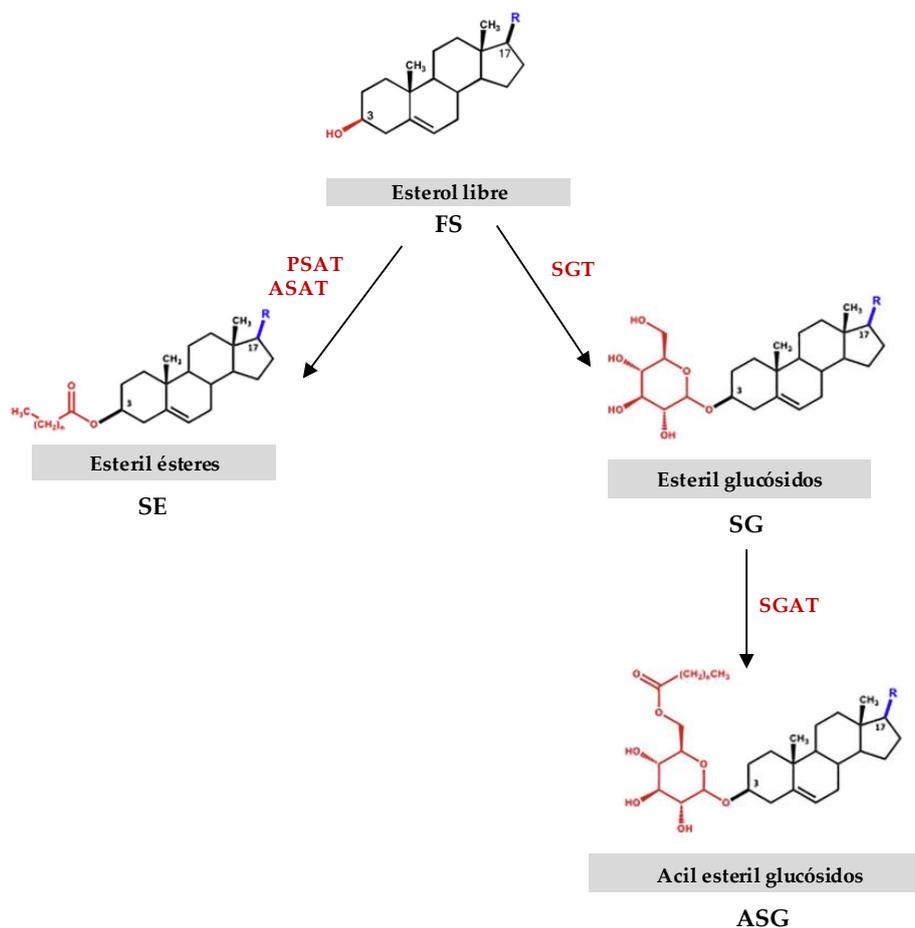
La distribución del flujo de carbonos entre las distintas ramas de la vía está regulada principalmente por la actividad de dos esterol metiltransferasas (SMT1 y SMT2) (Schaeffer et al., 2000), que utilizan S-adenosilmetionina (SAM) como dador de grupos metilo y difieren en su preferencia de sustrato. Como se ha mencionado, SMT1 cataliza la metilación del cicloartenol en la posición C24 para producir 24-metilen cicloartanol, a partir del cual tras varias reacciones enzimáticas, se produce 24-metilen lofenol, que será metilado por SMT2 en la posición C24<sup>1</sup> para producir 24-etiliden lofenol (Schaller, 2003). La metilación de cicloartenol representa un elemento regulador en la biosíntesis de los fitoesteroles finales (Valitova et al., 2016) y la participación de la enzima SMT2 representa un punto de ramificación en la ruta biosintética de estos alquil-esteroles (Schaller et al., 1998). A partir de 24-metilenlofenol, la ruta se bifurca de nuevo en dos ramas. Una que da lugar a los 24-metil-esteroles en la que el campesterol, precursor del brasicasterol, es el componente mayoritario, y otra que da lugar a los 24-etil-esteroles y conduce a la síntesis de  $\beta$ -sitosterol a partir del cual se forma el estigmasterol por acción de la C22 desaturasa (Schaller, 2004), como paso final de la síntesis de fitoesteroles (Figura 3). Esta última etapa enzimática es clave en el mantenimiento de la membrana plasmática (MP), ya que como se ha mencionado previamente, el  $\beta$ -sitosterol y el estigmasterol son componentes indispensables en la regulación de sus propiedades dinámicas (Schuler et al., 1991). Además, se ha descrito que la proporción de 24-metil y 24-etilesterole tiene influencia sobre el crecimiento y desarrollo de la planta (Valitova et al., 2016).



**Figura 3. Ruta simplificada de la biosíntesis de fitosteroles.** Las principales enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de esteroides se muestran en rojo. AACT: acetoacetil-CoA tiolasa; HMGS: HMG-CoA sintasa; HMGR: HMG-CoA reductasa; MVK: MVA quinasa; PMK: fosfomevalonato quinasa; MPD: mevalonato pirofosfato descarboxilasa; IDI: IPP isomerasa; FPS: FPP sintasa; SQS: escualeno sintasa; SMT1/2: esteroil metiltransferasas (Adaptado de Moreau et al., 2018 y Schaller, 2004).

### 1.3. Esteroles conjugados en plantas

Los esteroides están presentes no solo como esteroides libres (FS) sino también conjugados en forma de ésteres de esteroides (SE), los cuales tienen un ácido graso unido al hidroxilo en el C3 mediante un enlace éster; esteril glucósidos (SG), que tienen una molécula de hexosa, generalmente glucosa, unida al hidroxilo del C3 mediante un enlace glucosídico, y acil esteril glucósidos (ASG), que son derivados de los SG en los que el grupo hidroxilo en la posición C6 de la glucosa se esterifica con un ácido graso (Figura 4) (Moreau et al., 2002). Existe un cuarto grupo de esteroides conjugados, encontrado casi exclusivamente en la familia de las *Poaceae*, los ésteres de esteroides de hidroxycinamato (HSE), en los cuales el grupo OH del esteroide está esterificado principalmente con ácido ferúlico, aunque también se han encontrado esterificados con ácidos otros ácidos hidroxycinámicos, como cumárico, caféico o sinápico (Moreau et al., 2018).



**Figura 4. Biosíntesis de los esteroides conjugados a partir de los esteroides libres.** Las enzimas que participan en la síntesis de esteroides conjugados se muestran en rojo. SGT: UDP-glucosa:esteroide glucosiltransferasa; SGAT: esteril glucósido aciltransferasa; ASAT: acil-CoA:esteroide aciltransferasa; PSAT: fosfolípido:esteroide aciltransferasa. (Adaptado de Ferrer et al., 2017).

### 1.3.1. Esteroles glicosilados

Los SG y los ASG son ubicuos entre las plantas, aunque sus proporciones relativas y su composición es variable dependiendo de la especie vegetal y del tejido (Moreau et al., 2002). Además, sus niveles relativos pueden cambiar en respuesta a las señales de desarrollo y ambientales (Ferrer et al., 2017). En la mayoría de especies vegetales, los SG y ASG constituyen entre el 10 y el 30% de los esteroides totales. En contraste, las plantas del género *Solanum* presentan un contenido muy elevado de esteroides glicosilados (Duperon et al., 1984; Nyström et al., 2012), que en el tomate puede llegar a representar hasta el 85-90% de los esteroides totales en hoja y fruto verde maduro (Duperon et al., 1984; Whitaker, 1988). El perfil de esteroides glicosilados también presenta alteraciones cualitativas y cuantitativas importantes durante la maduración del fruto (Whitaker, 1988). Se ha sugerido que el elevado contenido de esteroides glicosilados en las especies del género *Solanum* permite mantener la integridad de las membranas celulares a pesar de los altos niveles de glicoalcaloides esteroideos presentes en estas especies vegetales, ya que estos metabolitos tienen un efecto desestabilizador de la estructura de las membranas (Blankemeyer et al., 1997; Keukens et al., 1995; Steel & Drysdale, 1988). De hecho, los niveles de estos compuestos están bajo un estricto control transcripcional (Cárdenas et al., 2016). En el caso del tomate, el alto contenido de esteroides glicosilados puede explicar por qué las células son capaces de tolerar la alta concentración de  $\alpha$ -tomatina (Steel & Drysdale, 1988), un glicoalcaloide de naturaleza esteroidea involucrado en la defensa de la planta frente a una amplia gama de fitopatógenos, que se acumula en los tejidos del tomate (Friedman, 2002; Iijima et al., 2013). Ello es posible porque los SG y los ASG, al igual que los FS, se encuentran en la membrana plasmática de las células vegetales y son especialmente abundantes en los DRM, lo que evidencia su influencia en las propiedades fisicoquímicas y las funciones biológicas de la membrana plasmática (Grosjean et al., 2015; Laloï et al., 2007; Lefebvre et al., 2007). A este respecto, cabe mencionar que la presencia de un residuo de azúcar en los esteroides glicosilados reduce drásticamente su carácter hidrofóbico en relación a los esteroides libres (Nyström et al., 2012). Se propone que los SG se encuentran orientados con el núcleo esteroideo inmerso en la parte hidrofóbica de la membrana y el azúcar orientado hacia el plano de los grupos polares de la misma. En el caso de los ASG, tanto el esteroide como la cadena del ácido graso probablemente están embebidos en la fase hidrofóbica de la membrana, con el azúcar orientado hacia la superficie hidrofílica (Furt et al., 2010). Por tanto, cambios en las proporciones relativas de esteroides glicosilados pueden alterar significativamente las propiedades y la funcionalidad de las membranas y de las proteínas que se integran en ellas (Bretscher & Munro, 1993; Yamaguchi et al., 2001).

La síntesis de SG está catalizada por la enzima UDP-glucosa:esteroide glucosiltransferasa (SGT), que establece un enlace glucosídico entre un residuo de azúcar y el grupo

hidroxilo del C3 de un esteroide libre. El principal donador de azúcar para las SGT de plantas es la UDP-glucosa y, en menor medida, UDP-ramnosa, UDP-galactosa y UDP-xilosa (Chaturvedi et al., 2011; Grille et al., 2010; Warnecke et al., 1997). Por otro lado, los ASG se forman a partir de los SG por acilación del azúcar con un ácido graso saturado o insaturado en la posición C6, siendo los más comunes el ácido palmítico, oleico y linoleico, aunque algunas plantas acumulan ASG con cadenas atípicas de ácidos grasos (Potocka & Zimowski, 2008; Schrick et al., 2012). Esta reacción está catalizada por una esterilglucósido aciltransferasa (SGAT), cuya actividad enzimática se ha detectado en tubérculos de patata (Catz et al., 1985), plántulas de tabaco (Frasch & Grunwald, 1976), hojas de berenjena (Potocka & Zimowski, 2008), cotiledones de *Calendula officinalis* (Wojciechowski & Zimowski, 1975) y zanahoria (Eichenberger & Siegrist, 1975). Sin embargo, aún no se han identificado genes que codifiquen para esta enzima ni en plantas ni en ningún otro organismo (Ferrer et al., 2017).

Las SGTs ocupan una posición clave en el metabolismo de los esteroides, ya que catalizan la etapa que conecta el metabolismo de las formas no glicosiladas de los esteroides (FS y SE) con el de las glicosiladas (SG y ASG) (Figura 4). La presencia de actividad SGT se ha detectado en varias plantas superiores y se ha sugerido que está asociada principalmente con las membranas celulares (Chaturvedi et al., 2011; Grille et al., 2010; Li et al., 2014; Tiwari et al., 2014; Zauber et al., 2014) aunque también se ha descrito la presencia de SGTs solubles en el citosol (Grille et al., 2010; Li et al., 2014; Madina et al., 2007). Las isozimas SGT solo han sido clonadas y caracterizadas funcionalmente en unas pocas especies vegetales, entre ellas, dos en *A. thaliana* (Debolt et al., 2009; Warnecke et al., 1997), cuatro en *Withania somnifera* (Chaturvedi et al., 2012), una en *Avena sativa* (Warnecke et al., 1997), dos en *Gossypium hirsutum* (Li et al., 2014), una en *Gymnema sylvestris* (Tiwari et al., 2014) y cuatro en *Solanum lycopersicum* cv. Micro Tom (Ramirez-Estrada et al., 2017). Estos estudios han demostrado que algunas especies vegetales contienen pequeñas familias de genes que codifican isozimas SGTs, las cuales, probablemente, desempeñan funciones especializadas.

En el caso de *Arabidopsis*, la caracterización de mutantes simples con pérdida de función de cada una de las SGTs (UGT80B1 y UGT80A2), así como del correspondiente doble mutante, ha revelado que la pérdida de función de estas enzimas causa una reducción importante del contenido de SG y ASG en hojas, tallos e inflorescencias con silicuas. Los tres mutantes son viables y fértiles a pesar de que el doble mutante (ugt80A2;B1) y el mutante simple ugt80B1 presentan defectos en la embriogénesis y la morfología de las semillas. Las anomalías en la cubierta de las semillas dan lugar a un fenotipo de cubierta transparente. Estos defectos no se aprecian en el mutante simple ugt80A2. Estas observaciones, junto con el análisis de los patrones de expresión de ambos genes, y el estudio detallado de los perfiles de esteroides en ambos mutantes, han llevado a proponer que las dos SGTs de *Arabidopsis* desempeñan funciones diferentes,

aunque parcialmente redundantes (Debolt et al., 2009; Stucky et al., 2015). La expresión diferencial de las SGTs de *W. somnifera* y *S. lycopersicum* en diferentes órganos y en respuesta a diferentes tipos de estrés también sugiere funciones especializadas para los miembros de estas familias de SGTs (Chaturvedi et al., 2011; Ramirez-Estrada et al., 2017).

### 1.3.2. Esteres de esteroides

Los SE están presentes en todos los tejidos vegetales, pero su contenido varía dependiendo del órgano y del tejido, así como en respuesta a factores ambientales y de desarrollo. Como se ha mencionado previamente, los SE se forman por unión de un ácido graso al grupo  $\beta$ -hidroxilo del C3 a través de un enlace éster (Figura 4). Los ácidos grasos pueden ser de longitud variable (12 a 22 carbonos), pero los más comunes son los ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico. El resto esteroles corresponde normalmente a los mismos esteroides presentes en la fracción de FS. Sin embargo, en algunos tejidos, los SE pueden contener esteroides inusuales o intermediarios biosintéticos de esteroides (Dyas & Goad, 1993). La gran diversidad estructural de los SE pone de manifiesto la relevancia del proceso de esterificación de los esteroides en relación con su función especializada en diferentes tejidos vegetales.

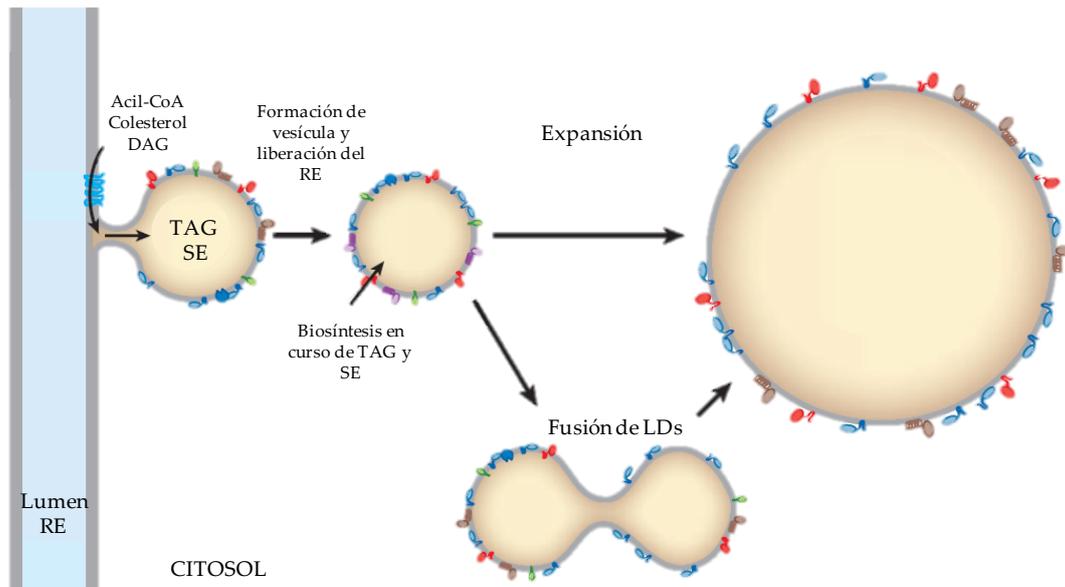
Los SE son especialmente abundantes en las anteras, concretamente en las células del tapete, en los granos de polen, las semillas y las hojas senescentes (Dyas & Goad, 1993; Hernández-Pinzón et al., 1999; Moreau et al., 2018). También se ha descrito la presencia altos niveles de SE, principalmente colesterol, en el floema de diversas especies vegetales (Behmer et al., 2013).

Los SE desempeñan un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis de esteroides en las membranas, a través de un delicado equilibrio entre su formación e hidrólisis. De esta forma se evita que los cambios de los niveles de FS provoquen un desequilibrio en la estructura y función de la membrana plasmática (Bouvier-Navé et al., 2010; Schaller, 2004; Silvestro et al., 2013). Los SE sirven como reserva de esteroides que contribuye a mantener los niveles adecuados de esteroides en la membrana plasmática durante el crecimiento y desarrollo de la planta. Las semillas almacenan grandes cantidades de SE que se movilizan durante la germinación, junto con triacilglicéridos, para facilitar el crecimiento de las plántulas en las primeras etapas del desarrollo. Esto está de acuerdo con el incremento del contenido de SE observado durante el desarrollo de la semilla (Davis & Poneleit, 1974; Harker et al., 2003; Katayama & Minoru, 1973). En el polen los SE constituyen un componente estructural de la cubierta y se sintetizan en los oleoplastos presentes en las células del tapetum de las anteras (Hernández-Pinzón et al., 1999; Ting et al., 1998) y también se encuentran en una cantidad considerable en el dominio intracelular del grano de polen (Hernández-Pinzón et al., 1999), por lo que es probable que estos SE puedan proporcionar esteroides

para la síntesis de nuevas membranas o para mantener la homeostasis de esteroides durante el crecimiento del tubo polínico. Por otra parte, se ha descrito que en el polen de diferentes especies vegetales, la composición de la fracción SE presenta variaciones considerables respecto a la fracción de FS (Villette et al., 2015). Esta diversidad SE en el polen se ha relacionado con interacciones específicas entre plantas e insectos, y con la optimización del contacto entre el grano de polen y el estigma para promover la germinación (Ischebeck, 2016; Villette et al., 2015). En los tejidos senescentes, se ha propuesto que los SE participan en el reciclaje y transporte celular de esteroides cuando los FS se liberan de las membranas celulares debido a su degradación (Dyas & Goad, 1993; McKegney et al., 1995).

El efecto regulador de la esterificación de esteroides sobre los niveles de FS se hace muy evidente cuando el flujo metabólico a través de la ruta biosintética de esteroides aumenta, como ocurre por ejemplo, en plantas mutantes o transgénicas sobreproductoras de esteroides. En estas condiciones, los niveles de FS permanecen prácticamente invariables, mientras que los esteroides producidos en exceso se acumulan principalmente como SE, en partículas citoplasmáticas conocidas como gotas lipídicas (LD) (Bouvier-Navé et al., 2010; Chapman et al., 2012; Gondet et al., 1994; Schaller et al., 1994).

Los LDs, también conocidos en plantas como oleosomas o cuerpos lipídicos, son orgánulos evolutivamente conservados presentes en casi todos los organismos y tipos celulares (Murphy, 2012). Al igual que en levadura y mamíferos, en plantas son estructuras formadas por un núcleo de lípidos neutros, rodeado por una membrana derivada del retículo endoplasmático (RE), constituida por una monocapa de fosfolípidos intercalados con proteínas que le proporcionan estabilidad, como las oleosinas, las caleosinas y las esteroleosinas (Chapman et al., 2012). La información disponible hasta el momento, indica que los LD se generan en subdominios específicos del RE en los cuales se sintetizan SE y triacilglicéridos (TAG) (Athenstaedt & Daum, 2006; Chapman et al., 2012; Wilfling et al., 2014) (Figura 5).



**Figura 5. Modelo de biogénesis y expansión de LDs.** Las aciltransferasas catalizan la formación de lípidos que componen el núcleo del LD en el RE, después los LDs adheridos son desprendidos al citosol donde pueden aumentar de tamaño por expansión por síntesis local de TAG y/o SE y la fusión de LDs pequeños. DAG, diacilglicerol; SE, ésteres de esteroides; TAG, triacilglicerol (adaptado de Walther & Farese, 2012).

Los LDs además de almacenar lípidos, pueden tener otras funciones en las células, ya que análisis proteómicos de los LD de mamíferos y levaduras han permitido identificar la presencia en los mismos de proteínas relacionadas con diferentes procesos celulares (Zehmer et al., 2009). Sin embargo, en vegetales sólo se ha logrado identificar un pequeño número de proteínas asociadas a los LD. Las mejor caracterizadas son las oleosinas, las caleosinas y las esteroleosinas, que corresponden a las proteínas más abundantes presentes en LD aislados de semillas (Chapman et al., 2012). A pesar de la presencia generalizada de LD en diversos tejidos vegetales, sólo se ha identificado un tipo de proteínas asociadas a LD (LDAP) en células que no pertenecen a semillas, las cuales se requieren para regular la compartimentación de lípidos neutros (Gidda et al., 2016; Horn et al., 2013). El hecho de que en mamíferos y levaduras muchas proteínas de los LD estén relacionadas con el metabolismo de lípidos y esteroides ha reforzado la idea de que en vegetales los LD pueden tener una función relevante en el metabolismo de lípidos neutros y en la homeostasis lipídica de las membranas (Chapman et al., 2012; D'Andrea, 2016). Sin embargo, hasta el momento sólo se han identificado dos proteínas asociadas a los LD relacionadas con el metabolismo de esteroides: las esteroleosinas, con actividad hidroxisteroide deshidrogenasa probablemente relacionadas con el metabolismo de los brasinoesteroides (Lin et al., 2003; van der Schoot et al., 2011), y la enzima biosintética de esteroides  $\Delta^7$ -esterol-C5-desaturasa, la cual se localiza en el retículo endoplasmático y en partículas lipídicas de las hojas (Silvestro et al., 2013).

### 1.3.2.1. Biosíntesis de esteres de esteroides

A pesar de la ubicuidad e importancia biológica de los esteres de esteroides en plantas, los sistemas enzimáticos responsables de la esterificación están muy poco caracterizados. Se ha detectado actividad esteroil aciltransferasa en diferentes tejidos vegetales, y los primeros estudios sugerían que las enzimas vegetales podrían utilizar donadores de grupos acilo diferentes a los descritos en mamíferos y levaduras. En mamíferos, el colesterol celular es esterificado por la acción de la acil-CoA colesterol aciltransferasa (ACAT), que utiliza una molécula de acil-CoA como donador de ácidos grasos (Buhman et al., 2000), mientras que la lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) que utiliza la lecitina (fosfatidilcolina) como donador de grupos acilo esterifica el colesterol sanguíneo (Jonas, 2000). En *Saccharomyces cerevisiae* existen dos isoformas de ACAT, denominadas ARE1 y ARE2 que esterifican ergosterol (Yang et al., 1996). ACAT y LCAT son proteínas diferentes cuya secuencia de aminoácidos no presenta una similitud significativa. Las esteroil aciltransferasas caracterizadas actualmente en plantas se clasifican en función del donador del grupo acilo en: acil-CoA:esteroil aciltransferasas (ASAT), si el donador es acil-CoA, y fosfolípido esteroil aciltransferasas (PSAT) si el donador es un fosfolípido (Korber et al., 2017).

En *A. thaliana*, se han caracterizado dos enzimas que catalizan la formación de SE a partir de FS: PSAT1 (Banaś et al., 2005) y ASAT1 (Chen et al., 2007). El gen que codifica PSAT1 (At1g04010) pertenece a la familia de genes de *Arabidopsis* “*PDAT/LCAT-like*”, la cual está constituida por seis miembros que codifican proteínas similares a la LCAT humana y la fosfolipasa A2 lisosomal (Ståhl et al., 2004). PSAT1 es una fosfolípido esteroil aciltransferasa que fue caracterizada a partir de fracciones microsomales de hojas de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresaban constitutivamente *AtPSAT1*. El nivel más alto de actividad PSAT1 se detectó cuando se utilizó fosfatidiletanolamina como donador de grupos acilo. También se observó que la enzima tiene una elevada preferencia por ácidos grasos sn-2 (saturados e insaturados) y que era capaz de acilar diferentes tipos de esteroides e intermediarios biosintéticos. La observación de que PSAT1 no utilizaba lípidos neutros como donadores de grupos acilo, sugirió que el reconocimiento de la cabeza polar de los fosfolípidos juega un papel importante en la especificidad de unión al sustrato (Banaś et al., 2005). Los datos obtenidos hasta el momento indican que los intermediarios de los esteroides son sustratos pobres para PSAT1, pero fueron preferentemente usados cuando los esteroides finales, como el sitosterol, estaban presentes en la reacción enzimática. Esto sugiere la regulación alostérica de la actividad PSAT por los esteroides finales de la vía. De esta forma, PSAT podría regular los niveles de FS en la membrana a través de un mecanismo que implica una menor disponibilidad de intermediarios biosintéticos debido a su conjugación para formar esteres de esteroides. Esto estaría en concordancia con el elevado contenido de precursores de esteroides (principalmente cicloartenol) en la

fracción de SE de plantas mutantes y transgénicas sobreproductoras de esteroides (Schaller et al., 1998). Respecto a la localización subcelular de PSAT1, la proteína quimérica obtenida por fusión traduccional de PSAT1 a la proteína marcadora GFP se localiza en estructuras esféricas citosólicas de identidad desconocida, que no parecen corresponder a cuerpos lipídicos (Kopischke et al., 2013).

El gen de *Arabidopsis* que codifica la acil-CoA esteroil aciltransferasa ASAT1 (At3g51970) fue clonado por Chen et al. (2007) y la enzima correspondiente se caracterizó mediante la expresión del transcrito ASAT1 en una cepa mutante de *S.cerevisiae*, en la cual los genes endógenos ARE1 y ARE2 estaban truncados. La determinación de la actividad enzimática en los extractos celulares de levaduras transformadas demostró que el cicloartenol era el principal esteroil aceptor de grupos acilo. Estos resultados coinciden con los obtenidos en plantas transgénicas de *Arabidopsis* sobreexpresoras de ASAT1 bajo control de un promotor específico de semillas; en las que se observa un incremento en el contenido final de esteroides en semillas, asociado a un incremento de SE y una ligera reducción del nivel de FS. El cicloartenol esterificado aumentó significativamente a expensas de una importante disminución de los niveles de campesterol y  $\beta$ -sitosterol esterificado. Además se observó que en las semillas transgénicas, la fracción de SE estaba enriquecida en ácidos grasos de cadena larga (Chen et al., 2007).

La proteína ASAT1 pertenece a la súper familia de aciltransferasas ligadas a la membrana (MBOATs, por sus siglas en inglés; Chang et al, 2011). Cuando los 15 miembros de esta familia proteica de *Arabidopsis* se utilizaron para complementar la cepa mutante de levadura deficiente en la biosíntesis de SE, solo el gen At3g51970 (ASAT1) fue capaz de recuperar la biosíntesis de SE (Chen et al., 2007). Este resultado indica que ASAT1 es el único miembro de la familia de aciltransferasas de *Arabidopsis* ligadas a membrana (MBOAT) que tiene actividad de ASAT. Bouvier-Navé et al. (2010) han utilizado mutantes de *Arabidopsis*, con expresión disminuida de los genes PSAT1 y ASAT1 (*psat1-1*, *psat1-2* y *asat1-1*), para estudiar la significación biológica de la existencia de dos sistemas enzimáticos alternativos para la síntesis de SE en plantas, así como la implicación de PSAT1 y ASAT1 en la homeostasis de esteroides. En comparación con las plantas de tipo wild type los niveles de SE están marcadamente reducidos en semillas de los mutantes *psat1-1* y *psat1-2*, pero no en el mutante *asat1-1*. Además, cuando las diferentes líneas mutantes se hicieron crecer en presencia de mevalonolactona o escualeno (precursores metabólicos que dirigen el flujo metabólico hacia los esteroides) en el medio de cultivo, se observó que *psat1-1* y *psat1-2*, pero no *asat1-1*, eran altamente sensibles a los precursores (Bouvier-Navé et al., 2010), lo que se explica por la limitada capacidad de los mutantes *psat* para transformar el exceso de FS producidos en SE. En conjunto todos estos datos indican que en *Arabidopsis*, PSAT1

participa de forma más activa que ASAT1 en la síntesis de SE y en la homeostasis de FS.

Recientemente, en nuestro grupo de investigación se identificaron, clonaron y caracterizaron los genes tomate (*S. lycopersicum* cv. Micro-Tom) ortólogos a *PSAT1* y *ASAT1* de Arabidopsis, a los que denominamos *SIPSAT1* y *SIASAT1* (Lara et al., 2018). *SIPSAT1* consiste en 15 exones separado por 14 intrones, mientras que *SIASAT1* no contiene intrones. La traducción conceptual de los cDNAs clonados puso en manifiesto que SIPSAT está formada por 630 aminoácidos y SIASAT1 por 444 aminoácidos. Mediante la expresión constitutiva de *SIASAT1* y *SIPSAT1* en las líneas mutantes *asat1-1* y *psat1-2*, respectivamente, se consiguió recuperar los niveles de SE al contenido de las plantas wild type. Además se observó que igual que ocurre con las esterol aciltransferasas de Arabidopsis, las enzimas de tomate también presentan diferente preferencia de sustrato; mientras que SIASAT esterifica preferentemente los intermediario biosintéticos cicloartenol y 24-metilen cicloartanol, SIPSAT esterifica los esteroides finales (campesterol,  $\beta$ -sitoesterol, estigmasterol y colesterol). Los análisis de localización subcelular utilizando proteínas de fusión a YFP, indicaron que SIASAT1 se localiza en la membrana plasmática, mientras que SIPSAT1, igual que se había descrito en el caso de la PSAT1 de Arabidopsis (Kopischke et al., 2013), se localiza en LDs (Lara et al., 2018).

### 1.3.3. Hidrolisis de esteroides conjugados

En células eucariotas la hidrolisis de los esteroides depende de la disponibilidad de sistemas enzimáticos que catalizan la interconversión de esteroides libres y conjugados. Este proceso se ha descrito en *S. cerevisiae*, donde la homeostasis de esteroides se logra a través de un complejo de regulación en el que las esterol aciltransferasas Arp1 y Arp2 actúan sinérgicamente con las esteril hidrolasas Yehp1, Yhpe2 y Tgl1p (Ploier et al., 2015).

La información disponible de las SE hidrolasas es limitada. Se ha descrito actividad SE hidrolasa en la fracción microsomal de plantas de tabaco (Bouvier-Navé & Benveniste, 1995) y esta enzima ha sido parcialmente purificada a partir de raíz de *Sinapis alba* (Kalinowska & Wojciechowski, 1983). Sin embargo, no se ha identificado hasta el momento ningún gen de origen vegetal que codifique para una SE hidrolasa. Se sugiere que podrían existir enzimas semejantes a las encontradas en levaduras, ya que a partir de búsqueda en bases de datos, se encuentran secuencias con alta similitud.

En plantas se ha descrito la presencia de glucosidasas capaces de hidrolizar SE. Una  $\beta$ -glucósido hidrolasa asociada a membrana se purificó a partir de plántulas de *S. alba*. Esta enzima era activada por fosfolípidos como fosfatidilcolina y fosfatiletanolamina, lo que sugiere que la actividad in vivo de esta proteína puede estar influenciada por el ambiente lipídico de la membrana (Kalinowska & Wojciechowski, 1985). En

*Cryptococcus neoformans* y *S. cerevisiae* se identificaron genes que codifican esteril  $\beta$ -glucosil hidrolasas (Watanabe, Ito, et al., 2015; Watanabe, Tani, et al., 2015).

#### 1.4. Esteroles y respuesta a estrés en plantas

La participación de los esteroles en la respuesta de la planta a estrés abiótico y biótico está bien documentada e incluye la respuesta a estrés térmico (Beck et al., 2007), sequía (Kumar et al., 2015; Posé et al., 2009), estrés salino (Mishra et al., 2013; Pandey et al., 2014), iones metálicos (Urbany et al., 2013; Wagatsuma et al., 2015) y estrés oxidativo (Wang et al., 2012); así como la respuesta a patógenos bacterianos y fúngicos (Castillo et al., 2019; Griebel & Zeier, 2010; Kopischke et al., 2013; Wang et al., 2012). Como se ha mencionado anteriormente, la permeabilidad y función de las membranas está determinada por composición de esteroles y otros lípidos, de forma que en el caso de la MP, variaciones en su composición pueden condicionar la respuesta de las células vegetales a diferentes estímulos (Valitova et al., 2010).

En el caso concreto del estrés salino, existen evidencias que correlacionan la tolerancia a sal con la permeabilidad de la MP (Mansour, 2013) la cual está regulada, entre otros factores, por la composición de esteroles, de forma que un incremento en la relación esteroles/fosfolípidos se traduce en una mayor rigidez de la misma (Moreau et al., 2002). De hecho, la MP de las plantas halófitas es constitutivamente rica en fitoesteroles y, en condiciones de estrés salino, la proporción de esteroles/fosfolípidos se mantiene o incrementa (Alvarez-Pizarro et al., 2009; Wu et al., 1998). De forma similar, en callos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Pera) tolerantes a estrés salino, incrementa el contenido de esteroles y la proporción FS/fosfolípidos en la MP, lo que se traduce en un incremento de su rigidez, que inhibe el flujo de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  al interior de la célula y, consecuentemente, contribuye a incrementar la tolerancia a sal (Kerkeb et al., 2001). Los niveles de esteroles en la MP incrementan también en un cultivar de maíz (*Zea mays*) tolerante a sal, mientras que disminuyen en un cultivar sensible, cuando ambos se exponen a una concentración 100 mM de NaCl. Además en el cultivar tolerante a sal se observa también un aumento de la proporción FS/fosfolípidos (Salama et al., 2007). Estos datos han llevado a interpretar el enriquecimiento de esteroles y el incremento en la proporción esteroles/fosfolípidos en la MP como un mecanismo de adaptación a salinidad basado en la rigidez de la membrana inducida por los esteroles (Salama et al., 2007).

En relación con los esteroles conjugados, aunque existen abundantes datos en la literatura que describen la existencia de una correlación entre cambios en su perfil y respuestas específicas de las plantas a diferentes tipos de estrés (Hugly et al., 1990; Kopischke et al., 2013; Kumar et al., 2015; Li et al., 2014; Palta et al., 1993; Tarazona et al., 2015; Vu et al., 2014), se conoce muy poco sobre las bases celulares y moleculares que explicarían la función de dichos esteroles, especialmente de los esteres de esteroles,

en estas respuestas. En el caso de los esteroides glicosilados (SG y ASG) existe más información al respecto, debido a que como afectan considerablemente las propiedades fisicoquímicas de las membranas celulares, se ha asumido que pueden tener una función importante en la adaptación de las plantas a condiciones ambientales cambiantes. Esto está de acuerdo con diversos trabajos en los que se demuestra la inducción en la expresión de genes que codifican SGTs de distintas especies vegetales en respuesta a estrés térmico, salino u osmótico (Chaturvedi et al., 2011; Li et al., 2014; Ramirez-Estrada et al., 2017), así como al tratamiento con MeJ, ABA o SA (Chaturvedi et al., 2012; Ramirez-Estrada et al., 2017). El papel de los SG en las respuestas a estrés abiótico se apoya también en la observación de que el mutante de inserción de T-DNA de *Arabidopsis ugt80b1* muestra una mayor sensibilidad a frío que las plantas de tipo wild type (Mishra et al., 2015). Además, la caracterización de plantas con niveles alterados de esteroides glicosilados, por modificación en la expresión de SGTs, ha revelado que estas alteraciones afectan tanto la tolerancia al estrés biótico como abiótico en diferentes especies vegetales (Castillo et al., 2019; Mishra et al., 2013; Pandey et al., 2014; Sharma et al., 2007).

Los datos que relacionan los SE con la respuesta a estrés son más escasos. Hugly et al., (1990) caracterizaron bioquímicamente un mutante de *Arabidopsis* resistente a frío (*chs1*) que les permitió establecer una relación entre el fenotipo y un incremento en los niveles de SE, pero no pudieron determinar si el aumento de los SE era consecuencia de la mutación o de la exposición al frío. Posteriormente, Wang et al. (2013) reportaron que el gen *CHS1* (At1g17610) codifica una proteína de tipo TIR-NB que induce diferentes respuesta de defensa a estrés por frío. La alteración de la síntesis de SE en *Arabidopsis* también se ha asociado con la resistencia a *Phytophthora infestans* (Kopischke et al., 2013). El mutante con el que se realizaron estos estudios es defectivo en actividad PSAT1, por lo que los niveles de SE están drásticamente reducidos, pero también presenta cambios en el contenido de SGs y ASGs (aumentados y disminuidos, respectivamente), lo que dificulta concluir si el fenotipo de resistencia observado es solo causado por la disminución de esteroides esterificados o también por los cambios en esteroides glicosilados.

### **1.5. El tomate como cultivo de interés agronómico y planta modelo en investigación**

El tomate (*Solanum lycopersicum*) pertenece a la extensa familia *Solanaceae* (1500 especies aproximadamente), en la cual se incluye en el género *Solanum*, uno de los más amplios entre las angiospermas. En este género también se encuentran otros cultivos importantes económicamente como la patata (*Solanum tuberosum*), la berenjena (*Solanum melongena*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y el pimiento (*Capsicum annuum*). El tomate es un cultivo importante tanto a nivel económico como nutricional.

Actualmente, es uno de los cultivos vegetales más consumidos, ya que es un ingrediente básico en las dietas de la mayoría de las culturas por ser una fuente importante de vitaminas, minerales, fibra y antioxidantes (OECD, 2017; Trivedi et al., 2016). En 2017, se produjeron más de 182 millones de toneladas (Mt) de tomates a nivel mundial, siendo China el país con mayor producción (59.5 Mt), seguido a una distancia considerable por India (20.7 Mt), Turquía (12.7 Mt) y Estados Unidos (10.9 Mt). España se encuentra también entre los 10 principales productores (5.1 Mt) (FAO, Food and Agriculture Organization; [www.fao.org](http://www.fao.org)).

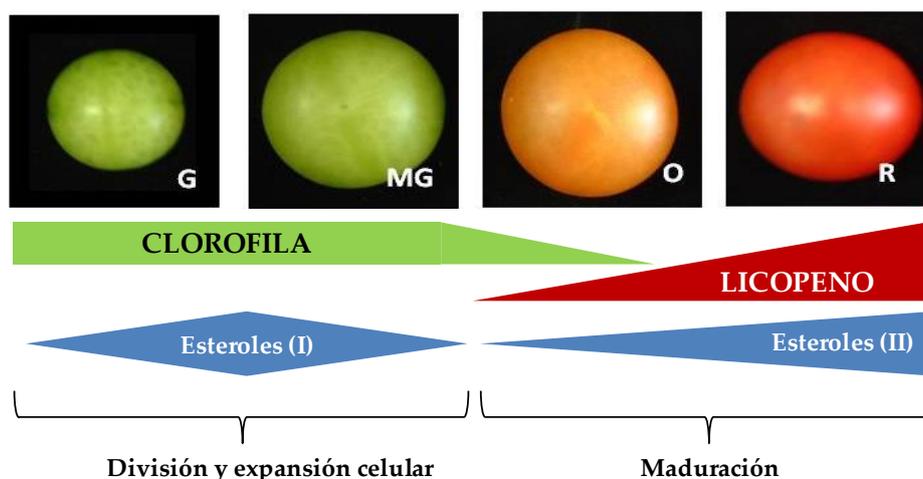
Todo esto ha hecho que a través de los años se hayan realizado esfuerzos para mejorar su productividad, calidad del fruto, y resistencia a estrés biótico y abiótico (Kimura & Sinha, 2008). Durante los últimos años, estudios basados en el uso de aproximaciones de tipo transcriptómico, proteómico y metabolómico están contribuyendo de forma muy relevante a una mejor comprensión de los procesos bioquímicos y metabólicos relacionados con el desarrollo y la tolerancia a estrés de la planta y el fruto de tomate (Paul et al., 2019), así como con la maduración y calidad del fruto (Oms-Oliu et al., 2011; Ursem et al., 2008).

El tomate, además de su importancia económica y agrícola, tiene varias características que lo convierten en un sistema modelo en investigación, principalmente para estudios sobre el desarrollo y maduración de los frutos, ya que a diferencia de otras plantas modelo como *O. sativa* o *A. thaliana*, produce frutos carnosos (Kimura & Sinha, 2008; Klee & Giovannoni, 2011). Además, tiene un genoma diploide, relativamente compacto (950 Mb) y completamente secuenciado [<http://solgenomics.net>], y su ciclo de vida es relativamente corto en comparación con otras especies productoras de frutos carnosos, lo que lo hace más fácil de manejar. Por otra parte, el fenotipo de maduración es fácilmente distinguible, y hay disponibles colecciones de germoplasma (Carvalho et al., 2011) y de mutantes afectados en los procesos de maduración (Barry & Giovannoni, 2007).

Las plantas de tomate producen un fruto globular u ovoide que presenta todas las características comunes de las bayas: un fruto carnoso derivado del ovario y con semillas en el interior de la pulpa (Barry & Giovannoni, 2007; OECD, 2017). El tejido más externo, llamado pericarpo, está recubierto por la cutícula, y en el interior se encuentra la placenta con las semillas; las cuales contienen el embrión rodeado por el endospermo, un tejido que suministra nutrientes, y una cubierta rígida externa, denominada testa.

El proceso de desarrollo y maduración del fruto transcurre en 7-9 semanas (desde el momento de la anthesis hasta el final de la maduración). La vía mejor definida en la maduración del fruto es la controlada por etileno, la cual puede dividirse en dos fases. Durante la fase I o de desarrollo temprano, tienen lugar procesos de división y

expansión celular que permiten alcanzar el tamaño final del fruto. En estas etapas, la producción de esteroides es muy activa, ya que son esenciales tanto para la división como para la expansión celular (Gutensohn & Dudareva, 2016). Durante la fase II tiene lugar la maduración del fruto estimulada por etileno (McMurchie et al. , 1972). En esta etapa, se producen múltiples cambios fenotípicos como: color, metabolismo de azúcares, ablandamiento y síntesis de compuestos volátiles. Durante la maduración del fruto de tomate también se han descrito cambios en la distribución y el metabolismo de esteroides, siendo el incremento de los niveles de esteroides esterificados uno de los más notables (Whitaker, 1988) (Figura 6).



**Figura 6. Desarrollo del fruto de tomate.** La primera fase del desarrollo del fruto involucra eventos de división y expansión celular, hasta el punto en que el fruto llega a su tamaño final (aproximadamente 30 días post-antesis [DPA]). La segunda fase involucra la maduración del fruto y se caracteriza por cambios importantes en las propiedades organolépticas. Al inicio de la segunda fase, la clorofila es degradada y el licopeno comienza a acumularse. G, Green; MG, mature green; O, orange; R, red.

Gran parte del trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral se ha realizado con *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. Este cultivar de tomate se creó inicialmente con propósitos ornamentales (Scott & Harbaugh, 1989), pero posteriormente, debido a su crecimiento compacto, se ha considerado como un sistema modelo para estudios genéticos (Martí et al., 2006). Además, presenta una serie de características que la hacen muy adecuada para diversos tipos de investigación con plantas, incluyendo la generación de plantas transgénicas y mutagénesis a gran escala (Carvalho et al., 2011; Emmanuel & Levy, 2002; Meissner et al., 1997). Entre estas características se pueden citar su corto ciclo de vida (70-90 días), tamaño pequeño (10-20 cm de alto), alta densidad de crecimiento (1357 plantas/m<sup>2</sup>) y producción de frutos maduros en un mínimo de 70 días después de la siembra.

## 2.OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Esta Tesis Doctoral se basa en un trabajo realizado previamente en nuestro grupo de investigación en el que se identificaron y comenzaron a caracterizar las esterol aciltransferasas de tomate ASAT1 y PSAT1 (Lara et al., 2018), y tiene como objetivo general avanzar en el conocimiento de la función de las esterol aciltransferasas y los esteroides esterificados en el crecimiento y desarrollo de las plantas y la respuesta de las mismas frente a diferentes tipos de estrés, empleando *Arabidopsis thaliana* y *Solanum lycopersicum* (cv Micro-Tom) como modelos de estudio. Para alcanzar este objetivo, se plantean los siguientes objetivos específicos.

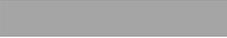
### 2.2. Objetivos específicos

**Objetivo 1.** Profundizar en la caracterización estructural y funcional de las esterol aciltransferasas ASAT1 y PSAT1 de *Arabidopsis* y tomate (cv Micro-Tom).

**Objetivo 2.** Estudiar la respuesta frente a la infección por patógenos (*Pseudomonas syringae*) de mutantes de *Arabidopsis* con niveles alterados de esteroides esterificados, y generar nuevos mutantes de *Arabidopsis* afectados simultáneamente en la síntesis de esteroides esterificados y glucosilados.

**Objetivo 3.** Generar mutantes de tomate (cv Micro-Tom) con niveles alterados de esteroides esterificados debido a la inactivación de las enzimas PSAT1 y ASAT1, y analizar los efectos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, y la respuesta a estrés salino.





## **3.RESULTADOS**



## CAPÍTULO I

### 3.1 Caracterización funcional de enzimas involucradas en la biosíntesis de esteroides esterificados en tomate

#### 3.1.1 Las acil-CoA:esterol aciltransferasas de tomate *SIASAT1* y *SIASAT8* no complementan el fenotipo del mutante de *Arabidopsis psat1-2* carente de actividad fosfolípido:esterol acil transferasa

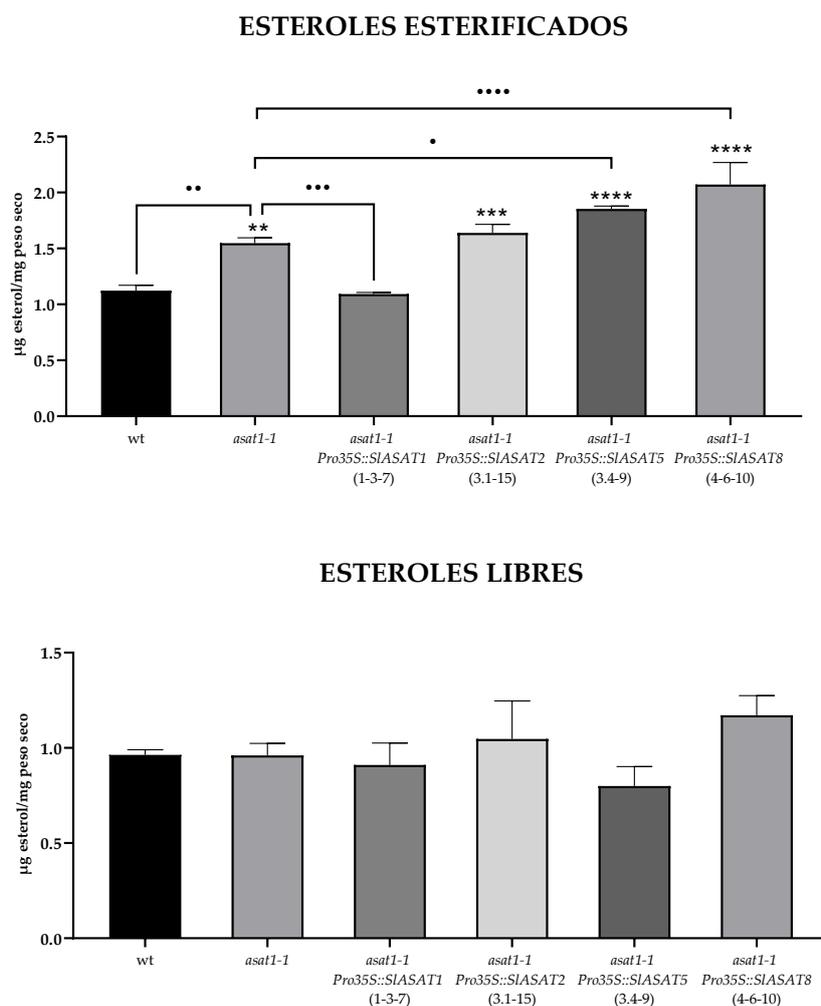
Recientemente, Lara y colaboradores (2018) reportaron la identificación, clonaje y caracterización funcional de las esteroides aciltransferasas *SIPSAT1* y *SIASAT1*. En ese trabajo se demostró que tomate tiene un único gen (*Solyc09g072710*) que codifica la enzima ortóloga de *Arabidopsis AtPSAT1*, ya que la expresión de *SIPSAT1* complementa el fenotipo morfológico y bioquímico del mutante nulo de *Arabidopsis psat1-2* que carece de actividad *PSAT1*. En el mismo estudio se caracterizó funcionalmente el gen candidato *SIASAT1* (*Solyc11g012260*) y se observó que la expresión constitutiva de *SIASAT1* en el mutante de *Arabidopsis asat1-1*, defectivo en actividad *ASAT1*, reestablece los niveles normales de SE en plántulas y semillas. Además, en ambos tejidos se produce una drástica acumulación de cicloartenol esterificado y en menor medida de 24-metilen cicloartanol esterificado, lo que demostró que *SIASAT1* es la enzima ortóloga de *AtASAT1*.

En contraste con *SPISAT1*, el genoma del tomate contiene además del gen *SIASAT1*, otros 7 genes que codifican potenciales proteínas *ASAT*, de los cuales 6 se localizan en tándem junto con *SIASAT1* en el cromosoma 11 (*Solyc11g012200*, *Solyc11g012210*, *Solyc11g012220*, *Solyc11g012230*, *Solyc11g012240* y *Solyc11g012250*) y codifican una subfamilia altamente conservada de proteínas (69-80% de identidad) con una longitud muy similar a la de *AtASAT1* (350-355 *vs.* 345 aminoácidos), a pesar de tener menor identidad con *AtASAT1* que *SIASAT1*. El otro gen candidato *SIASAT* (*Solyc12g089050*) se localiza en un cromosoma diferente y codifica una proteína sensiblemente más corta (317 aminoácidos), siendo además el miembro de la familia de proteínas tipo *ASAT* con la relación más distante respecto a *SIASAT1* (identidad 31-34%) (Lara et al., 2018).

### 3.1.1.1. Efecto de la expresión de las candidatas *SIASAT2*, *SIASAT5* y *SIASAT8* sobre el contenido de esteroides esterificados en semillas del mutante *asat1-1*

Con anterioridad al inicio de este trabajo también se habían obtenido líneas del mutante de *Arabidopsis asat1-1* que expresaban constitutivamente *SIASAT2* (gen Solyc11g012210), *SIASAT5* (gen Solyc11g012240) y *SIASAT8* (gen Solyc12g089050) (Lara, 2017). El mutante *asat1-1* no presenta ningún fenotipo morfológico y el contenido de SE en hojas de la roseta se reduce solo alrededor de un 30%. Sin embargo, en semillas y plántulas se observa un incremento significativo de los SE (36 y 50%, respectivamente) comparado con el wt (Lara et al., 2018). El análisis del contenido de esteroides libres y esterificados en extractos de semillas de estas plantas (Figura 7) confirmó que cuando se expresa constitutivamente *SIASAT1* en el mutante de *Arabidopsis asat1-1*, el contenido de SE retorna al nivel de las semillas de las plantas wt (wt=1,122  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ; *asat1-1-Pro35S::SIASAT1*=1,091  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) y no hay diferencias significativas en los niveles de esteroides libres (wt=0,964  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ; *asat1-1-Pro35S::SIASAT1*=0,910  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ).

En cambio, la expresión constitutiva de *SIASAT2*, *SIASAT5* y *SIASAT8* en el mutante *asat1-1* no restablece los valores normales de SE, sino que estos se mantienen en niveles similares a los del mutante en las líneas *asat1-1-Pro35S::SIASAT2*, o incrementan de forma significativa en las líneas *asat1-1-Pro35S::SIASAT5* (19,8% superior al mutante *asat1-1*) y *asat1-1-Pro35S::SIASAT8* (33,9% superior al mutante *asat1-1*) (Figura 7). Estos incrementos son debidos principalmente al aumento de sitosterol y campesterol esterificados (Tabla 1). Al igual que ocurre en el mutante *asat1-1* transformado con *SIASAT1*, los niveles de esteroides libres no se ve alterado de forma significativa en ninguno de los tres casos (Figura 7).



**Figura 7. Contenido de esteroides libres y esterificados en semillas de *Arabidopsis* wild type, del mutante *asat1-1* y de *asat1-1* que expresa *SIASAT1*, *SIASAT2*, *SIASAT5* y *SIASAT8*.** El contenido total de esteroides esterificados es la suma de los ésteres de colesterol, campesterol, estigmasterol, sitosterol, isofucoesterol, cicloartenol y 24-metilen-cicloartanol. El contenido total esteroides libres es la suma de colesterol, campesterol, estigmasterol, sitosterol, estigmastanol, isofucoesterol y cicloartenol. El análisis cuantitativo se realizó a partir de un pool de semillas del que se realizaron extracciones por triplicado, y los resultados se expresan como la media de las réplicas con la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas en el contenido total de esteroides esterificados (panel superior) y libres (panel inferior) (ANOVA de una vía con  $\alpha=0,05$  seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunnett  $**p<0.001$ ,  $***p<0.0002$ ,  $****p<0.0001$ ) respecto al contenido en las semillas wt. Los puntos indican las diferencias significativas en el contenido de esteroides esterificados y libres (ANOVA de una vía con  $\alpha=0,05$  seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunnett  $\bullet p<0.0124$ ,  $\bullet\bullet p<0.001$ ,  $\bullet\bullet\bullet p<0.0005$ ,  $\bullet\bullet\bullet\bullet p<0.0001$ ) respecto al contenido en las semillas del mutante *asat1-1*. El análisis estadístico se realizó usando GraphPad Prism version 8.2.1 (GraphPad Software, San Diego, California EUA.).

Tabla 1. Perfil de esteroides esterificados y libres en extractos de semillas de Arabidopsis.

Esteroides Esterificados							
µg esteroles/mg tejido seco							
Esterol	Línea	wt	<i>asat1-1</i>	<i>asat1-1</i> <i>Pro35S::SIASAT1</i>	<i>asat1-1</i> <i>Pro35S::SIASAT2</i>	<i>asat1-1</i> <i>Pro35S::SIASAT5</i>	<i>asat1-1</i> <i>Pro35S::SIASAT8</i>
				(1-3-7)	(3.1-15)	(3.4-9)	(4-6-10)
Colesterol		0,006±0,002	0,008 ± 0,002	0,005±0,006	0,006±0,0013	0,005 ± 0,0008	0,008 ± 0,0023
Campesterol		0,193±0,015	0,250 ± 0,012	0,171±0,0107	0,252±0,0148	0,327 ± 0,0135	0,301 ± 0,0273
Estigmasterol		0,002±0,0006	0,004 ± 0,001	0,004±0,0022	0,003±0,0010	0,001 ± 0,0002	0,003 ± 0,0013
β-sitosterol		0,886±0,031	1,225 ± 0,036	0,864±0,0122	1,313±0,0594	1,449 ± 0,0178	1,678 ± 0,1665
Isofucosterol		0,030±0,004	0,055 ± 0,003	0,028±0,0019	0,060±0,0034	0,067 ± 0,0038	0,077 ± 0,0043
Cicloartenol		0,005±0,001	0,005 ± 0,001	0,017±0,0083	0,004±0,0005	0,005 ± 0,0005	0,004 ± 0,0011
24-metilen-cicloartanol		-	-	0,003±0,0012	-	-	-
<b>TOTAL</b>		<b>1,122±0,048</b>	<b>1,547±0,048</b>	<b>1,092±0,015</b>	<b>1,638±0,078</b>	<b>1,854 ± 0,025</b>	<b>2,072 ± 0,196</b>

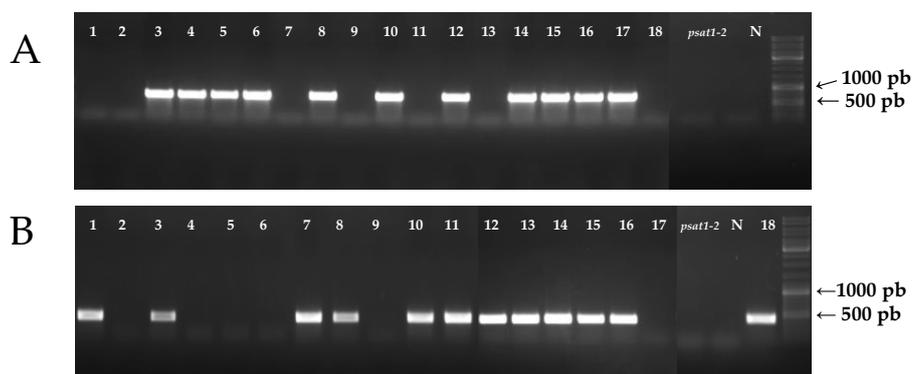
  

Esteroides Libres							
µg esteroles/mg tejido seco							
Esterol	Línea	wt	<i>asat1-1</i>	<i>asat1-1</i> <i>Pro35S::SIASAT1</i>	<i>asat1-1</i> <i>Pro35S::SIASAT2</i>	<i>asat1-1</i> <i>Pro35S::SIASAT5</i>	<i>asat1-1</i> <i>Pro35S::SIASAT8</i>
				(1-3-7)	(3.1-15)	(3.4-9)	(4-6-10)
Colesterol		0,012 ± 0,003	0,015 ± 0,004	0,015 ± 0,002	0,015 ± 0,004	0,012 ± 0,002	0,022 ± 0,009
Campesterol		0,157 ± 0,006	0,143 ± 0,004	0,150 ± 0,007	0,152 ± 0,015	0,113 ± 0,009	0,171 ± 0,017
Estigmasterol		0,008 ± 0,007	0,013 ± 0,005	0,020 ± 0,010	0,015 ± 0,003	0,016 ± 0,003	0,019 ± 0,004
β-sitosterol		0,764 ± 0,025	0,757 ± 0,051	0,700 ± 0,091	0,840 ± 0,020	0,516 ± 0,046	0,907 ± 0,086
Estigmastanol		0,015 ± 0,004	0,013 ± 0,007	0,007 ± 0,003	0,012 ± 0,003	0,043 ± 0,008	0,030 ± 0,008
Isofucosterol		0,011 ± 0,007	0,011 ± 0,003	0,008 ± 0,006	0,014 ± 0,004	0,026 ± 0,003	0,028 ± 0,005
Cicloartenol		0,008 ± 0,001	0,012 ± 0,002	0,017 ± 0,008	0,014 ± 0,008	-	0,022 ± 0,009
<b>TOTAL</b>		<b>0,964 ± 0,027</b>	<b>0,961 ± 0,063</b>	<b>0,910 ± 0,116</b>	<b>1,047 ± 0,200</b>	<b>0,800 ± 0,101</b>	<b>1,171 ± 0,103</b>

### 3.1.1.2. Obtención de líneas del mutante *psat1-2* que sobreexpresan SIASAT1 y SIASAT8

El fenotipo de toxicidad generalizada que muestra el mutante de *Arabidopsis psat1-2* cuando se aumenta el flujo de síntesis de esteroides libres por adición de mevalonato al medio de crecimiento de las plantas (Bouvier-Navé et al., 2010) resulta útil para identificar de forma rápida genes que codifican esteroil aciltransferasas involucradas en la síntesis de ésteres de los esteroides mayoritarios.

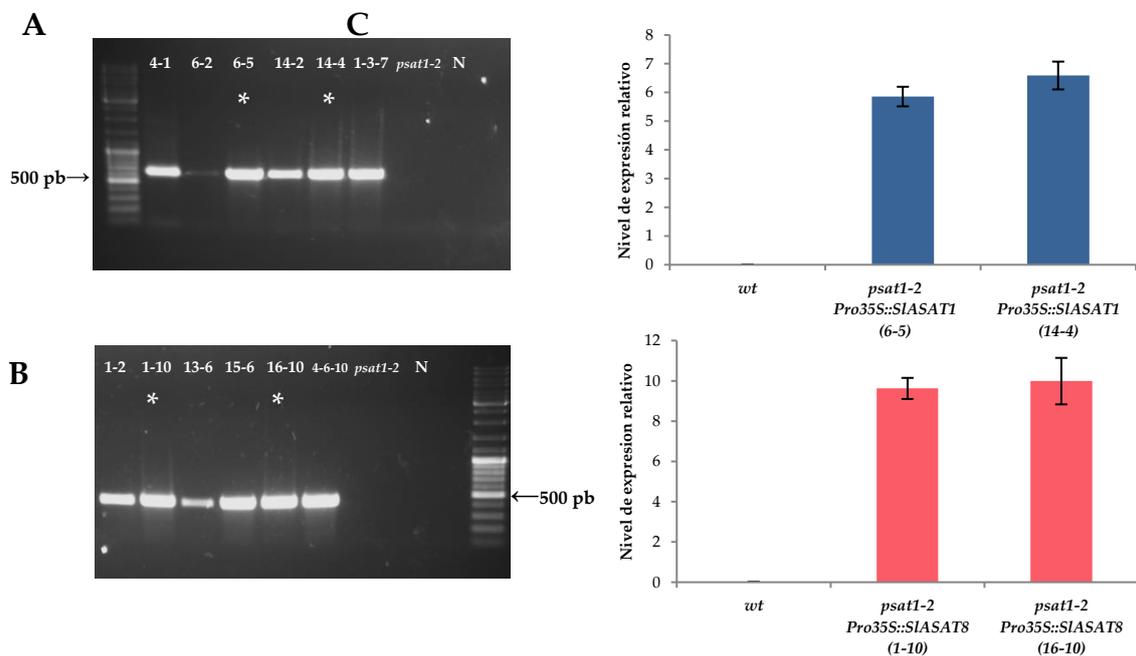
Tomando en consideración la información presentada en la sección anterior (Figura 7), se consideró pertinente expresar en el mutante *psat1-2* las enzimas SIASAT1, especializada en la esterificación de esteroides intermediarios (Lara et al., 2018), y SIASAT8, que incrementa el contenido de SE en semillas respecto al mutante *asat1-1* (apartado anterior), y de esta forma estudiar su capacidad para restablecer el fenotipo wt en el mutante *psat1-2* crecido en presencia de mevalonato exógeno. Para ello, plantas del mutante *psat1-2* se transformaron, por el método de inmersión floral (apartado 6.1.7), con *A. tumefaciens* GV3101 portador de los plásmidos pEG100-SIASAT1 y pEG100-SIASAT8, que contienen los cDNAs *SIASAT1* y *SIASAT8* bajo el control del promotor constitutivo *CaMV35S*. A partir de las semillas obtenidas de plantas transformadas con los transgenes *35S::SIASAT1* y *35S::SIASAT8* se seleccionaron 18 plantas resistentes a Basta (PPT), en las cuales se analizó la expresión del correspondiente transgén por RT-PCR semicuantitativa utilizando primers específicos de cada gen (Tabla 11), que amplificaban fragmentos de 651 pb (*SIASAT1*) y 462 pb (*SIASAT8*) (Figura 8). De esta forma se comprobó que de las 18 líneas resistentes a PPT seleccionadas en cada caso, 11 expresaban el transgén *SIASAT1* (Figura 8A), y 12 el *SIASAT8* (Figura 8B).



**Figura 8. Niveles de mRNA de SIASAT1 y SIASAT8 en los transformantes primarios del mutante de *Arabidopsis psat1-2*.** Resultado de la RT-PCR semicuantitativa en plantas (T1) *psat1-2 Pro35S::SIASAT1* (A) y *psat1-2 Pro35S::SIASAT8* (B). El análisis se realizó con cDNA sintetizado a partir de RNA total extraído de hoja de roseta de plantas de 6 semanas de edad y los primers utilizados se muestran en la tabla 11. En cada carril se indica el número asignado a cada línea transgénica. Los carriles N y *psat1-2* son controles negativos. En el carril de la derecha se muestra la mezcla de fragmentos marcadores de tamaño.

A partir de las líneas transgénicas que expresaban *SIASAT1* y *SIASAT8*, después de analizar la segregación del carácter de resistencia a PPT, se obtuvieron 5 líneas homocigotas para cada uno de los transgenes, en las cuales se determinó de nuevo la expresión de los mismos por RT-PCR semicuantitativa.

En la figura 9 se muestra el resultado del análisis y se indican con asteriscos las líneas sobreexpresoras de *SIASAT1* (Figura 9A) y *SIASAT8* (Figura 9B) seleccionadas para continuar los experimentos. En las 4 líneas elegidas se cuantificó la expresión relativa de los transgenes ASAT de tomate por RT-qPCR (Figura 9C y D), observándose que en conjunto presentan niveles de expresión elevados, y que estos eran muy similares en las 2 líneas portadoras de *SIASAT1* y en las 2 portadoras de *SIASAT8*.



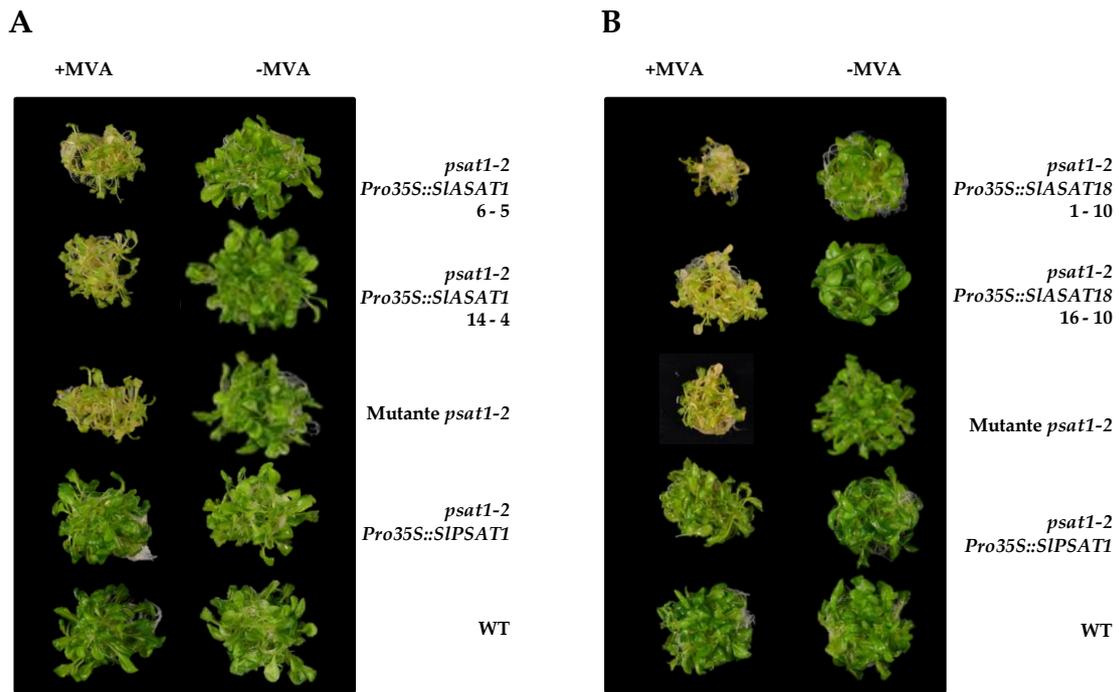
**Figura 9. Niveles de mRNA SIASAT1 y SIASAT8 en plantas mutantes de *Arabidopsis asat1-1* y *psat 1-2* retransformadas con los transgenes para expresar SIASAT1 y SIASAT8.** Los niveles de transcrito se determinaron mediante RT-PCR semicuantitativa (A y B) y RT-qPCR (C y D) empleando cDNA obtenido a partir de RNA total extraído de plántulas crecidas *in vitro* durante 15 días en medio 0,5 MS sólido. Los valores son medias con desviación estándar (n=3). N, control negativo; en el carril de la derecha se muestra la mezcla de fragmentos marcadores de tamaño. Las muestras de cDNA de líneas *asat1-1 Pro35S::SIASAT1* (1-3-7) y *asat1-1 Pro35S::SIASAT1* (4-6-10) se incluyen en la PCR semicuantitativa como referencia de líneas positivas sobreexpresoras de cada transgén.

### 3.1.1.3. Evaluación de la toxicidad de mevalonato en el mutante *psat1-2* que sobreexpresa *SIASAT1* y *SIASAT8*

Para evaluar si la expresión de *SIASAT1* y *SIASAT8* revierte el fenotipo del mutante *psat1-2*, plántulas de las líneas portadoras de los transgenes *Pro35S::SIASAT1* y *Pro35S::SIASAT8* en homocigosis se cultivaron en medio líquido 0,5 MS suplementado con 3 mM MVA, tal como se explica en el apartado 6.1.9. En el experimento se incluyeron plántulas wt, del mutante *psat1-2*, y del mutante *psat1-2* complementado con *SIPSAT1* (*psat1-2 Pro35S::SIPSAT1*), dos líneas homocigotas *psat1-2 Pro35S::SIASAT1* (6-5 y 14-4) y otras dos *psat1-2 Pro35S::SIASAT8* (1-10 y 16-10). Después de 11 días de incubación en condiciones de día largo y agitación, en presencia y en ausencia de MVA, se recogieron las plántulas para valorar los resultados.

La adición de MVA al medio de crecimiento conduce a un aumento en los niveles de esteroides libres que son altamente tóxicos en ausencia de la enzima AtPSAT1 (Bouvier-Navé et al., 2010). El fenotipo de toxicidad por MVA se revierte completamente cuando se expresa constitutivamente *SIPSAT1*, al ser ésta la enzima ortóloga de AtPSAT1 (Lara et al., 2018). Sin embargo, la expresión constitutiva de los genes de tomate *SIASAT1* y *SIASAT8* no logró revertir el fenotipo de toxicidad provocado por la adición exógena de MVA al medio de cultivo. Como se muestra en la figura 10, las líneas sobreexpresoras de *SIASAT1* (6-5 y 14-4) y *SIASAT8* (1-10 y 16-10) presentaron severos signos de toxicidad caracterizados por una disminución generalizada del tamaño de las plantas y una marcada clorosis. Estos signos son iguales a los observados en el mutante *psat1-2*. En cambio, la línea sobreexpresora de *SIPSAT1* fue capaz de crecer con normalidad en presencia de MVA, su crecimiento y aspecto fueron similares a los de las plantas wt crecidas en las mismas condiciones. Los controles de cada una de las líneas de interés, crecidos en ausencia de MVA no presentaron alteraciones en su crecimiento (Figura 10).

Los resultados de estos análisis de complementación fenotípica del mutante *psat1-2* confirman la diferente función metabólica de *SIPSAT1* y *SIASAT1*, en términos de capacidad para esterificar esteroides mayoritarios finales e intermediarios, respectivamente. En el caso de *SIASAT8*, a pesar de incrementar los niveles de SE tanto en hojas (Lara, 2017) como en semillas (este trabajo) del mutante *asat1-1*, tiene actividad metabólica distinta de la de PSAT.



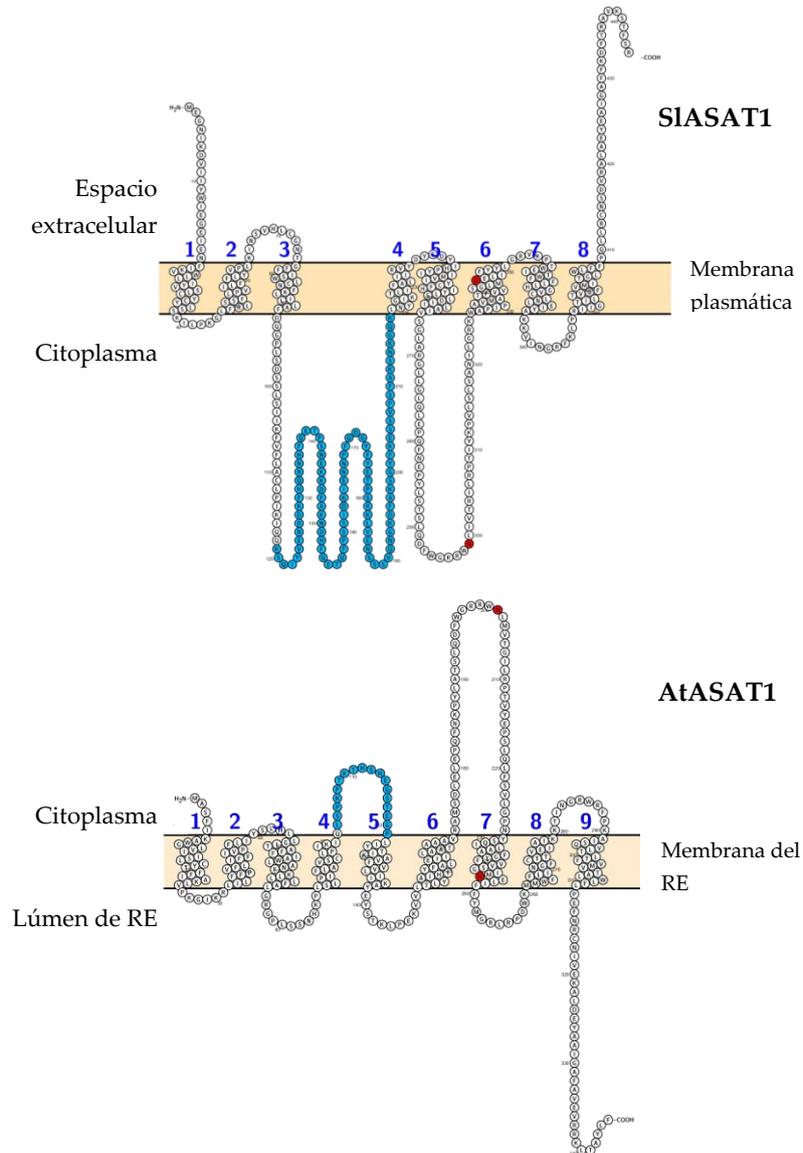
**Figura 10.** Efecto del mevalonato sobre plántulas de diferentes líneas del mutante de *Arabidopsis psat1-2* retransformadas con los transgenes para expresar SIPSAT1, SIASAT1 y SIASAT8. Las imágenes corresponden a plántulas crecidas durante 11 días en medio 0,5 MS líquido con y sin MVA 3 mM. El experimento se realizó de forma independiente con las líneas sobreexpresoras de SIASAT1 6-5 y 14-4 (A), y SIASAT8 1-10 y 16-10 (B).

### 3.1.2 Obtención de secuencias codificantes de enzimas ASAT quiméricas

#### 3.1.2.1 Diseño y obtención de las proteínas quiméricas ATA y TAT

Estudios realizados previamente utilizando técnicas de fluorescencia habían demostrado que la proteína AtASAT1-GFP se localiza en la membrana del RE, mientras que SIASAT1-GFP se localiza en la membrana plasmática (MP). La predicción de la topología de inserción de SIASAT1 en la membrana plasmática indicaba que uno de los residuos catalíticos importantes para la actividad enzimática (Asn-299) se localizaría en un bucle citoplasmático que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6. La topología predicha para AtASAT1 en la membrana del RE indicaba que el residuo equivalente, la Asn-202, se localizaría en un bucle también citosólico que conecta los dominios transmembrana 6 y 7. En ambos casos, el bucle citosólico está flanqueado en el extremo C terminal por un dominio transmembrana que contiene un residuo de histidina, que se ha reportado también como importante en la catálisis enzimática (Figura 11) (Lara et al., 2018).

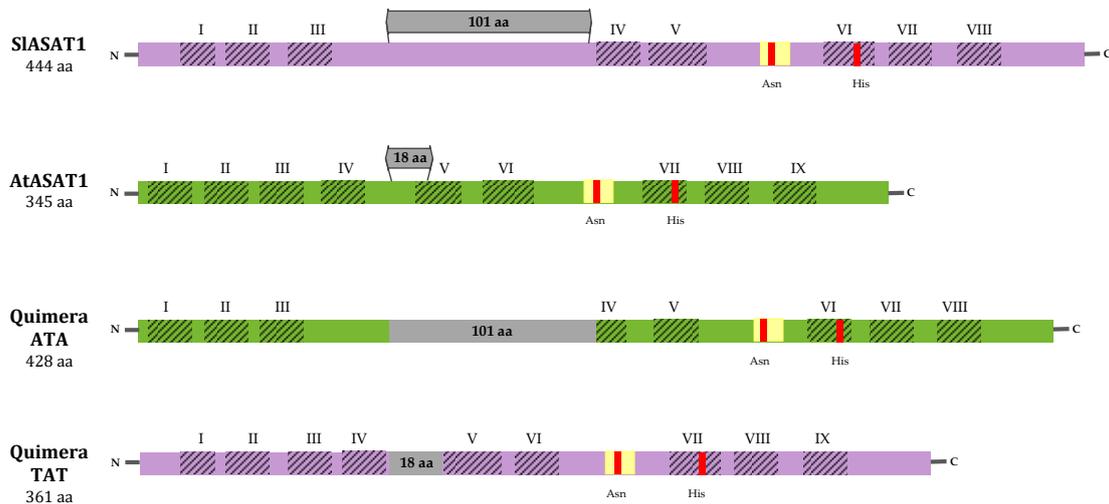
Además, SIASAT tiene un bucle adicional de 127 residuos aminoacídicos, que conecta los dominios transmembrana 3 y 4 y es mucho más largo que el de AtASAT1, que conecta las secuencias transmembrana 4 y 5, y consta solo de 18 residuos. Se ha propuesto que estos bucles, cuyos aminoácidos se han coloreado en azul en la figura 11, podría desempeñar algún papel en la diferente localización subcelular de SIASAT1 (MP) y AtASAT1 (RE) (Lara et al., 2018).



**Figura 11. Modelo de la topología de inserción a membrana de SIASAT y AtASAT.** Predicción realizada mediante el programa Protter 1.0 (Omasits et al., 2014). Las secuencias transmembrana están numeradas en azul. Los residuos de Asn e His reportados como importantes para la catálisis de ASAT se muestran en rojo. La secuencia de 101 aminoácidos comprendida desde la posición 119 al 218 en la secuencia de SIASAT y la secuencia equivalente de 18 aminoácidos comprendida desde las posiciones 104 a 121 en la secuencia de AtASAT se muestran en azul (Lara et al., 2018).

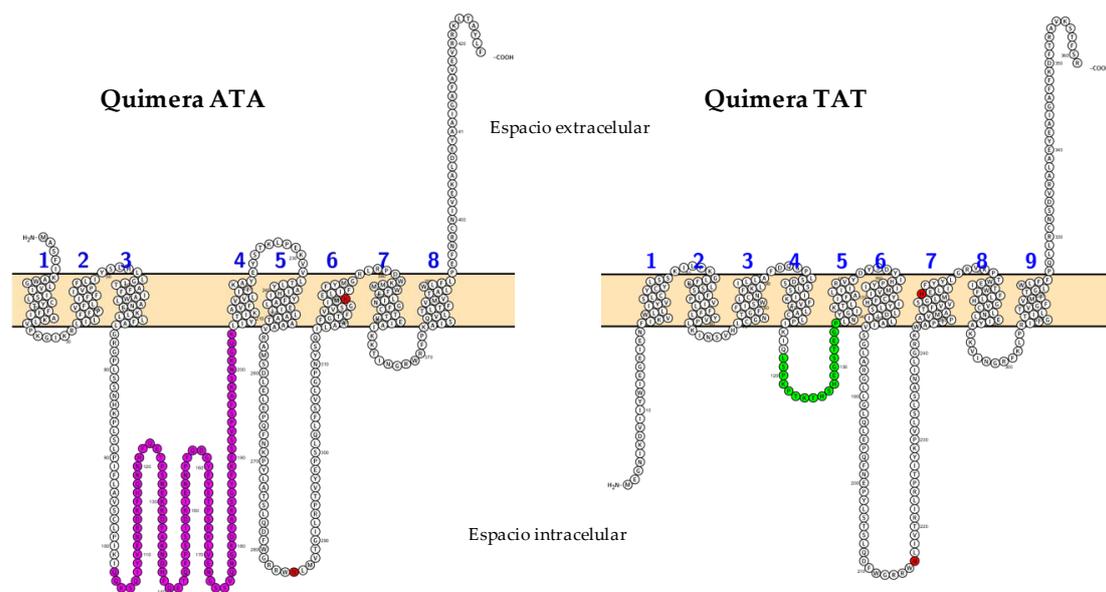
Para comenzar a investigar este aspecto, se procedió a la creación de secuencias codificantes ASAT quiméricas con las regiones mencionadas de las proteínas de tomate y Arabidopsis intercambiadas. La primera quimera, llamada ATA (Arabidopsis-

Tomate-Arabidopsis), consiste en los primeros 103 aminoácidos de AtASAT1, seguidos de los 101 aminoácidos de la región central de SlASAT1 y los últimos 224 aminoácidos de AtASAT. La quimera inversa se denomina TAT (Tomate-Arabidopsis-Tomate) y es una proteína que consta de los primeros 117 aminoácidos de SlASAT1, seguidos de los 18 aminoácidos de la región central de AtASAT1 y los últimos 226 aminoácidos de SlASAT1 (Figura 12; Anexo). Las secuencias que codifican estas proteínas quiméricas se construyeron mediante la estrategia de PCR solapante descrita en el apartado 6.4.5.



**Figura 12. Representación de las proteínas SlASAT1, AtASAT1 y las quimeras ATA y TAT.** Las secuencias transmembrana I-VIII en SlASAT1 y I-IX en AtASAT1 se representan mediante cuadrados con trama. La ubicación de los aminoácidos catalíticamente importantes (Asn e His) se indica en rojo en el bucle hidrofílico que se proyecta hacia el citoplasma (en amarillo) y en los dominios transmembrana VI y VII de SlASAT1 y AtASAT1, respectivamente. En un recuadro gris se muestran los 101 aminoácidos de SlASAT1 insertados entre las regiones N y C terminal de AtASAT1 en la quimera ATA, y la región de 18 aminoácidos de AtASAT1 insertada entre las regiones N y C terminal de SlASAT1 en la quimera TAT.

La predicción de la topología de inserción a membrana de la proteína quimérica ATA muestra que uno de los residuos catalíticamente importantes (Asn-285) se localizaría en un bucle en el espacio intracelular que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6. En el caso de la proteína quimérica TAT el residuo de Asn-216 equivalente se localizaría en un bucle proyectado también hacia el espacio intracelular, que conecta los dominios transmembrana 6 y 7. Igual que en las predicciones de topología de las proteínas SlASAT1 y AtASAT1, en ambas quimeras este bucle está flanqueado en el extremo C terminal por un dominio transmembrana que contiene el residuo de histidina catalíticamente importante (Figura 13).



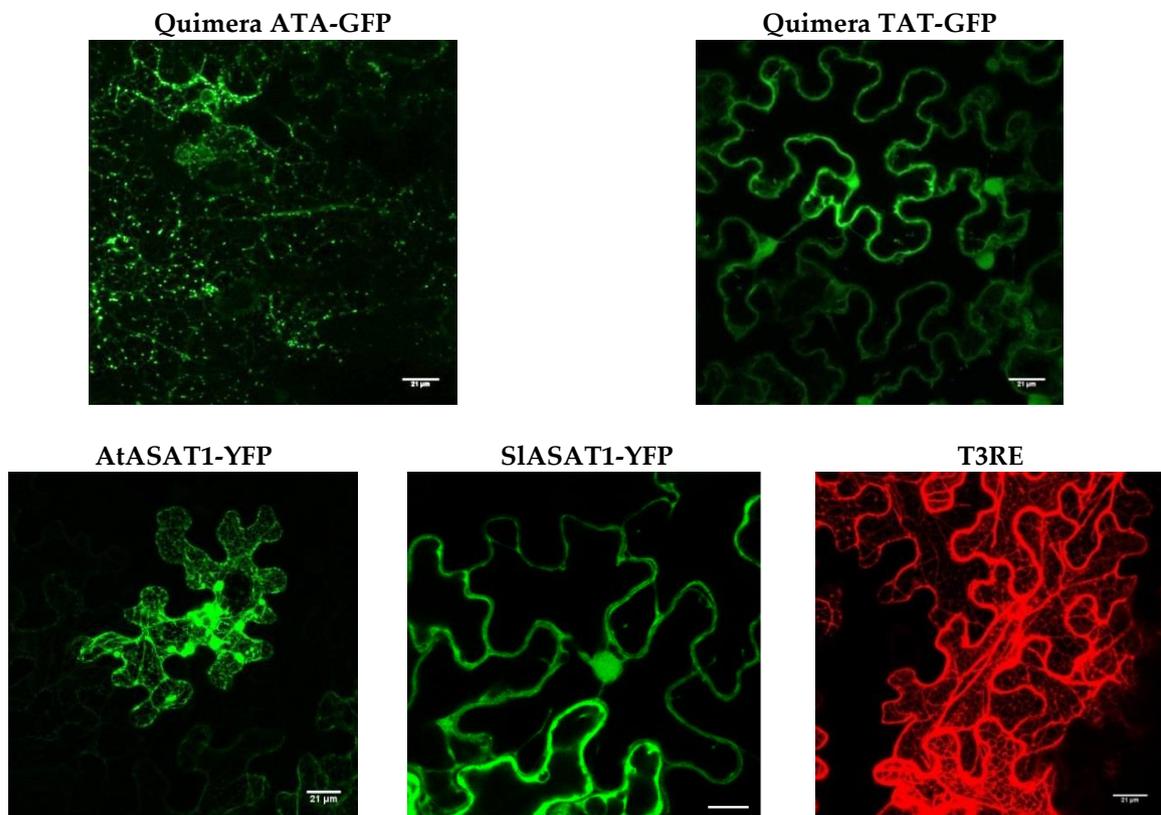
**Figura 13. Modelo de la topología de inserción a membrana de las proteínas quiméricas ATA y TAT.** Predicción realizada en Protter 1.0 (Omasits et al., 2014). Las secuencias transmembranales están numeradas en azul. Los residuos Asn e His reportados como importantes para la catálisis de ASAT se muestran en rojo. En magenta se muestran los 101 aminoácidos insertados entre las regiones N y C terminal de AtASAT1 en la quimera ATA. En verde la región de 18 aminoácidos intercalada entre las regiones N y C terminal de SIASAT1 en la quimera TAT.

### 3.1.2.2 Localización subcelular de las quimeras ATA-GFP y TAT-GFP en *N. benthamiana*

Las secuencias que codifican las proteínas ATA y TAT obtenidas por PCR solapante se clonaron y se transfirieron al vector pEarly Gate 103, que contiene la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente GFP. De esta manera, las proteínas se expresarían fusionadas por su extremo C-terminal a la GFP (ATA-GFP y TAT-GFP), en ambos casos bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S. Para determinar de forma experimental la localización subcelular de dichas quimeras, se analizó por microscopia laser confocal el patrón de fluorescencia de células de *N. benthamiana* agroinfiltradas que expresaban transitoriamente AtASAT1-YFP, SIASAT1-YFP, ATA-GFP y TAT-GFP. Cuatro días después de la agroinfiltración se recolectaron muestras de las zonas infiltradas y se observaron al microscopio.

Como se puede observar en la figura 14, la expresión de ATA-GFP mostró un patrón punteado de fluorescencia verde que sugiere que la proteína se localiza sobre la membrana del RE. Este patrón fue distinto al observado cuando se expresaba AtASAT1-YFP, puesto que en este caso, la fluorescencia muestra un patrón reticulado similar al de la proteína marcadora del RE T3RE (Lara et al., 2018), que se corresponde con una localización de AtASAT1-YFP en el RE. Por el contrario, la fluorescencia emitida por TAT-GFP se detecta en la periferia celular, con un patrón igual al

observado en las células que expresan SIASAT1-YFP (Lara et al., 2018) indicando una localización de TAT-GFP en la MP. Estos resultados muestran que al sustituir la región central de 18 aminoácidos de AtASAT1 por la región equivalente de 101 aminoácidos de SIASAT1 (quimera ATA), la proteína se concentra en regiones muy concretas del RE, a diferencia de lo que ocurre con la proteína original AtASAT1 que parece distribuirse de forma mucho más homogénea en la membrana del RE. En cambio, el intercambio de las secuencias centrales en dirección contraria, que da lugar a la quimera TAT-GFP, no parece tener ningún efecto sobre la localización subcelular de dicha proteína en la MP en comparación con la de la proteína original SIASAT1.



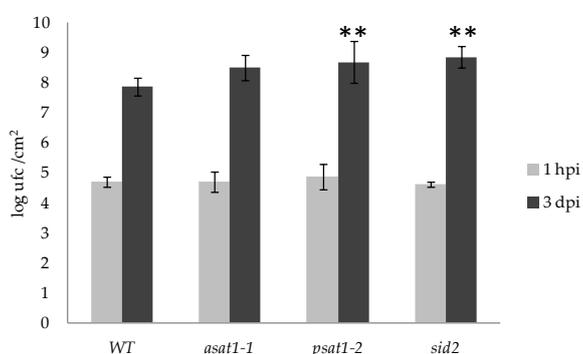
**Figura 14.** Análisis por microscopía laser confocal de células de *N. benthamiana* que expresan transitoriamente las fusiones proteicas ATA-GFP, TAT-GFP, SIASAT1-YFP, AtASAT1-YFP y T3RE. Barras de escala = 21  $\mu\text{m}$ , excepto SIASAT1-YFP con barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ . Las imágenes fueron captadas 4 días después de proceder a la agroinfiltración de las hojas y el resultado presentado es una proyección en modo Z-stack de 27-44 secciones de 0,53  $\mu\text{m}$  cada una.

## CAPITULO II

### 3.2. Implicación de los esteroides conjugados en la respuesta a estrés biótico causado por infección con *Pseudomonas syringae* en plantas de *Arabidopsis thaliana*

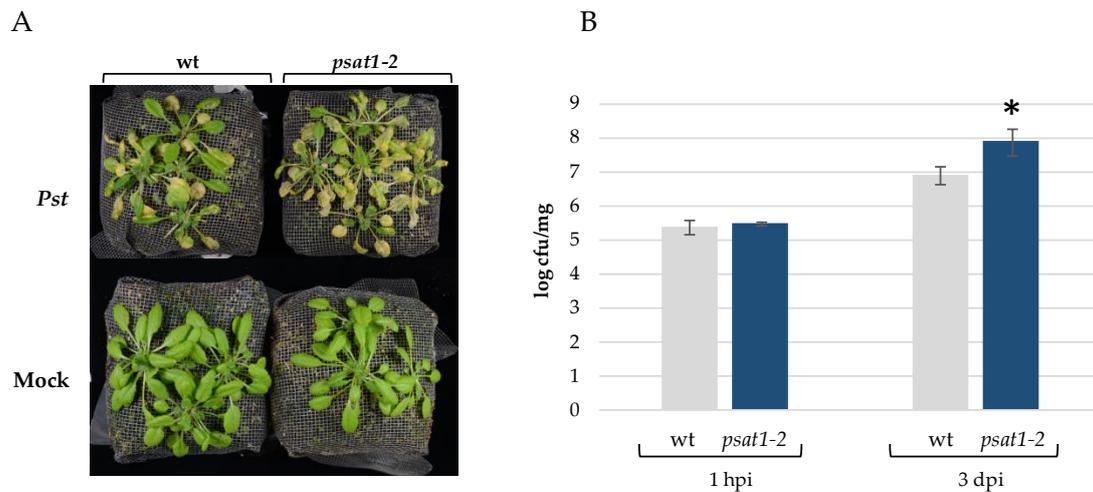
#### 3.2.1. Respuesta de los mutantes *asat1-1* y *psat1-2* de *A. thaliana* a la infección con *P. syringae*

Como una primera aproximación para estudiar la posible participación de los SE en la respuesta a estrés biótico, se evaluó la respuesta de los mutantes de *Arabidopsis asat1-1* y *psat1-2* a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv *tomate* (*Pst* DC3000) (Cuppels, 1986). Tras infectar por infiltración con *Pst* DC3000 plantas de *A. thaliana* wild type y mutantes *asat1-1* y *psat1-2* de cuatro semanas de edad, se recogieron muestras (discos de 5 mm) una hora post-infección (1 hpi) y 3 días post-infección (3 dpi), en las que se determinó la titulación del patógeno mediante diluciones seriadas, siembra en medio LB sólido, suplementado con kanamicina y rifampicina, e incubación a 28 °C durante 48h, tal como se indica en el apartado 6.1.10. El recuento de las unidades formadoras de colonias (ufc) mostró que el crecimiento de la bacteria era significativamente superior en las hojas del mutante *psat1-2* que en las hojas de plantas wild type; mientras que en el tejido foliar del mutante *asat1-1* el crecimiento bacteriano fue similar al observado en las plantas wild type. Estos resultados indican, que el mutante *psat1-2* es más susceptible a la infección por *Pst* DC3000 que las plantas wild type; pero estas diferencias no se observaron en el mutante *asat1-1*, cuya respuesta a la infección bacteriana fue similar a la observada en las plantas wild type (Figura 15). Como control del experimento se utilizó el mutante de *Arabidopsis sid2*, defectivo en señalización de SA (Nawrath & Métraux, 1999), y por tanto susceptible a *P. syringae*. Como cabía esperar, el que el crecimiento bacteriano en tejido foliar de este mutante fue significativamente superior que en las plantas wild type (Figura 15).



**Figura 15. Ensayo de infección con *Pst* DC3000 en plantas de *A. thaliana*.** Crecimiento de *Pst* DC3000 en plantas de *Arabidopsis* wild type (WT), y mutantes *asat1-1*, *psat1-2* *sid2* infectadas por infiltración 1 hpi y 3 dpi. Los datos representan como ufc/cm<sup>2</sup> de tejido fresco y son la media de 6 determinaciones. Las barras verticales representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas en relación a las plantas wild type por prueba de Tukey (\* P <0.05).

En el caso del mutante *psat1-2*, este experimento se repitió infectando las plantas por inmersión en una suspensión bacteriana (apartado 6.1.10.2), obteniéndose los mismos resultados que por el método de infección por infiltración, ya que como puede observarse en la figura 16A, los signos de clorosis son más evidentes en el mutante *psat1-2* que en las plantas wild type. Además, el número de ufc 3 dpi es significativamente superior en el mutante que en las plantas wild type (Figura 16B). Estos resultados apoyan la idea de que las plantas de *A.thaliana* defectivas en PSAT1 son más sensibles a la infección por *Pst* DC3000 que las plantas wild type.



**Figura 16. Ensayo de infección con *Pst* DC3000 en plantas de *A. thaliana*.** (A) Fotografías representativas de plantas wild type (wt) y mutantes *psat1-2* infectadas por inmersión en una suspensión de *Pst* DC3000 y sus respectivos controles no infectados después de 3 días post infección (dpi). (B) Crecimiento de *Pst* DC3000 en plantas wild type y mutante *psat1-2* determinado 1hpi y 3dpi. Los datos se presentan como log ufc/mg de tejido fresco y son la media de 6 determinaciones. Las barras verticales representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas entre wt y *psat1-2*. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de Tukey (\* P <0.05).

### 3.2.2. Generación de líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* con genes SGT y ASAT inactivados

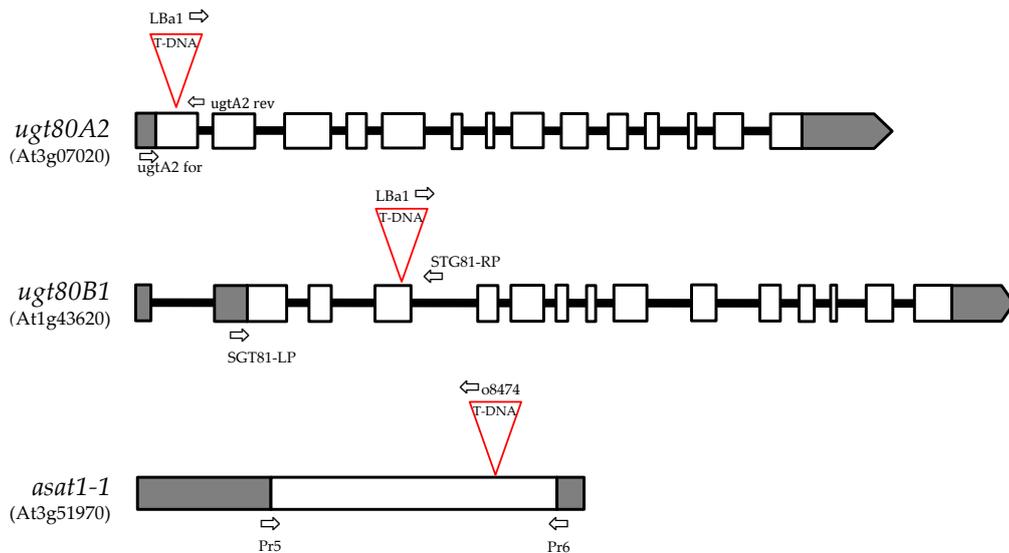
#### 3.2.2.1. Obtención de mutantes dobles y triples por polinización cruzada

En *Arabidopsis* se han descrito dos esteroles glucosil transferasas (SGTs) implicadas en la síntesis de esteroles glucosilados: UGT80A2 y UGT80B1 (Debolt et al., 2009; Stucky et al., 2015). Con el propósito de disponer de líneas mutantes de *Arabidopsis* con nuevos perfiles alterados de esteroides esterificados y glucosilados, se realizaron diferentes cruces entre los mutantes simples *ugt80A2* y *ugt80B1*, y el doble mutante *ugt80A2B1*, con el mutante simple *asat1-1*, todos ellos en homocigosis para los correspondientes alelos mutados (Figura 17). Se realizaron cruces en todas las combinaciones posibles para obtener dobles y triples mutantes. Para ello, los estigmas de las inflorescencias emasculadas de los mutantes *ugt80A2*, *ugt80B1* y *ugt80A2B1* se cubrieron con el polen del mutante *asat1-1*. A su vez, con el polen de los mutantes *ugt80A2*, *ugt80B1* y *ugt80A2B1* se cubrieron estigmas en inflorescencias de plantas del mutante *asat1-1* (apartado 6.1.8). Después de polinizar los estigmas de las flores emasculadas, se dejaron desarrollar hasta la formación de las silicuas y se recolectaron justo antes de que empezaran a abrirse. Cada silicua fue almacenada individualmente para después sembrar las semillas y obtener las plantas resultantes de los distintos cruces.

Para encontrar líneas homocigotas se seleccionaron las semillas de 8, 6 y 7 silicuas obtenidas de cada pareja de cruces *ugt80A2xasat1-1* y *asat1-1xugt80A2*, *ugt80B1xasat1-1* y *asat1-1xugt80B1*, y *ugt80A2B1xasat1-1* y *asat1-1xugt80A2B1*, respectivamente. De cada grupo de semillas de una misma silicua se obtuvieron 18 plantas (generación T1) por cada cruce. Una vez se desarrolló la roseta, se extrajo DNA genómico de una hoja y tras comprobar su integridad por PCR con los primers que amplifican una región del gen ubiquitina (UBC21) (Tabla 12), se genotiparon las plantas por PCR.

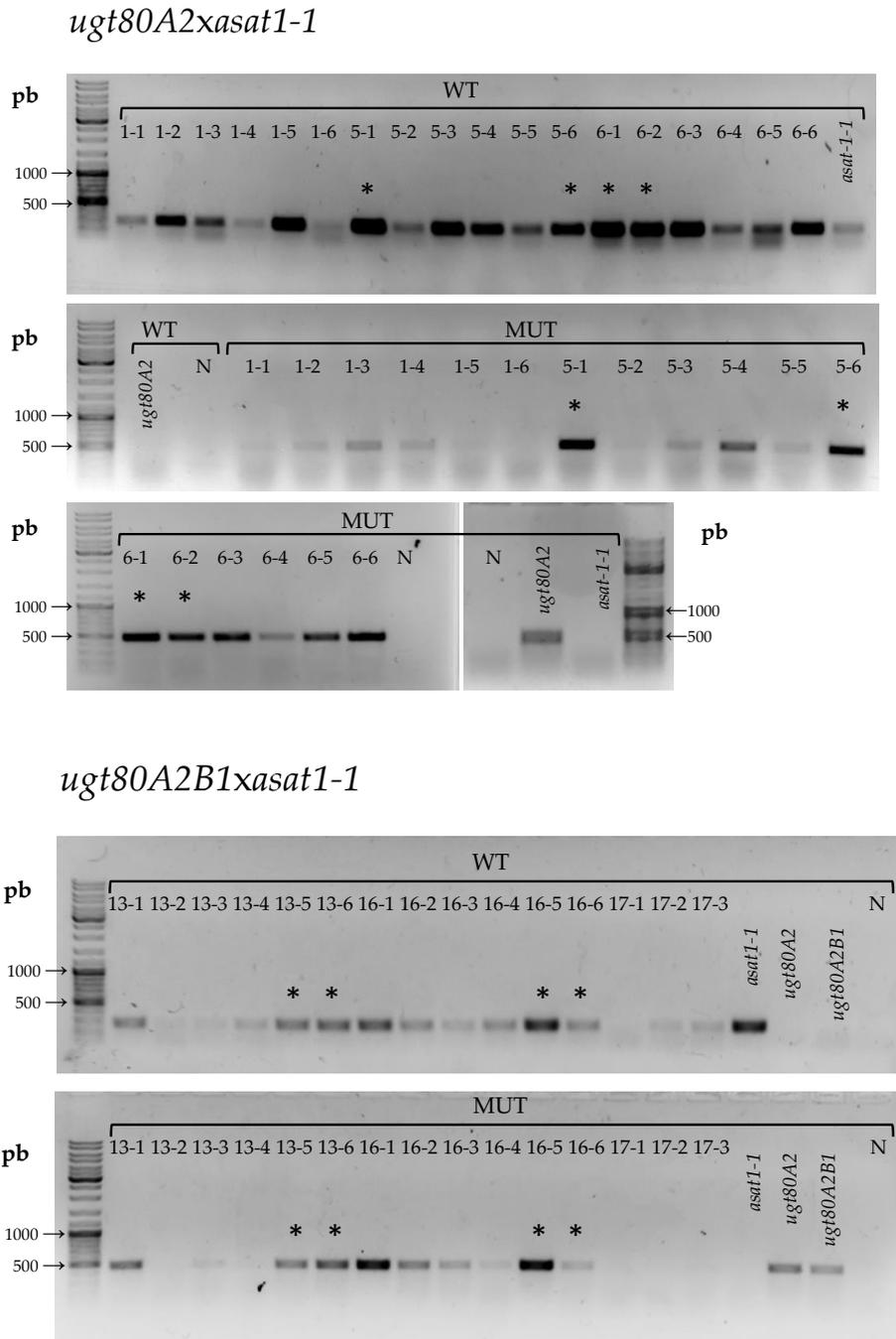
### 3.2.2.2. Genotipado de las plantas obtenidas del cruce de mutantes *asat1-1* con *ugt80A2*, *ugt80B1* y *ugt80A2B1*

En primer lugar, se identificó la presencia de los alelos mutantes *ugt80A2* y *ugt80B1*, cuya estructura junto con la posición de los primers empleados en el genotipado (Tabla 13) se muestra en la Figura 17.

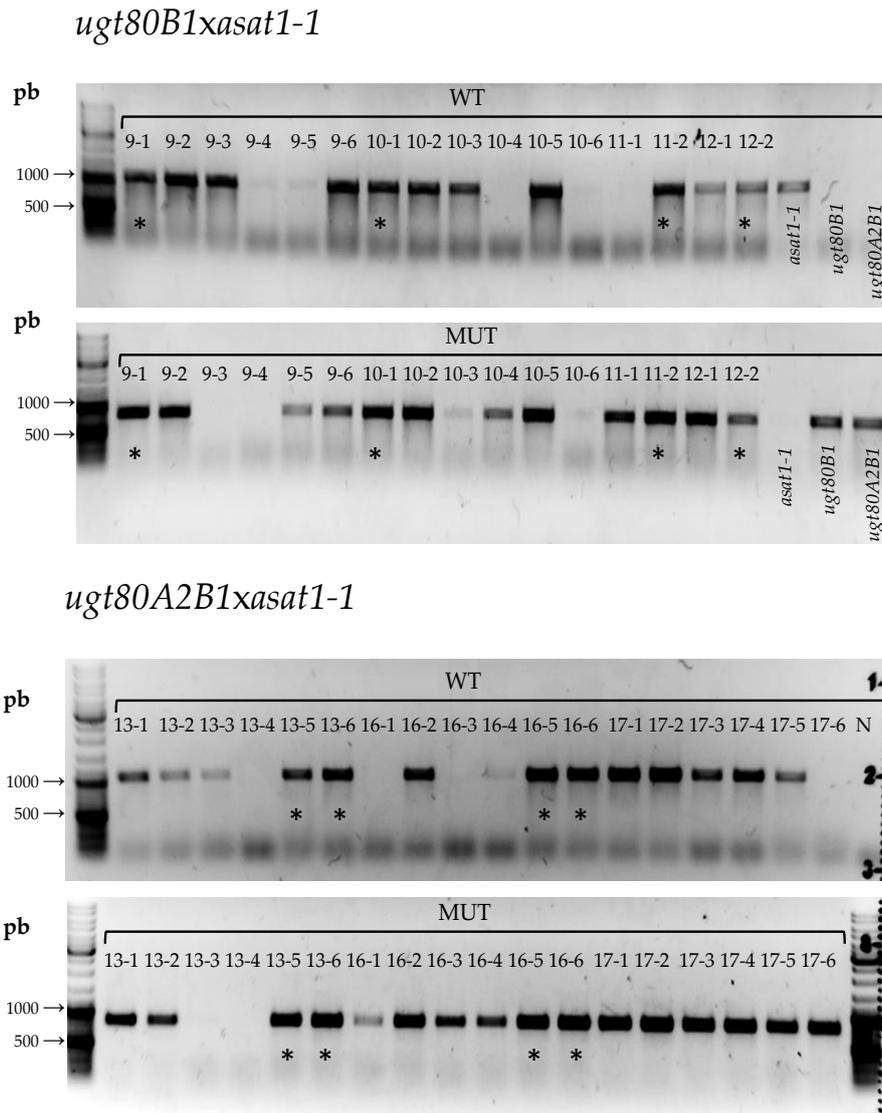


**Figura 17. Representación esquemática de las inserciones de T-DNA en los alelos mutantes *ugt80A2*, *ugt80B1* y *asat1-1*.** Las regiones en gris y blanco indican las secuencias no traducidas y los exones, respectivamente. Las líneas continuas negras representan intrones. Los T-DNAs se indican en forma de triángulos en color rojo. Las flechas indican la posición y la orientación de los primers usados en el genotipado de los mutantes dobles y triples.

Empleando el DNA genómico de las plantas obtenidas como se describe en el apartado anterior (generación T1), mediante PCR (apartado 6.4.1) se amplificaron fragmentos de DNA correspondientes a regiones específicas de los alelos mutantes *ugt80A2* y *ugt80B1* usados en los cruces. Se identificaron diversas plantas portadoras de los alelos mutantes *ugt80A2* y *ugt80B1* en heterocigosis procedentes de los cruces *ugt80A2xasat1-1* (Figura 18, imagen superior) y *ugt80B1xasat1-1* (Figura 19, imagen superior), respectivamente. Así mismo, se obtuvieron plantas con los alelos *ugt80A2* (Figura 18, imagen inferior) y *ugt80B1* (Figura 19, imagen inferior) procedentes de los cruces *ugt80A2B1xasat1-1*. Para cada cruce se seleccionaron cuatro plantas que contenían los alelos *ugt80A2* y *ugt80B1* en heterocigosis, las cuales se dejaron crecer hasta obtener semillas y después se continuó con los análisis de segregación. Las plantas elegidas se indican con asteriscos en los carriles correspondientes de las figuras 17 y 18.



**Figura 18. Genotipado por PCR para identificar el alelo *ugt80A2* en las plantas procedentes de los cruces *ugt80A2xasat1-1* y *ugt80A2B1xasat1-1*.** La presencia del alelo mutante se comprobó mediante la amplificación de un fragmento de 439 pb empleando los primers LBA1 y *ugtA2* rev y la del alelo wild type por amplificación de un fragmento de 269 pb con los primers *ugtA2* for y *ugtA2* rev. Se incluyeron como controles de la PCR muestras de DNA genómico de los mutantes simples *asat1-1* y *ugt80A2* y *ugt80A2B1*. El número indicado en cada carril es el asignado a cada planta mutante. N, control negativo de amplificación sin DNA. Los asteriscos indican las plantas de cada cruce seleccionadas para continuar con la segregación.

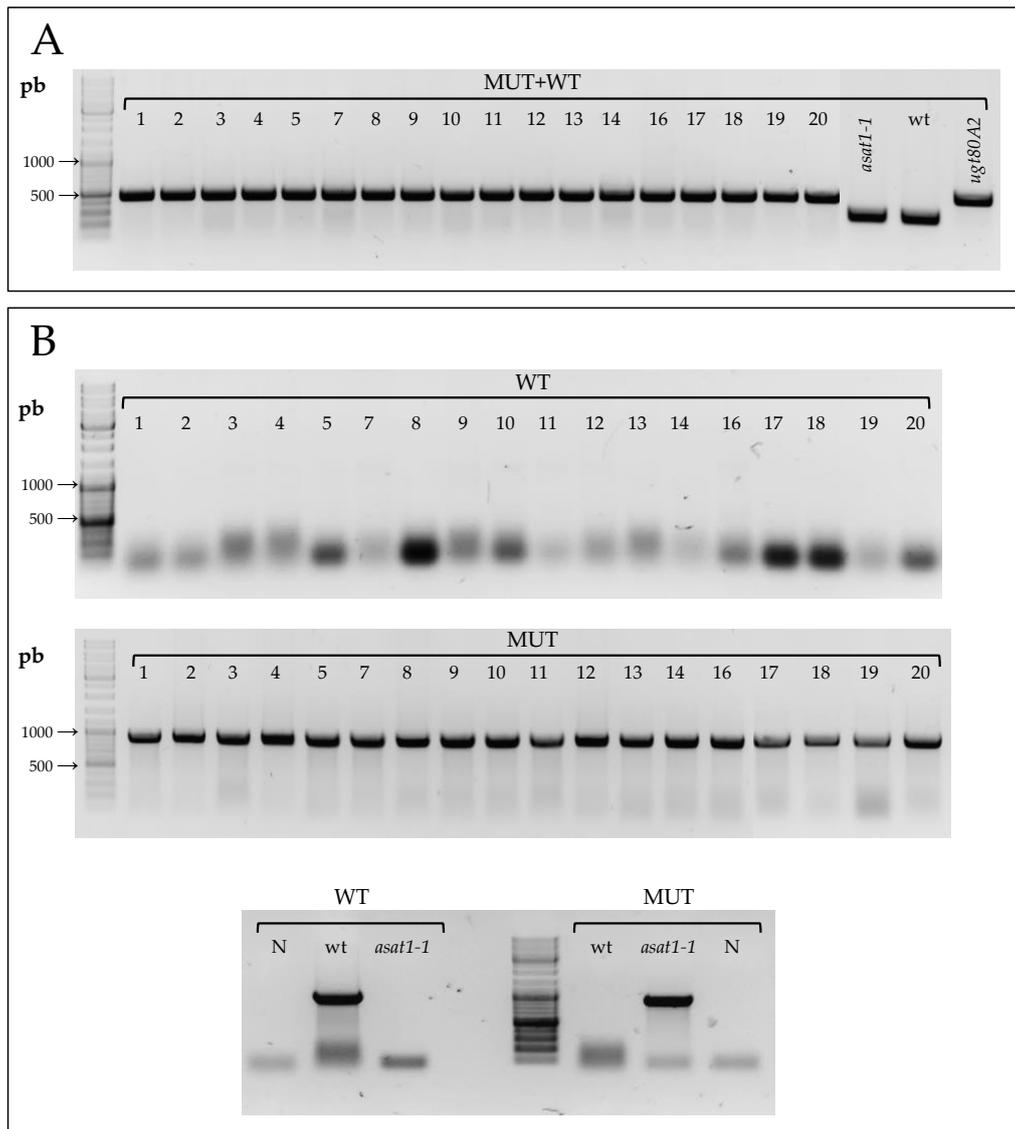


**Figura 19. Genotipado por PCR para identificar el alelo *ugt80B1* en las plantas procedentes de los cruces *ugt80B2xasat1-1* y *ugt80A2B1xasat1-1*.** La presencia del alelo mutante se comprobó mediante la amplificación de un fragmento de 800 pb empleando los primers LBA1 y SGT81-RP y la del alelo wild type por amplificación de un fragmento de 1200 pb con los primers SGT81-LP y SGT81-RP. Se incluyeron como controles de la PCR muestras de DNA genómico de los mutantes simples *asat1-1*, *ugt80B1* y *ugt80A2B1*. El número indicado en cada carril es el asignado a cada planta mutante. N, control negativo de amplificación sin DNA. Los asteriscos indican las plantas seleccionadas para continuar con la segregación.

El mutante *asat1-1* presenta resistencia a sulfadiazina, y esta característica facilita la selección de las plantas portadoras de dicho alelo. Es por esto que las semillas de cada uno de los cruces de las 4 plantas T1 identificadas en el genotipado anterior (alelos *ugt80A2* y *ugt80B1* en heterocigosis), se sembraron en placas con medio 0,5 MS con sacarosa 1% suplementado con sulfadiazina (2,5 µg/mL). El método de selección usado en este punto, se describe en el apartado de Materiales y Métodos 6.1.7.1.

De las plántulas resistentes a sulfadiazina (generación T2), y por lo tanto portadoras del alelo *asat1-1*, se transfirieron a sustrato 16 provenientes de cada cruce y una vez se desarrolló la roseta, se extrajo DNA genómico de una hoja para proceder a confirmar la presencia del alelo *asat1-1* mediante genotipado por PCR. La posición de los primers utilizados, así como la estructura del mutante se muestran en la figura 17. Los análisis de segregación del carácter de resistencia a la sulfadiazina en combinación con el genotipado por PCR de los mutantes se continuaron en generaciones sucesivas hasta obtener en la generación T3 el doble mutante *ugt80B1xasat1-1* en homocigosis (2 plantas) y en la generación T4 el doble mutante *ugt80A2xasat1-1* (3 plantas). En este último caso, en la figura 20 se muestra a modo de ejemplo el resultado del genotipado de 20 plantas T4 resistentes a sulfadiazina, donde se confirma que las 20 plantas presentan tanto el alelo *asat1-1* con el *ugt80A2* ambos en homocigosis. En todas las muestras se observa que se amplifica un fragmento de 439 pb correspondiente al alelo *ugt80A2*, mientras que en ningún caso se detecta amplificación del fragmento correspondiente al alelo wt (Figura 20A). En las mismas muestras se amplifica un fragmento de 900 pb correspondiente al alelo *asat1-1* (Figura 20B, panel superior) y en ningún caso se detecta el fragmento de 1000 pb correspondiente al alelo wild type (Figura 20B, panel inferior). En relación a los mutantes triples *ugt80A2B1xasat1-1*, se llegó a un punto donde se cuenta con plantas portadoras de los tres alelos mutantes en heterocigosis.

*ugt80A2xasat1-1*



**Figura 20. Genotipado por PCR de plantas del mutante *ugt80A2xasat1-1* (línea 6-1-1).** (A) PCR múltiple para identificar el alelo *ugt80A2*; la mezcla de reacción contiene los primers *ugtA2* for, *ugtA2* rev y *LBa1*. El fragmento de 439 pb corresponde al alelo mutante y el de 269 pb al alelo wild type. (B) La presencia del alelo *asat1-1* se comprobó con la amplificación de un fragmento de 900 pb empleando los primers *Pr5* y *o0874* (imágenes central e inferior derecha). La imagen superior muestra la ausencia del fragmento de 1000 pb correspondiente al alelo wild type que sí se observa en la imagen inferior izquierda empleando los primers *Pr5* y *Pr6*. Se incluyeron como controles de la PCR muestras de DNA genómico de una planta *wt* y de plantas mutantes simples *asat1-1* y *ugt80A2*. El número indicado en cada carril es el asignado a cada planta mutante. N, control negativo de amplificación sin DNA. MUT, alelo mutante; WT, alelo wild type.

En la tabla 2 se resume el número de líneas que se obtuvieron de cada cruce. Es importante mencionar que en paralelo con el trabajo descrito, se colaboró en la generación e identificación de una colección equivalente de dobles y triples mutantes portadores de los alelos *ugt80A2*, *ugt80B1* y *psat1-2*. Estos mutantes homocigotos se han obtenido de los cruces entre el mutante *psat1-2* y los mutantes *ugt80A2*, *ugt80B1* y *ugt80A2B1*.

**Tabla 2. Relación de mutantes dobles y triples de Arabidopsis con los genes ASAT, PSAT y SGT inactivados.**

Mutante	Zigosis
<i>ugt80A2xasat1-1</i>	Doble homocigoto
<i>ugt80B1xasat1-1</i>	Doble homocigoto
<i>ugt80A2B1xasat1-1</i>	Triple heterocigoto
<i>ugt80A2xpsat1-2</i>	Doble homocigoto
<i>ugt80B1xpsat1-2</i>	Doble homocigoto
<i>ugt80A2B1xpsat1-2</i>	Triple homocigoto

En conjunto, se dispone de una amplia colección de semillas de mutantes nulos dobles y triples de Arabidopsis afectados en la síntesis de esteroides conjugados. Los diferentes mutantes son viables y fértiles en condiciones de normales de crecimiento. Quedan a disposición del grupo para iniciar el estudio del perfilado metabólico que permitirá establecer el impacto de las diferentes combinaciones de alelos mutantes sobre los niveles de esteroides libres, glucosilados y esterificados.



## CAPÍTULO III

### 3.3. Efecto de las alteraciones en el metabolismo de esteroides esterificados sobre el crecimiento, desarrollo y respuesta a estrés de plantas de tomate con pérdida de función de *SIPSAT1* y *SIASAT1*

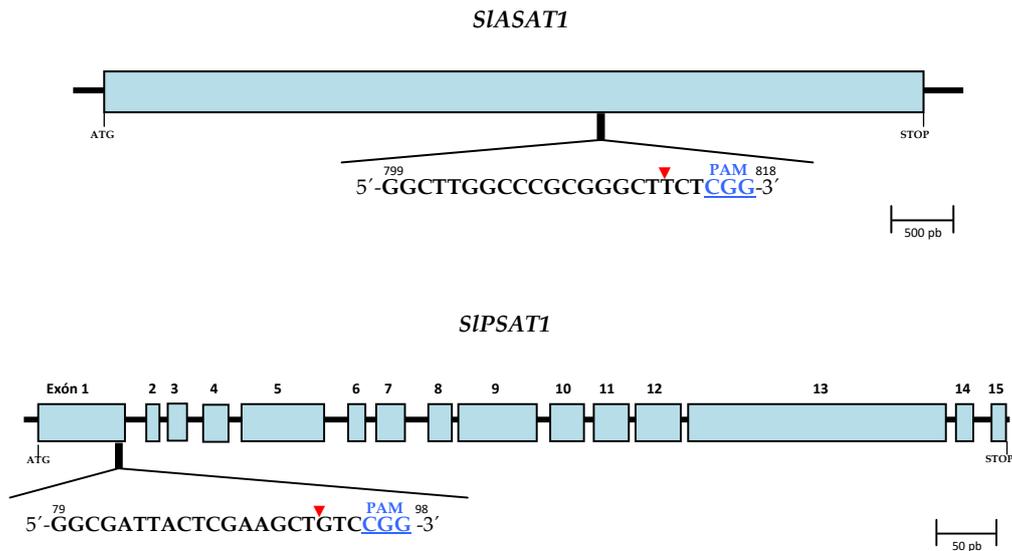
#### 3.3.1. Construcciones CRISPR/Cas y diseño de los RNA guía

Para estudiar la importancia del metabolismo de los SE en la planta de tomate, se generaron mutantes con los genes *SIASAT1* y *SIPSAT1* inactivados de forma independiente. Para ello, se construyeron dos vectores binarios para expresar la nucleasa Cas9 y RNAs guía (sgRNA) diseñados específicamente para inactivar los genes diana, como se explica en la sección 6.6.1. En ambos vectores el promotor U6-26 dirige la expresión del sgRNA y el promotor Ubi4-2 la de Cas9 (Figura 21).



**Figura 21. Representación esquemática del T-DNA de los vectores binarios CRISPR/Cas9 empleados para inactivar *SIASAT1* y *SIPSAT1*.** Pubi4-2: promotor del gen ubiquitina 4-2 de perejil; RuvCI y HNH: dominios de la endonucleasa Cas9; NLS: señal de localización nuclear; Term: señal de terminación de la transcripción; AtU6-26: promotor del gen *U6 snRNA-26* de Arabidopsis; sgRNA: secuencia que codifica el RNA guía; ntpII: gen que confiere resistencia a kanamicina; RB: borde derecho; LB: borde izquierdo.

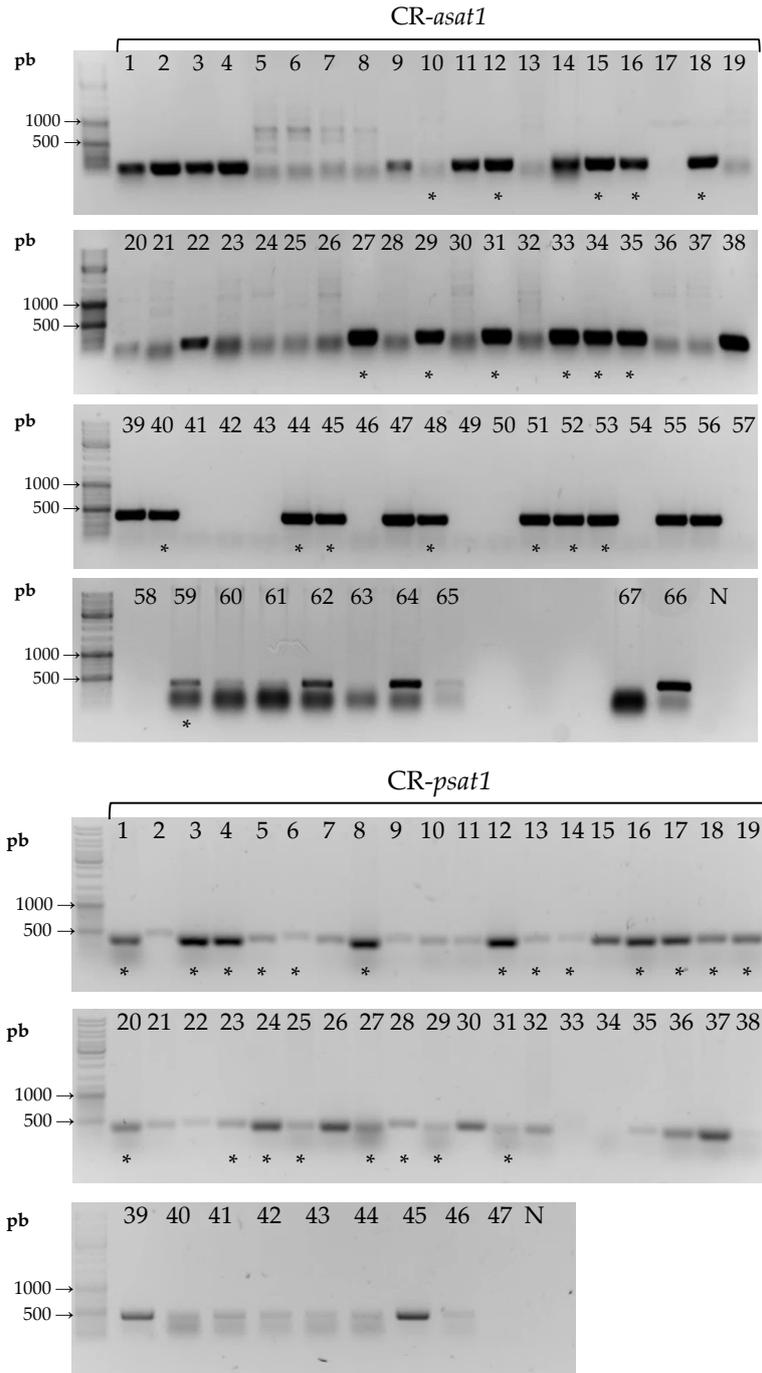
Para inactivar los genes *SIASAT1* y *SIPSAT1* se diseñaron dos RNA guía de 20 pb cada uno (Figura 22), conteniendo además la secuencia PAM. Se ha reportado que un sgRNA con una longitud de menos de 20 pb (excluyendo la secuencia PAM) tiene una alta capacidad para hibridar específicamente con su secuencia diana en el DNA genómico, conservando la eficiencia de edición del gen de interés con una baja probabilidad de causar efectos off-target (Fu et al., 2014). Las secuencias de los sgRNA se diseñaron usando el servidor web *Breaking-Cas* (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas/>) y los sgRNA usados en los experimentos de inactivación de *SIASAT1* y *SIPSAT1* se eligieron entre los diferentes candidatos atendiendo a los posibles efectos off-target (cero y uno, respectivamente). El sgRNA para la inactivación de *SIASAT1* tiene como diana la secuencia comprendida entre las posiciones 799 y 818 (posición de corte predicha, 812) en la secuencia codificante del gen que tal como se ha indicado anteriormente, no tiene intrones. El sgRNA para la inactivación de *SIPSAT1* tiene como diana la secuencia comprendida entre las posiciones 79 y 88 en el exón 1 del gen (posición de corte predicha, 82). Los dos vectores binarios obtenidos (pDE-Cas9 ASAT1 y pDE-Cas9 PSAT1) se usaron para transformar cotiledones de tomate.



**Figura 22. Secuencia y posición de los sgRNA empleados para inactivar los genes *SIASAT1* y *SIPSAT1*.** Debajo de cada uno de los genes se indica la secuencia del sgRNA y la posición en la secuencia codificante de *SIASAT1* y *SIPSAT1*. En ambos se incluye el motivo adyacente protospacer (PAM) marcado en azul y el sitio de corte predicho de la endonucleasa Cas9 que se indica con el símbolo ▼.

### 3.3.2. Obtención de transformantes primarios

Los vectores pDE-Cas9 ASAT1 y pDE-Cas9 PSAT1 portadores de sgRNA-*SIASAT1* y sgRNA-*SIPSAT1*, respectivamente, se utilizaron para transformar cotiledones de tomate cv. Micro-Tom siguiendo el protocolo puesto a punto por el Servicio de Invernaderos y Cultivo *in vitro* del CRAG. Tras el proceso de transformación, regeneración, y selección *in vitro* de transformantes primarios por su capacidad para crecer en el medio de cultivo suplementado con el antibiótico adecuado, se obtuvieron 67 plantas resistentes a kanamicina para la construcción pDE-Cas9 ASAT1 y 47 plantas para pDE-Cas9 PSAT1. Estas plantas se transfirieron al invernadero para su aclimatación y en ellas se analizó la presencia del correspondiente transgén mediante PCR. Para ello, se extrajo DNA genómico de hojas de cada una de las plantas regeneradas y, luego de comprobar la integridad del DNA mediante la amplificación de un fragmento del gen de la actina (Solyc03g078400), se amplificó un fragmento del promotor AtU6-26 (Figura 23) utilizando las parejas de primers indicadas en la tabla 17. Estos análisis permitieron identificar 37 plantas transgénicas CRISPR/Cas9-*asat1* (denominadas CR-*asat1*) entre las 67 plantas resistentes a kanamicina, y 43 plantas transgénicas CRISPR/Cas9-*psat1* (denominadas CR-*psat1*) entre las 47 plantas regeneradas inicialmente. De éstas, 19 de las 37 plantas CR-*asat1* y 21 de las 43 plantas CR-*psat1* produjeron frutos con semillas (indicadas con un asterisco en la Figura 23), por lo que solo en estas plantas se procedió a investigar la presencia de mutaciones en la secuencia de los genes diana, ya que la ausencia de semillas impedía continuar trabajando con las demás plantas aun en el caso de que presentasen mutaciones de interés en las secuencias diana.

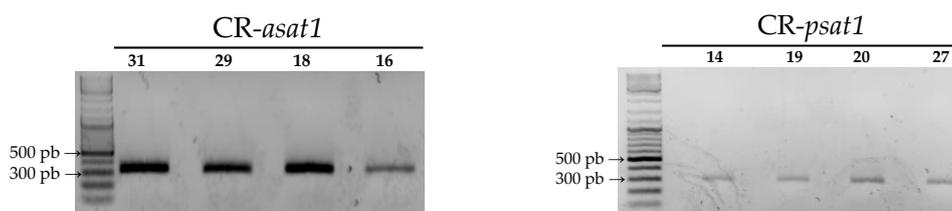


**Figura 23. Identificación de plantas transgénicas T0 CR-*asat1* y CR-*psat1*.** Se muestra la amplificación de un fragmento de 442 pb del promotor AtU6-26 para comprobar la presencia de la construcción CRISPR/Cas9 representada en la figura 21. El número indicado en cada carril hace referencia al asignado a cada planta. El asterisco (\*) indica las plantas seleccionadas para la posterior segregación. N, control negativo sin DNA genómico; CR-*asat1*, plantas transgénicas CRISPR/Cas9-*asat1*; CR-*psat1*, plantas transgénicas CRISPR/Cas9-*psat1*.

### 3.3.3. Detección y caracterización de las mutaciones inducidas por CRISPR/Cas9

Para detectar y caracterizar las mutaciones inducidas por CRISPR/Cas9 en las plantas CR-*asat1* y CR-*psat1* seleccionadas, se amplificó por PCR un fragmento del gen diana que incluye la región donde la endonucleasa Cas9 debería realizar el corte de las cadenas de DNA. Ello se realizó utilizando una polimerasa de alta fidelidad, como se indica en el apartado 6.4.2, con los primers descritos en la Tabla 18.

A partir del DNA genómico de las plantas CR-*asat1* y CR-*psat1* se obtuvieron fragmentos de 303 y 293 pb, respectivamente (Figura 24). Los productos de PCR se purificaron, se clonaron en el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy (apartado 6.4.4) y se secuenciaron los insertos de por lo menos 10 clones positivos procedentes del DNA genómico de cada línea transgénica. Los secuencias obtenidas se analizaron con el programa Serial Cloner versión 2.6.1 (Perez, 2004) alineándolas con las secuencias originales de los genes diana.



**Figura 24. Amplificación del fragmento que incluye la secuencia diana de la endonucleasa Cas9 en plantas transgénicas T0 CR-*asat1* y CR-*psat1*.** Se muestra la amplificación de los fragmentos de 303 y 293 pb a partir de DNA genómico de 4 plantas transgénicas representativas CR-*asat1* y CR-*psat1*, respectivamente, con las parejas de primers que flanquean la región diana en los sgRNA en genes *SIASAT1* y *SIPSAT1*. N, control negativo sin DNA genómico; CR-*asat1*, plantas transgénicas CRISPR/Cas9-*asat1*; CR-*psat1*, plantas transgénicas CRISPR/Cas9-*psat1*.

Los alineamientos revelaron que entre las 19 plantas T0 CR-*asat1* analizadas había 2 plantas con mutaciones en heterocigosis (inserción de 1 nucleótido y delección de 7 nucleótidos), 12 identificadas como quimeras, en las cuales se detectaron por lo menos dos tipos de mutación en cada una, siendo las más comunes la inserción y la delección de 1 nucleótido, y delecciones combinadas de 2 hasta 16 nucleótidos) y 5 plantas wild type.

Entre las 21 plantas T0 CR-*psat1* se encontraron 2 con mutaciones en heterocigosis (inserción de 1 nucleótido y delección de 4 nucleótidos), 4 quimeras, en las cuales se detectaron por lo menos dos tipos de mutación, incluyendo delecciones de 1, 3, 4 y 5 nucleótidos e inserciones de 1 nucleótido, y 14 plantas wild type. En conjunto, la tasa

de mutación para los genes diana *SIASAT1* y *SIPSAT1* fue de 73.7% y 33.3%, respectivamente (Tabla 3).

**Tabla 3.** Plantas transgénicas obtenidas en la transformación de cotiledones de tomate.

Gen de interés	Plantas regenerantes	Plantas analizadas	Tasa de mutación	Zigosis			WT
				Homocigoto	Heterocigoto	Quimera	
<i>SIASAT1</i>	67	19	73.7%	0	2	12	5
<i>SIPSAT1</i>	47	21	33.3%	0	2	5	14

Se seleccionaron las plantas CR-*asat1*: 15, 33, 34 y 35, y las plantas CR-*psat1*: 31, 16 y 28, para continuar con la segregación de las mutaciones generadas y obtener líneas homocigotas para ellas. Todas las plantas CR-*asat1* escogidas fueron clasificadas como quiméricas, mientras que las plantas CR-*psat1* elegidas incluían una línea en heterocigosis con una delección de cuatro nucleótidos, y 2 líneas quiméricas (

Figura 25). En todos los casos, las mutaciones inducidas por CRISPR/Cas9 alteran el marco de lectura de la secuencia codificante de los genes diana, generándose proteínas *SIASAT1* y *SIPSAT1* truncadas e inactivas.

En conjunto, el número de semillas producidas por las plantas CR-*asat1* y CR-*psat1* fue muy reducido y, además, presentaban una baja tasa de germinación. Finalmente, de las líneas CR-*asat1* 15, 33, 34 y 35 se obtuvieron 2, 13, 3 y 6 plantas viables, respectivamente. Y en el caso de las líneas CR-*psat1* 16, 28 y 31, se obtuvieron 1, 8 y 5 plantas viables, respectivamente. Cuando estas plantas (generación T1) habían desarrollado al menos dos pares de hojas verdaderas, se colectó un foliolo para extraer DNA genómico (apartado 6.6.4) y, una vez se confirmada la integridad del DNA con la amplificación de un fragmento del gen de la actina, se repitió el análisis de las mutaciones en los genes diana de la misma forma como se analizaron las de las plantas transgénicas de la generación T0.

**CRISPR/Cas9-*asat1***

PLANTA	772	sitio diana	PAM	856	In/Del	Frec.
CR- <i>asat1</i> 15		TTAGATATTATTCTAGCTATTGTTTCGGGCTTGGCCCGGGCTTCTCGGGCTTCAGCTAGAGCCACAGTTCAATGAACCGTATT			wt	2/11
		TTAGATATTATTCTAGCTATTGTTTCGGGCTTGGCCCGGGCTTCTCGGGCTTCAGCTAGAGCCACAGTTCAATGAACCGTATT			-5nt	1/11
		TTAGATATTATTCTAGCTATTGTTTCGGGCTTGGCCCGGGCTTCTCGGGCTTCAGCTAGAGCCACAGTTCAATGAACCGTATT			-1nt	7/11
		TTAGATATTATTCTAGCTATTGTTTCGGGCTTGGCCCGGGCTTCTCGGGCTTCAGCTAGAGCCACAGTTCAATGAACCGTATT			-2nt	1/11
CR- <i>asat1</i> 33		TTAGATATTATTCTAGCTATTGTTTCGGGCTTGGCCCGGGCTTCTCGGGCTTCAGCTAGAGCCACAGTTCAATGAACCGTATT			wt	8/12
		TTAGATATTATTCTAGCTATTGTTTCGGGCTTGGCCCGGGCTTCTCGGGCTTCAGCTAGAGCCACAGTTCAATGAACCGTATT			-10nt	1/12
		TTAGATATTATTCTAGCTATTGTTTCGGGCTTGGCCCGGGCTTCTCGGGCTTCAGCTAGAGCCACAGTTCAATGAACCGTATT			-7nt	1/12
		TTAGATATTATTCTAGCTATTGTTTCGGGCTTGGCCCGGGCTTCTCGGGCTTCAGCTAGAGCCACAGTTCAATGAACCGTATT			+1nt	1/12
CR- <i>asat1</i> 34		TTAGATATTATTCTAGCTATTGTTTCGGGCTTGGCCCGGGCTTCTCGGGCTTCAGCTAGAGCCACAGTTCAATGAACCGTATT			wt	1/12
		TTAGATATTATTCTAGCTATTGTTTCGGGCTTGGCCCGGGCTTCTCGGGCTTCAGCTAGAGCCACAGTTCAATGAACCGTATT			-16nt	1/12
		TTAGATATTATTCTAGCTATTGTTTCGGGCTTGGCCCGGGCTTCTCGGGCTTCAGCTAGAGCCACAGTTCAATGAACCGTATT			-1nt	4/12
		TTAGATATTATTCTAGCTATTGTTTCGGGCTTGGCCCGGGCTTCTCGGGCTTCAGCTAGAGCCACAGTTCAATGAACCGTATT			-9nt	1/12
		TTAGATATTATTCTAGCTATTGTTTCGGGCTTGGCCCGGGCTTCTCGGGCTTCAGCTAGAGCCACAGTTCAATGAACCGTATT			-3nt	1/12
		TTAGATATTATTCTAGCTATTGTTTCGGGCTTGGCCCGGGCTTCTCGGGCTTCAGCTAGAGCCACAGTTCAATGAACCGTATT			-4nt	1/12
CR- <i>asat1</i> 35		TTAGATATTATTCTAGCTATTGTTTCGGGCTTGGCCCGGGCTTCTCGGGCTTCAGCTAGAGCCACAGTTCAATGAACCGTATT			wt	1/12
		TTAGATATTATTCTAGCTATTGTTTCGGGCTTGGCCCGGGCTTCTCGGGCTTCAGCTAGAGCCACAGTTCAATGAACCGTATT			+1nt	2/12
		TTAGATATTATTCTAGCTATTGTTTCGGGCTTGGCCCGGGCTTCTCGGGCTTCAGCTAGAGCCACAGTTCAATGAACCGTATT			-16nt	4/12
		TTAGATATTATTCTAGCTATTGTTTCGGGCTTGGCCCGGGCTTCTCGGGCTTCAGCTAGAGCCACAGTTCAATGAACCGTATT			-1nt	3/12
		TTAGATATTATTCTAGCTATTGTTTCGGGCTTGGCCCGGGCTTCTCGGGCTTCAGCTAGAGCCACAGTTCAATGAACCGTATT			-3nt	1/12
	TTAGATATTATTCTAGCTATTGTTTCGGGCTTGGCCCGGGCTTCTCGGGCTTCAGCTAGAGCCACAGTTCAATGAACCGTATT			-1nt	1/12	

**CRISPR/Cas9-*psat1***

PLANTA	167	sitio diana	PAM	250	In/Del	Frec.
CR- <i>psat1</i> 31		CGGTAACCTTGGCGGTGAGTTCGCCGGCGATTACTCGAAGCTGTC		CGGAATTATTATCCAGGATTTCGGTCTACACAACCTG	wt	5/12
		CGGTAACCTTGGCGGTGAGTTCGCCGGCGATTACTCGAAGCTGTC		CGGAATTATTATCCAGGATTTCGGTCTACACAACCTG	-4nt	7/12
CR- <i>psat1</i> 16		CGGTAACCTTGGCGGTGAGTTCGCCGGCGATTACTCGAAGCTGTC		CGGAATTATTATCCAGGATTTCGGTCTACACAACCTG	wt	7/12
		CGGTAACCTTGGCGGTGAGTTCGCCGGCGATTACTCGAAGCTGTC		CGGAATTATTATCCAGGATTTCGGTCTACACAACCTG	-1nt	1/12
CR- <i>psat1</i> 28		CGGTAACCTTGGCGGTGAGTTCGCCGGCGATTACTCGAAGCTGTC		CGGAATTATTATCCAGGATTTCGGTCTACACAACCTG	+1nt	2/12
		CGGTAACCTTGGCGGTGAGTTCGCCGGCGATTACTCGAAGCTGTC		CGGAATTATTATCCAGGATTTCGGTCTACACAACCTG	wt	7/12
		CGGTAACCTTGGCGGTGAGTTCGCCGGCGATTACTCGAAGCTGTC		CGGAATTATTATCCAGGATTTCGGTCTACACAACCTG	-4nt	1/12

**Figura 25. Mutaciones inducidas en la primera generación de plantas CR-*asat1* y CR-*psat1*.** Se muestran las regiones de los genes *SIASAT1* y *SIPSAT1* de las líneas transgénicas indicadas en la columna de la izquierda que incluyen las secuencias diana (azul) de los correspondientes sgRNA. En cada caso, en la parte superior se muestra la correspondiente secuencia wild type. El motivo adyacente protospacer (PAM) esta resaltado en negrita. Las inserciones en el sitio diana se muestran con el nucleótido sombreado en amarillo y las deleciones se indican con sombreado verde claro. En la columna de la derecha se indica el tipo de mutación (In/Del: inserción/delección) y el número de nucleótidos eliminados o insertados en cada caso.

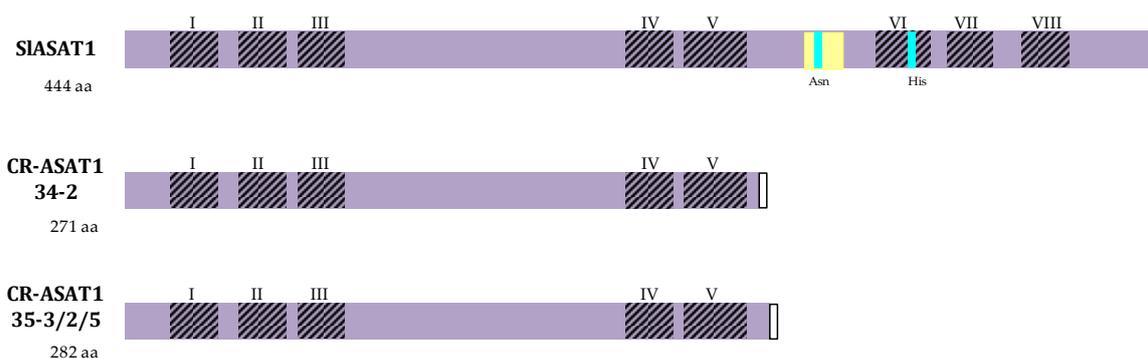


Tabla 4. Segregación de las mutaciones inducidas por CRISPR/Cas9 en el gen diana *SIASAT1*.

Generación T0				Generación T1			
Planta	Zigosis	Genotipo	Cas9	Planta	Zigosis	Genotipo	Cas9
15	Quimera	7d1, 1d2, 1d5, 2wt	+	15-1	Homocigoto	10i1	+
				15-2	Homocigoto	10d1	+
33	Quimera	2i1, 1d7, 1d10, 8wt	+	33-1	WT	wt	+
				33-2	WT	wt	-
				33-3	Quimera	1i3, 1d1, 6wt	+
				33-4	WT	wt	+
				33-5	WT	wt	-
				33-6	Quimera	1i1, i12, 1d2, d13, 1d22, 5wt	+
				33-7	Quimera	2i1, 1d16, 1d22, 6wt	+
				33-8	Quimera	1d5, 1d10, 7wt	+
				33-9	WT	wt	-
				33-10	WT	wt	+
				33-11	WT	wt	-
				33-12	WT	wt	-
				33-13	WT	wt	-
34	Quimera	1i1, 6d1, 1d16, 1d9, 1d3, 1d4, 1wt	+	34-1	Heterocigoto	4i1, 6d16	+
				34-2	Homocigoto	10d16	+
				34-3	Heterocigoto	2d1, 8d16	+
35	Quimera	2i1, 1d3, 4d1, 4d16, 1wt	+	35-1	Quimera	5i1, 5d9	+
				35-2	Homocigoto	10i1	+
				35-3	Homocigoto	10i1	+
				35-4	Quimera	5i1, d21, 2d9	+
				35-5	Homocigoto	9i1	+
				35-6	Homocigoto	9d9	-

La columna Cas9 indica la presencia (+) o ausencia (-) de un fragmento del vector CRISPR/Cas9, detectado por PCR con la amplificación de un fragmento del promotor AtU6-26. En la columna genotipo se indica el número de fragmentos de *SIASAT1* clonados y secuenciados, así como el tipo de mutación detectada: d#, número de nucleótidos delecionados en la secuencia diana; i#, número de nucleótidos insertados en la secuencia diana; wt, ausencia de cambios.

Las mutaciones inducidas por CRISPR/Cas9 en las plantas *CR-asat1* 34-2 y *CR-asat1* 35-2/3/5 provocan la pérdida de tres de las 8 secuencias de transmembrana (I-VIII) predichas en *SIASAT1* y de dos aminoácidos (Asn e His) que se consideran esenciales para la catálisis enzimática, uno de los cuales (Asn) forma parte del motivo de unión al sustrato Acil-CoA, mientras que el segundo (His) está localizado en el dominio de transmembrana VI. Las versiones truncadas de la *SIASAT1* incluyen, respectivamente, 5 y 10 aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal que no están presentes en la proteína nativa y son debidos a los cambios que se producen en el marco de lectura como consecuencia de las mutaciones introducidas (Figura 27).



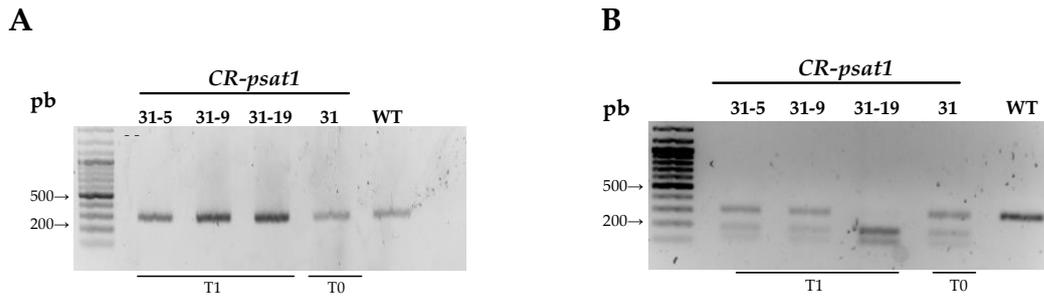
**Figura 27. Representación esquemática de la proteína SIASAT1 nativa y las proteínas SIASAT1 truncadas en las plantas CR-*asat1* 34-2 y CR-*asat1* 35-2/3/5.** Las secuencias de transmembrana predichas se muestran en recuadros con trama. En color azul se indica la ubicación de los aminoácidos implicados en la catálisis (Asn e His) que se localizan en la secuencia de unión al sustrato Acil-CoA (sombreada en amarillo) y en el dominio transmembrana VI, respectivamente. Los recuadros en blanco representan los aminoácidos adicionales incorporados al extremo C-terminal como consecuencia del salto de marco de lectura causado por las mutaciones introducidas en la secuencia de *SIASAT1*.

### 3.3.3.2. Obtención de líneas mutantes CR-*psat1* homocigóticas

Al analizar la secuencia mutada en la planta CR-*psat1* 31 se detectó una deleción de 4 nucleótidos que da lugar a la aparición de una diana de restricción única para la enzima *XhoI* (C<sup>^</sup>TCGAG) en el fragmento amplificado en el genotipado. Es por esto que la presencia de la deleción en la descendencia de la línea 31 se analizó por RFLP (por sus siglas en inglés, “Restriction Fragment Length Polymorphism”), mediante la digestión de los productos de PCR con dicha enzima.

El fragmento amplificado que abarca la región diana del gen *SIPSAT1* en las plantas CR-*psat1* 31 es de 293 pb (Figura 28A) y el sitio de restricción *XhoI* generado por la mutación inducida por CRISPR/Cas9 se encuentra aproximadamente a la mitad del fragmento, por lo que después de la digestión con *XhoI* se generarían dos fragmentos de 174 y 118 pb. Por lo tanto, la obtención de un único fragmento de 293 pb después de la digestión con *XhoI* indicaría una planta wild type, mientras que la aparición de los fragmentos de 174 pb y 118 pb indicaría que la planta de origen contiene la secuencia mutada en homocigosis. Si tras la digestión enzimática se obtienen los 3 fragmentos (293, 174 y 118 pb), se trataría de una planta portadora de la mutación en heterocigosis.

A partir del resultado del análisis por RFPL (Figura 28B) se infiere que las plantas 31-5 y 31-9 son heterocigotas para la mutación, al igual que la planta 31 de la que descienden, mientras que la planta 31-19 es homocigota.



**Figura 28. Genotipado por RFLP de plantas transgénicas *CR-psat1*.** (A) Se muestra el fragmento de 293 pb amplificado a partir de DNA genómico de las plantas de las generaciones T0 y T1 indicadas en la parte superior, usando una pareja de primers que flanquea la región diana en el gen *SIPSAT1*. (B) Análisis RFLP con la enzima de restricción *XhoI* de los productos de PCR mostrados en las imágenes A y B. N, control negativo de amplificación sin DNA. WT, wild type.

**Tabla 5. Segregación de mutaciones inducidas por CRISPR/Cas9 en el gen diana *SIPSAT1*.**

Generación T0				Generación T1							
Planta	Zigosis	Genotipo <sup>‡</sup>	Cas9	Planta	Zigosis	Genotipo <sup>‡</sup>	Cas9				
28	Quimera	2i1, 1d4, 7wt	+	28-1	WT	wt	-				
				28-2	Heterocigoto	1i1, 2d7, 7wt	+				
				28-3	Heterocigoto	5i1, 1d2, 3wt	+				
				28-4	WT	wt	-				
				28-5	WT	wt	-				
				28-6	WT	wt	-				
				28-8	Heterocigoto	1d4, 1d5, 7wt	+				
				28-11	WT	wt	+				
				31	Heterocigoto	7d4, 5wt	+	31-1	Heterocigoto	d4, wt	+
								31-2	Heterocigoto	d4, wt	+
								31-5	Heterocigoto	d4, wt	+
31-9	Heterocigoto	d4, wt	+								
31-19	Homocigoto	d4	+								

La columna Cas9 indica la presencia (+) o ausencia (-) de un fragmento del vector CRISPR/Cas9, detectado por PCR con la amplificación de un fragmento del promotor AtU6-26. En la columna genotipo se indica el número de clones secuenciados, así como el tipo de mutación detectada: d#, número de nucleótidos delecionados en la secuencia diana; i#, número de nucleótidos insertados en la secuencia diana; wt, ausencia de cambios.

Hasta este punto solo se había encontrado una línea homocigota *CR-psat1* (línea 31-9), por lo que se consideró conveniente identificar alguna otra línea con mutaciones que produjeran la inactivación de *SIPSAT1*. Para ello, se analizó la descendencia de la planta *CR-psat1* 28 (generación T1) empleando la estrategia descrita basada en amplificar, clonar y secuenciar un mínimo de 10 fragmentos obtenidos por PCR. Los resultados se muestran en la tabla 5, observándose que en la generación T1 solo se encontraron algunas plantas en heterocigosis. A pesar de ello, se consideró necesario obtener y analizar la descendencia (generación T2) de la planta 28-3. Se obtuvieron un

total de 15 plantas y para determinar el tipo de mutación en cada planta, se amplificaron las regiones diana como anteriormente se ha explicado. Sin embargo, en este caso los productos de PCR obtenidos se secuenciaron directamente sin clonarlos previamente en pGEM®-T Easy. Para analizar los datos de secuencia se utilizó la herramienta bioinformática TIDE “Tracking of Indels by DEcomposition” (Brinkman et al., 2014). Este programa analiza por descomposición la secuencia editada por CRISPR/Cas9 y proporciona una estimación de las frecuencias de las inserciones y deleciones presentes en los amplicones de PCR que abarcan los sitios diana del sgRNA. En la tabla 6, se muestran los resultados del genotipado de las plantas CR-*psat1* 28-3 de la generación T2 con el tipo predominante de indel en cada caso.

**Tabla 6. Cuantificación (%) de las frecuencias de aparición de InDels en la región diana de las plantas descendientes de la planta 28-3 empleando la herramienta TIDE.**

Generación T2		
Planta	Zigosis	Frecuencias Indel
28-3-1	Heterocigoto	i1 43.9%, wt 45.3%
28-3-2	Homocigoto	i1 93.6%
28-3-3	WT	wt
28-3-4	Quimera	i1 46.9%, d3 33.7%, wt 10.4%
28-3-5	Quimera	d1 25%, i1 4.2%, wt 62%
28-3-6	Bialélico	d1 51.4%, i1 42.9%
28-3-7	Quimera	i1 59.6%, i2 1.7%, d1 16.9%, wt 14.1%
28-3-8	Heterocigoto	i1 48.2%, wt 45.3%
28-3-9	Quimera	i1 47.9%, d3 3.7%, wt 42.9%
28-3-10	WT	wt 86.2%
28-3-11	Quimera	i1 43.4%, d3 13.8%, wt 35.9%
28-3-12	Quimera	i1 3.5%, d1 2.3%, d2 3.9%, d3 46.1%, d4 3.9, wt 33.6%
28-3-13	Quimera	d4 26.6%, d3 3.3%, d1 3.5%, wt 50.9%
28-3-15	Heterocigoto	d1 49.6%, wt 31.9%

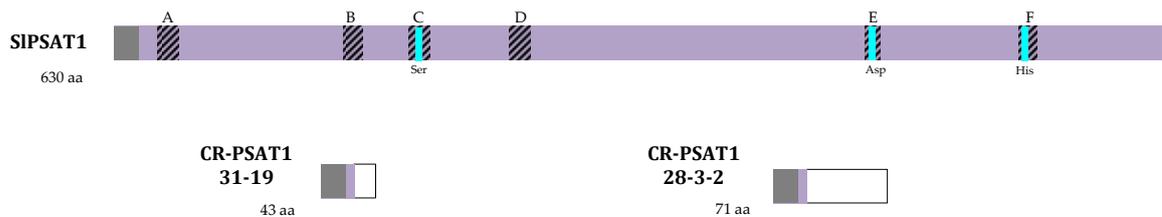
d#, número de nucleótidos delecionados en la secuencia diana; i#, número de nucleótidos insertados en la secuencia diana; wt, ausencia de cambios.

Entre las 15 plantas CR-*psat1* analizadas por TIDE se identificaron 7 plantas quiméricas, 1 bialélica, una homocigota, tres heterocigotas y dos wild type. De este modo, fue posible identificar una nueva planta homocigota (28-3-2) que contiene en la secuencia diana una inserción de un nucleótido. En la figura 29 se muestran las mutaciones encontradas en las dos líneas CR-*psat1* homocigotas generadas. Ambas mutaciones alteran el marco de lectura de la secuencia que codifica SIPSAT1 dando lugar a proteínas truncadas e inactivas. SIPSAT1 es una proteína que consta de 630 aminoácidos con 6 regiones conservadas y la triada catalítica Ser-Asp-His (Figura 30). Debido a la deleción de 4 nucleótidos en la línea CR-*psat1* 31-19 se produce una proteína inactiva de tan solo 43 aminoácidos, mientras que la inserción de un nucleótido en el sitio diana en la línea CR-*psat1* 28-3-2 da lugar a una proteína truncada de 71 aminoácidos. Las versiones truncadas de SIPSAT1 incluyen, respectivamente, 13

y 39 aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal que no están presentes en la proteína nativa (Figura 30) y son consecuencia de los cambios que se producen en el marco de lectura a causa de las mutaciones introducidas.

PLANTA	167	<u>sitio diana</u>	PAM	250	In/Del
WT	CGGTAACCTTGGCCGGTGAGTTCGCCGGCGGATTACTCGAAGCT-GTCCGGAATTATTATCCCAGGATTGCGGTCTACACAACCTG				/
CR- <i>psat1</i> 31-19	CGGTAACCTTGGCCGGTGAGTTCGCCGGCGGATTACTCGA-----GTCCGGAATTATTATCCCAGGATTGCGGTCTACACAACCTG				- 4nt
CR- <i>psat1</i> 28-3-2	CGGTAACCTTGGCCGGTGAGTTCGCCGGCGGATTACTCGAAGCT <b>T</b> GTCCGGAATTATTATCCCAGGATTGCGGTCTACACAACCTG				+1nt

**Figura 29. Mutaciones inducidas en las líneas homocigotas CR-*psat1*.** Alineamiento de las secuencias *SIPSAT1* mutadas de las líneas 31-19 y 28-3-2 con la secuencia equivalente del gen wild type *SIPSAT1*. El motivo adyacente protospacer (PAM) está resaltado en negrita y la secuencia diana del sgRNA se indica en azul. La inserción de una T en la línea 28-3-2 se muestra en negrita y los guiones azules representan los nucleótidos delecionados en la línea 31-19.



**Figura 30. Representación esquemática de las proteínas SIPSAT1 nativa y SIPSAT1 truncadas en las plantas CR-*psat1* 28-3-2 y CR-*psat1* 31-19.** Las secuencias conservadas se muestran en recuadros con trama. En color azul se indica la ubicación de los aminoácidos que forman la triada catalítica (Ser-Asp-His) que se localizan en las secuencias conservadas C, E y F, respectivamente. El recuadro en color gris representa el péptido señal (Lara et al., 2018) y los recuadros blancos representan los aminoácidos adicionales incorporados al extremo C-terminal como consecuencia del salto de marco de lectura causado por las mutaciones introducidas en la secuencia de *SIPSAT1*.

A partir de los resultados anteriores, se continuó trabajando con las plantas de las líneas CR-*psat1* 34-2 y 35-3, y CR-*psat1* 28-3-2 y 31-19 para proceder a su caracterización.

### 3.3.4. Perfil de esteroides en los mutantes de tomate con pérdida de función SIPSAT1 y SIASAT1

#### 3.3.4.1. Contenido de esteroides en semillas

Una vez obtenidas las líneas transgénicas de tomate con las enzimas SIASAT1 y SIPSAT1 inactivadas, se procedió a investigar el efecto de la pérdida de función de estas enzimas sobre el contenido de esteroides libres y conjugados, entre los que se incluyen los ésteres de esteroides. En primer lugar se analizó la composición de esteroides en semillas, puesto que los esteroides esterificados se acumulan en gran cantidad en este órgano (Dyas & Goad, 1993).

El contenido de esteroides en las líneas CR-*asat1* y CR-*psat1* se cuantificó a partir de extractos de semillas como se explica en el apartado 6.10. Los resultados de estos análisis se muestran en las figuras 30, 31 y 32, y la tabla 7. El contenido de esteroides esterificados en las semillas de las dos líneas CR-*asat1* se mantiene en niveles bastante similares a los de las semillas wild type, igual que ocurre con los de esteroides libres (Figura 31). Aunque de forma inesperada se observa un incremento muy acusado del contenido de cicloartenol esterificado de 3,5 y 2,0 veces en las líneas 34-2 y 35-3, respectivamente (Figura 33). En cuanto a las fracciones glucosiladas, la pérdida de función SIASAT1 provoca una reducción del orden del 35% en el contenido de SG de ambas líneas. Mientras que el efecto sobre los ASG es más inconsistente ya que en una de las dos líneas (34-2) disminuyen alrededor de un 30% y en la otra (35-3) aumentan un 45% respecto a las semillas wild type (Figura 31). Considerando las cuatro fracciones en conjunto, no se aprecian diferencias significativas en el contenido total de esteroides entre las líneas CR-*asat1* y las wild type (Figura 32 y tabla 7).

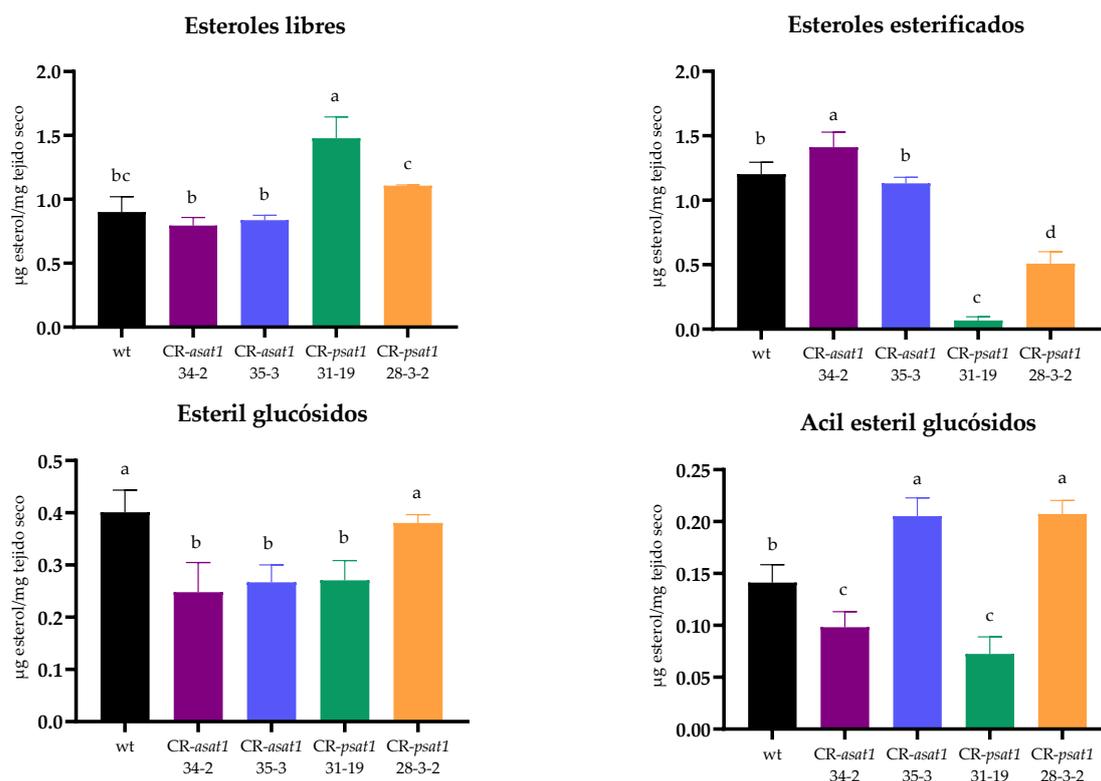
En las líneas CR-*psat1*, la pérdida de función SIPSAT1 provoca una reducción muy marcada del contenido de esteroides esterificados, que llega a ser del 93% en la línea 31-19 y del 44% en la línea 28-3-2 (Figura 31). Esta reducción afecta no solo a los ésteres de los esteroides mayoritarios sino también a los del intermediario cicloartenol, que en la línea 31-19 es indetectable (Figura 33). Además, se traduce en un aumento de los niveles de esteroides libres que muestra una correlación inversamente proporcional con la reducción de los esteroides esterificados, ya que cuanto más bajos son los niveles de esteroides esterificados, más elevados son los de esteroides libres (Figura 31). De nuevo se observa un efecto sobre los niveles de esteroides glucosilados, con una reducción moderada de los SG que se correlaciona de forma directa con los de SE. Mientras que de nuevo, el impacto de la pérdida de la capacidad para esterificar esteroides tiene un efecto variable sobre los niveles de ASG, que en la línea 31-19 se reducen respecto a las semillas wt y en la línea 28-3-2 aumentan (Figura 31). Finalmente, la drástica reducción del nivel de SE se traduce en una disminución del contenido total de esteroides totales (Tabla 7 y Figura 32). En la tabla 15 en el anexo, se muestran los niveles de los distintos

esteroles cuantificados en las cuatro fracciones de los extractos de las semillas de las distintas plantas.

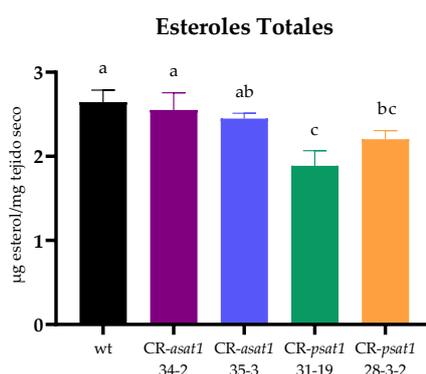
**Tabla 7. Contenido de esteroles mayoritarios libres y conjugados en semillas de los mutantes CR-*asat1* y CR-*psat1* de tomate.**

	FS	SE	SG	ASG	Suma de las 4 fracciones
<b>Wild type</b>	<b>0,901<sup>bc</sup> ± 0,147</b>	<b>1,202<sup>b</sup> ± 0,114</b>	<b>0,401<sup>a</sup> ± 0,052</b>	<b>0,141<sup>b</sup> ± 0,021</b>	<b>2,646<sup>a</sup> ± 0,175</b>
<b>CR-<i>asat1</i> 34-2</b>	<b>0,795<sup>b</sup> ± 0,064</b>	<b>1,411<sup>a</sup> ± 0,117</b>	<b>0,248<sup>b</sup> ± 0,057</b>	<b>0,098<sup>c</sup> ± 0,015</b>	<b>2,552<sup>a</sup> ± 0,204</b>
<b>CR-<i>asat1</i> 35-3</b>	<b>0,837<sup>b</sup> ± 0,047</b>	<b>1,140<sup>b</sup> ± 0,053</b>	<b>0,267<sup>b</sup> ± 0,041</b>	<b>0,205<sup>a</sup> ± 0,022</b>	<b>2,449<sup>ab</sup> ± 0,076</b>
<b>CR-<i>psat1</i> 31-19</b>	<b>1,479<sup>a</sup> ± 0,166</b>	<b>0,067<sup>c</sup> ± 0,030</b>	<b>0,271<sup>b</sup> ± 0,038</b>	<b>0,073<sup>c</sup> ± 0,017</b>	<b>1,888<sup>c</sup> ± 0,180</b>
<b>CR-<i>psat1</i> 28-3-2</b>	<b>1,107<sup>c</sup> ± 0,007</b>	<b>0,509<sup>d</sup> ± 0,112</b>	<b>0,381<sup>a</sup> ± 0,019</b>	<b>0,207<sup>a</sup> ± 0,016</b>	<b>2,204<sup>bc</sup> ± 0,126</b>

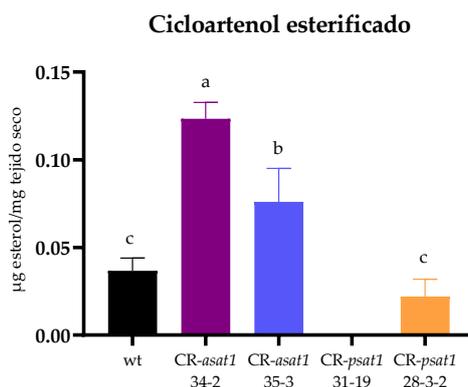
El contenido de esteroles se expresa en  $\mu\text{g}$  esterol/mg tejido seco como la media con desviación estándar ( $n=4$ ). Para realizar no solo la comparación contra el wt sino también entre los mutantes, se efectuó un análisis estadístico por ANOVA de una vía (\*\* $P < 0,001$ ) seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Los resultados de cada análisis de comparación se expresan mediante superíndices (a, b, c) sobre cada columna. Cuando los valores del contenido de esteroles son significativamente diferentes, no comparten un determinado superíndice. Los análisis estadísticos de los datos mostrados se realizaron usando el programa GraphPad Prism version 8.2.1 (GraphPad Software, San Diego, California EUA.)



**Figura 31. Contenido de esteroles mayoritarios libres y conjugados en semillas de tomate wild type, CR-*asat1* y CR-*psat1*.** El contenido de esteroles libres y conjugados es representado por la suma de colesterol, campesterol, estigmasterol y sitosterol. Los resultados se expresan como la media de las réplicas (n=4) con la desviación estándar. Para realizar no solo la comparación contra el wt sino también entre los mutantes, se efectuó un análisis estadístico por ANOVA de una vía (\*\*P<0,001) seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). En cada gráfica, los resultados de cada análisis de comparación se expresan mediante letras en minúscula (a, b, c, d) sobre cada columna, cuando los valores del contenido de esteroles son significativamente diferentes, no comparten una determinada letra.



**Figura 32. Contenido total de esteroles en semillas de tomate wild type, CR-*asat1* y CR-*psat1*.** El contenido de esteroles es representado por la suma de colesterol, campesterol, estigmasterol y sitosterol en su forma libre y conjugada. Los resultados se expresan como la media de las réplicas (n=4) con la desviación estándar. Para realizar no solo la comparación contra el wt sino también entre los mutantes, se efectuó un análisis estadístico por ANOVA de una vía (\*\*P<0,001) seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). En la gráfica, los resultados de cada análisis de comparación se expresan mediante letras en minúscula (a, b, c) sobre cada columna, cuando los valores del contenido de esteroles son significativamente diferentes, no comparten una determinada letra.



**Figura 33. Contenido de cicloartenol esterificado en semillas de tomate wild type, CR-*asat1* y CR-*psat1*.** Los resultados se expresan como la media de las réplicas (n=4) con la desviación estándar. Para realizar no solo la comparación contra el wt sino también entre los mutantes, se efectuó un análisis estadístico por ANOVA de una vía (\*\*P<0,001) seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). En la gráfica, los resultados de cada análisis de comparación se expresan mediante letras en minúscula (a, b, c) sobre cada columna, cuando los valores del contenido de esteroides son significativamente diferentes, no comparten una determinada letra.

### 3.3.4.2. Contenido de esteroides en hojas

De la misma forma que se analizaron los esteroides en semillas de las líneas mutantes CR-*asat1* y CR-*psat1*, se cuantificaron los esteroides libres y conjugados en hojas de las plantas adultas (cuarta y quinta hojas de plantas de 8 semanas). Los resultados de estos análisis se muestran en las figuras 33, 34 y 35 y la tabla 8. A diferencia de lo observado en semillas, la inactivación del gen *SIASAT1* produce un aumento del contenido total de esteroides esterificados de 4,5 (línea 35-3) y 5 (línea 34-2) veces con respecto a las hojas wild type (Figura 34). Esto es reflejo de un incremento generalizado de los ésteres de los cuatro esteroides mayoritarios y también de los niveles de cicloartenol esterificado (Tabla 2S), que como se aprecia en la figura 36, en las líneas 34-2 y 35-3 se encuentran aumentados 3 y 5 veces, respectivamente, en comparación al wild type. El contenido de esteroides libres mayoritarios comparado con el contenido del wild type se encuentra también aumentado de forma significativa en ambas líneas 1,6 y 1,2 veces, respectivamente, mientras que los niveles de SG y ASG no se alteran de manera significativa (Figura 34).

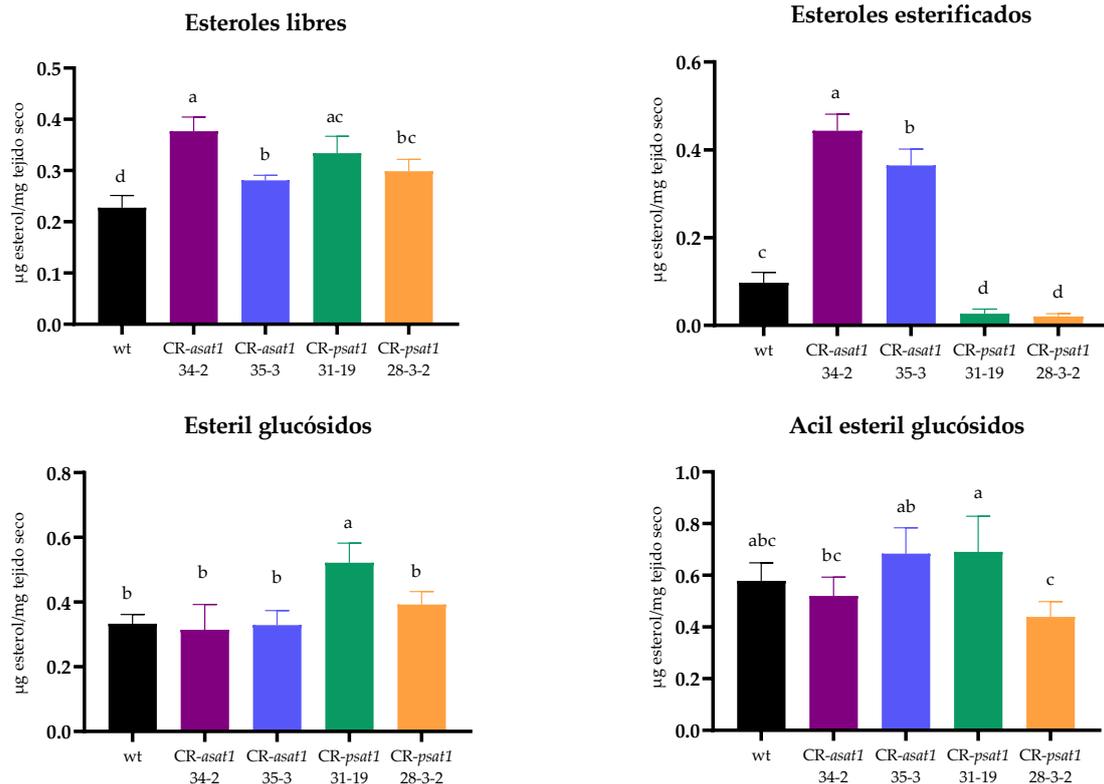
Caso contrario se observa en los mutantes CR-*psat1*, donde los SE mayoritarios son apenas detectables. La fracción de SE en las líneas mutantes 31-19 y 28-3-3 está representada solamente por ésteres de colesterol, sitosterol y cicloartenol, cuyos niveles se ven drásticamente reducidos (tabla 2S en el anexo y Figura 34). El nivel de SG y ASG en hojas no está afectado de gran manera. Se observa una tendencia al incremento de los niveles de SG, que únicamente es significativo en la línea 31-19, y una vez más las alteraciones en los niveles de ASG son inconsistentes aunque no significativas (Figura 34). En conjunto, la drástica reducción del contenido de SE no tiene el mismo efecto sobre el contenido total de esteroides, que se mantiene en niveles similares a las hojas

wild type (28-3-2) o incluso aumenta (31-19) (Figura 35). Ello se debe a que en las hojas el contenido de SE representa algo menos del 10% del contenido total de esteroides (Tabla 8), en contraste con las semillas en las que se aproxima al 50% (Tabla 7). En la tabla 2S en el anexo, se muestran los niveles de los distintos esteroides cuantificados en las cuatro fracciones de los extractos de las hojas de las distintas plantas.

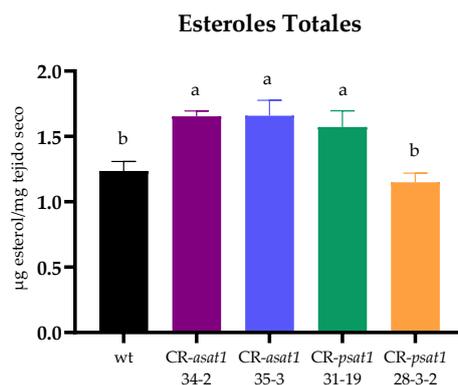
**Tabla 8. Contenido de esteroides mayoritarios libres y conjugados en hoja de los mutantes CR-*asat1* y CR-*psat1* de tomate.**

	FS	SE	SG	ASG	Suma de las 4 fracciones
Wild type	0,228 <sup>d</sup> ±0,024	0,097 <sup>c</sup> ±0,024	0,333 <sup>b</sup> ±0,028	0,578 <sup>abc</sup> ±0,070	1,236 <sup>b</sup> ± 0,073
CR- <i>asat1</i> 34-2	0,377 <sup>a</sup> ±0,028	0,443 <sup>a</sup> ±0,038	0,314 <sup>b</sup> ±0,079	0,520 <sup>bc</sup> ±0,073	1,654 <sup>a</sup> ± 0,040
CR- <i>asat1</i> 35-3	0,281 <sup>b</sup> ±0,010	0,365 <sup>b</sup> ±0,037	0,329 <sup>b</sup> ±0,045	0,684 <sup>ab</sup> ±0,100	1,658 <sup>a</sup> ± 0,119
CR- <i>psat1</i> 31-19	0,334 <sup>ac</sup> ±0,033	0,027 <sup>d</sup> ± 0,011	0,522 <sup>a</sup> ±0,060	0,690 <sup>a</sup> ± 0,138	1,572 <sup>a</sup> ± 0,123
CR- <i>psat1</i> 28-3-2	0,298 <sup>bc</sup> ±0,024	0,020 <sup>d</sup> ± 0,006	0,314 <sup>b</sup> ±0,079	0,439 <sup>c</sup> ± 0,059	1,150 <sup>b</sup> ± 0,069

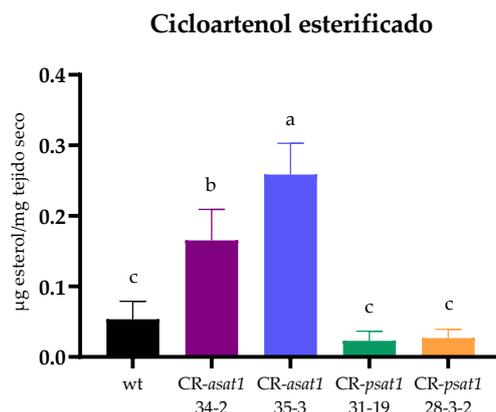
El contenido de esteroides se expresa en µg esteroide/mg tejido seco como la media con desviación estándar (n=4). Para realizar no solo la comparación contra el wt sino también entre los mutantes, se efectuó un análisis estadístico por ANOVA de una vía (\*\*P<0,001) seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Los resultados de cada análisis de comparación se expresan mediante letras en minúscula (a, b, c, d) sobre cada columna. Cuando los valores del contenido de esteroides son significativamente diferentes, no comparten una determinada letra. Los análisis estadísticos de los datos mostrados se realizaron usando el programa GraphPad Prism version 8.2.1 (GraphPad Software, San Diego, California EUA.)



**Figura 34. Contenido de esteroles mayoritarios libres y conjugados en hojas de tomate wild type, CR-*asat1* y CR-*psat1*.** El contenido de esteroles libres y conjugados es representado por la suma de colesterol, campesterol, estigmasterol y sitosterol. Los resultados se expresan como la media de las réplicas (n=4) con la desviación estándar. Para realizar no solo la comparación contra el wt sino también entre los mutantes, se efectuó un análisis estadístico por ANOVA de una vía (\*\*P<0,001) seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey (α=0,05). En cada gráfica, los resultados de cada análisis de comparación se expresan mediante letras en minúscula (a, b, c, d) sobre cada columna, cuando los valores del contenido de esteroles son significativamente diferentes, no comparten una determinada letra.



**Figura 35. Contenido total de esteroles en hojas de tomate wild type, CR-*asat1* y CR-*psat1*.** El contenido de esteroles es representado por la suma de colesterol, campesterol, estigmasterol y sitosterol en su forma libre y conjugada. Los resultados se expresan como la media de las réplicas (n=4) con la desviación estándar. Para realizar no solo la comparación contra el wt sino también entre los mutantes, se efectuó un análisis estadístico por ANOVA de una vía (\*\*P<0,001) seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey (α=0,05). En la gráfica, los resultados de cada análisis de comparación se expresan mediante letras en minúscula (a, b) sobre cada columna, cuando los valores del contenido de esteroles son significativamente diferentes, no comparten una determinada letra.

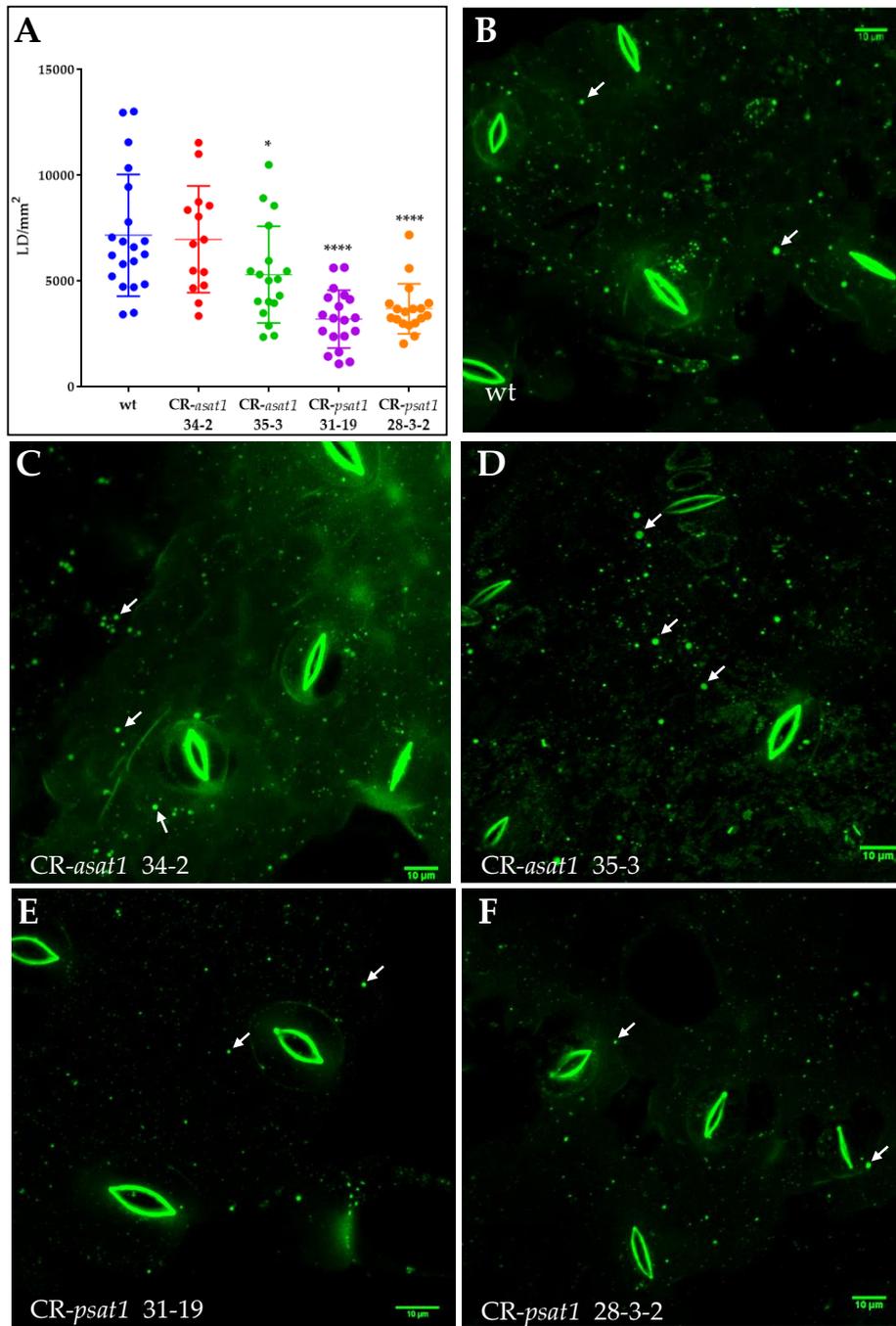


**Figura 36. Contenido de cicloartenol esterificado en hojas de tomate wild type, CR-*asat1* y CR-*psat1*.** Los resultados se expresan como la media de las réplicas (n=4) con la desviación estándar. Para realizar no solo la comparación contra el wt sino también entre los mutantes, se efectuó un análisis estadístico por ANOVA de una vía (\*\*P<0,001) seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). En la gráfica, los resultados de cada análisis de comparación se expresan mediante letras en minúscula (a, b, c) sobre cada columna, cuando los valores del contenido de esteroides son significativamente diferentes, no comparten una determinada letra.

### 3.3.5. Visualización y cuantificación de cuerpos lipídicos en hojas

Estudios previos han demostrado que los SE se acumulan en cuerpos lipídicos (LDs) que se localizan en el citoplasma celular (Brocard et al., 2017; Chapman et al., 2012) en los que también se ha puesto de manifiesto la presencia de SIPSAT1 (Lara et al., 2018). Con el objetivo de investigar si los cambios observados en los niveles de SE en las líneas CR-*asat1* y CR-*psat1* se traducían en cambios en la abundancia de los cuerpos lipídicos en los que se almacenan, se procedió a teñirlos con TopFluor® Cholesterol el cual es una sonda formada por un fluoróforo (difluoro boro-dipirrometeno) unido al carbono 24 de la cadena lateral del colesterol que permite la visualización de esteroides en organismos vivos (Hölttä-Vuori et al., 2008). Para visualizar los cuerpos lipídicos en las hojas de los mutantes de tomate, un disco tomado de la cuarta hoja de cada planta se tiñó con TopFluor® Cholesterol siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos (Apartado 6.8), y la fluorescencia se visualizó por microscopía láser confocal. Los cuerpos lipídicos fueron cuantificados usando el programa Image J 1.48v (Rasband, 2012) y se expresan como número de cuerpos lipídicos por área (LD/mm<sup>2</sup>). Como se observa en la figura 37, la drástica reducción del contenido de SE en hojas de las plantas CR-*psat1* (Figura 34) se correlaciona con una clara disminución (alrededor del 45-50%) del número de cuerpos lipídicos por área de tejido (Figura 37E y F), comparando con lo observado en las muestra wild type (Figura 37B). Sin embargo, la correlación entre los niveles totales de esteroides esterificados y el número de LDs no se mantiene en el caso de las plantas CR-*asat1*, en las que también se observa una disminución de su número (alrededor del 10-25%) a pesar de que los niveles de SE están incrementados (Figura 34). En las muestras de hoja de las plantas wild type se contabilizó un promedio de 7167 LD/mm<sup>2</sup>, mientras que los mutantes CR-*psat1* estos valores fueron de 3211 LD/mm<sup>2</sup> (línea 31-19) y 3697 LD/mm<sup>2</sup> (línea 28-3-2). En el caso

de los mutantes *CR-asat1* se contabilizaron en promedio 6674 LD/mm<sup>2</sup> (línea 34-2) y 5307 LD/mm<sup>2</sup> (línea 35-3).



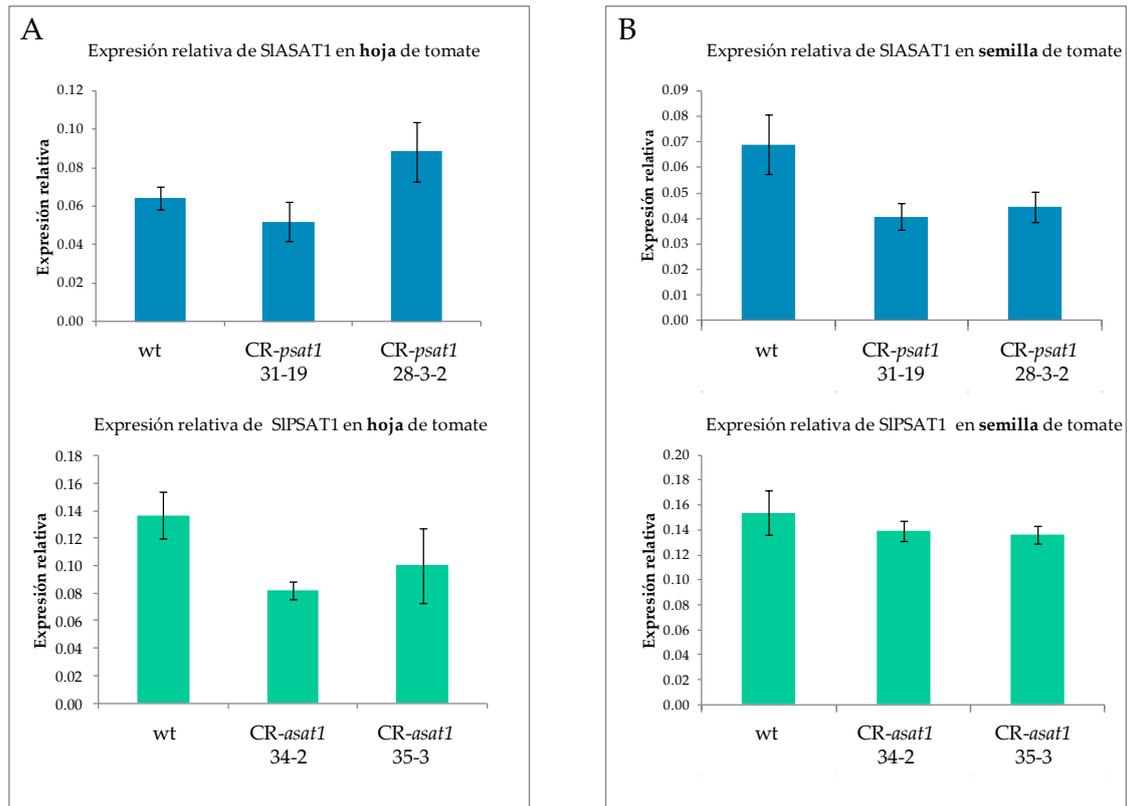
**Figura 37. Cuerpos lipídicos en hojas de tomate wild type, *CR-asat1* y *CR-psat1*.** Discos de la cuarta hoja de las distintas plantas contando desde la base del cotiledón de plantas de 6 semanas se tiñeron con TopFluor® Cholesterol. (A) La abundancia de los cuerpos lipídicos (LD, lipid droplets) se calculó a partir de 15-20 imágenes tomadas en modo Z-stack, usando el programa Image J 1.48v (Rasband W., NIH, USA.), y se expresan como número de cuerpos lipídicos por unidad de área (LD/mm<sup>2</sup>). Los asteriscos indican diferencias significativas comparado con el wild type. ANOVA de una vía con  $\alpha=0,05$  seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunnett (\* $p<0,0359$ ; \*\*\*\* $p<0,0001$ ). Barra de escala = 10µm. (B-F) Imágenes representativas de la abundancia de cuerpos lipídicos en hojas de las plantas indicadas. Las flechas indican la posición de cuerpos lipídicos representativos en las diferentes muestras.

### 3.3.6. Análisis de los niveles de mRNA S<sub>1</sub>ASAT1 y S<sub>1</sub>PSAT1 en las líneas mutantes CR-*psat1* y CR-*asat1*

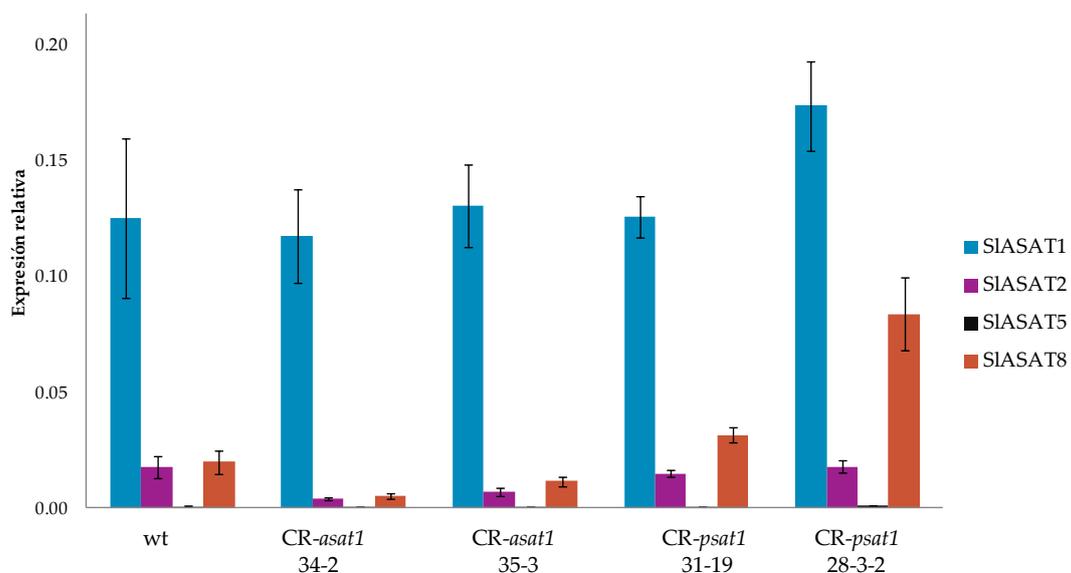
Tal y como se ha descrito en el apartado anterior, los efectos causados por la inactivación de *S<sub>1</sub>ASAT1* y *S<sub>1</sub>PSAT1* sobre el contenido de esteroides esterificados fueron en algunos casos distintos a los esperados inicialmente, particularmente en las líneas CR-*asat1* (figura 31Figura 33Figura 34Figura 36). Para intentar explicar los efectos observados, se determinaron los niveles de los transcritos S<sub>1</sub>ASAT1 y S<sub>1</sub>PSAT1 en las líneas CR-*psat1* y CR-*asat1*, respectivamente, mediante RT-qPCR, empleando preparaciones de RNA obtenidas de las mismas muestras de semillas y hojas de tomate usadas para determinar los perfiles de esteroides, y los primers indicados en la tabla 12.

Los resultados que se presentan en la figura 38 revelaron que en muestras de hoja de ambas líneas CR-*asat1*, los niveles de mRNA S<sub>1</sub>PSAT1 tienden a disminuir (de 29 a 43%) con respecto al wild type (Figura 38A), mientras que los niveles de mRNA S<sub>1</sub>PSAT1 en semillas permanecen inalterados respecto al control wild type (Figura 38B). A su vez, los niveles de mRNA S<sub>1</sub>ASAT1 en hojas de las plantas CR-*psat1* oscilan en sentido opuesto, aumentando 50% respecto al control en la línea 28-3-2 y reduciéndose en un 17% en la línea 31-19 (Figura 38A). En cuanto a las semillas, se observa también una disminución en ambas líneas (alrededor de un 43%) (Figura 38B). En conjunto, los resultados anteriores muestran que la inactivación de S<sub>1</sub>ASAT1 y S<sub>1</sub>PSAT1 no provoca una respuesta compensatoria significativa de la expresión del otro gen implicado en la síntesis de SE que continúa siendo funcional.

Además, se encontró que la expresión de los genes putativos de tomate ASAT2, ASAT5 y ASAT8 no se encuentran con niveles elevados de mRNA comparado con el wild type en hoja de las plantas CR-*asat1* y CR-*psat1*. A excepción de ASAT8, que en ambas líneas CR-*psat1* se encuentran elevados los niveles de mRNA con respecto al wild type, pero no por encima del nivel de S<sub>1</sub>ASAT1 (Figura 39). De estos resultados se infiere que tampoco hay respuesta compensatoria por alguno de los genes putativos de ASAT.



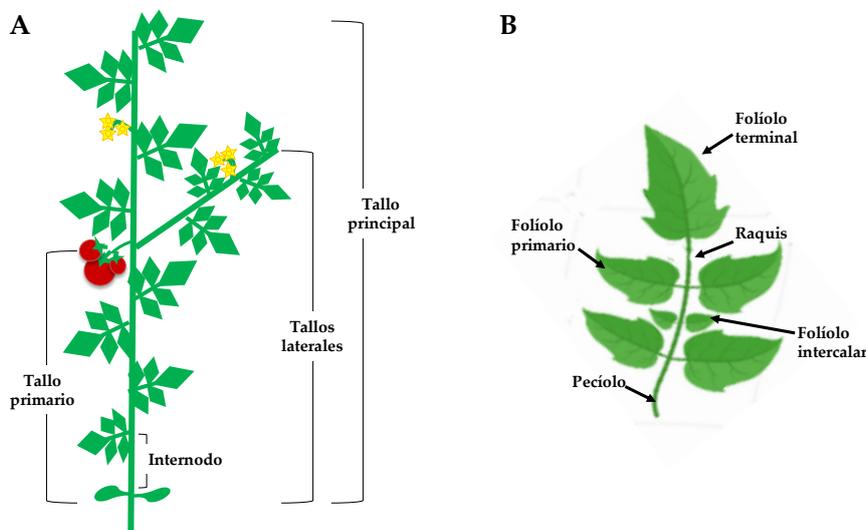
**Figura 38. Niveles de mRNA SIASAT1 y SIPSAT1 en las plantas mutantes CR-*psat1* y CR-*asat1*, respectivamente.** Los niveles de transcrito se determinaron mediante RT-qPCR a partir de RNA total extraído de hojas (A) y semillas (B) utilizando primers específicos para cada gen. Los valores se relativizaron con respecto a los del gen de referencia actina, y son medias (n = 3) con desviación estándar.



**Figura 39. Niveles de mRNA de los genes putativos SIASAT en las plantas mutantes CR-*asat1* y CR-*psat1*.** Los niveles de transcrito se determinaron mediante RT-qPCR a partir de RNA total extraído de hoja utilizando primers específicos para cada gen (Tabla 12) y se relativizaron con respecto a los del gen de referencia actina. Los valores son medias desviación estándar (n = 3).

### 3.3.7. Fenotipo de los mutantes *CR-asat1* y *CR-psat1* y características de productividad

La caracterización fenotípica de las líneas mutantes se realizó siguiendo parcialmente lo realizado por Vicente y colaboradores (2015), empleando plantas de 7 semanas (50 días post germinación, dpj). Se midió la longitud del tercer, cuarto y quinto internodo, el número de hojas en el tallo primario (hasta la primera inflorescencia), el número de hojas en el tallo principal (suma de las hojas del tallo primario y las hojas después de la primera inflorescencia), y la altura del tallo primario, el tallo principal y los laterales (Figura 40). Además, se calculó el área foliar en la quinta hoja contando desde la base del cotiledón utilizando el programa Image J 1.48v (Rasband, 2012).



**Figura 40. Parámetros evaluados en plantas transgénicas de tomate.** Diagrama de una planta de tomate Micro-Tom (A) y una hoja compuesta (B) con la terminología utilizada en la descripción de resultados.

El número de hojas promedio en el tallo primario no está alterado en las plantas mutantes comparado con las wild type, aunque entre las plantas mutantes 35-3 y 28-3-2 se observan diferencias. El número de hojas en el tallo principal, solo es menor en las plantas 35-3 (*CR-asat1*). En el resto de plantas los valores son similares entre ellas y en comparación con el wild type. La longitud de los tallos es menor en todos los casos en las plantas 35-3 (*CR-asat1*) y 31-19 (*CR-psat1*) en comparación a la de los tallos de las plantas wild type, y en el caso de las plantas 28-3-2 (*CR-psat1*) la longitud de los tallos principal y laterales también es menor que en las plantas wild type. En ningún caso se observan diferencias significativas ni en la longitud promedio de los internodos ni en el promedio del área foliar en comparación con los parámetros equivalentes de las plantas wild type y entre mutantes (Tabla 9). En conjunto, estas variaciones son coherentes con las diferencias de tamaño general de las plantas (Figura 41A). Las plantas de las líneas 35-3 (*CR-asat1*), 31-19 (*CR-psat1*) y 28-3-2 (*CR-psat1*) tienen una

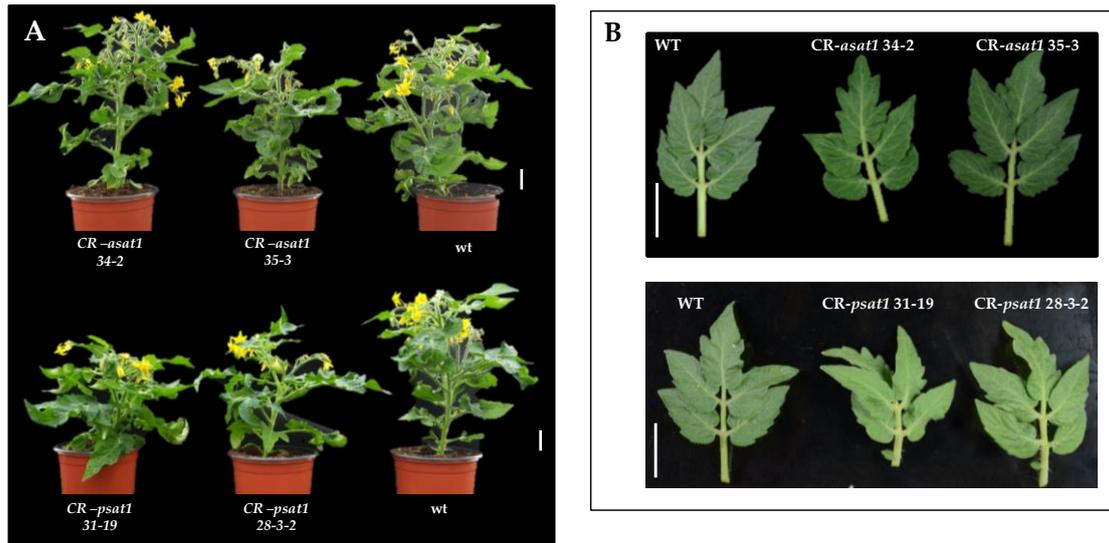
menor estatura que las plantas wild type y las de la línea 34-2 (*CR-asat1*), que tienen tamaños similares.

**Tabla 9. Parámetros morfométricos de plantas wild type, y mutantes *CR-asat1* y *CRpsat1*.**

Parámetro	Wild type	<i>CR-asat1</i>	<i>CR-asat1</i>	<i>CR-psat1</i>	<i>CR-psat1</i>
		34-2	35-3	31-19	28-3-2
Numero de hojas en el tallo primario	7,5 <sup>ab</sup> ± 1,7	7,3 <sup>ab</sup> ± 0,7	6,2 <sup>a</sup> ± 0,6	7,4 <sup>ab</sup> ± 2,0	8,2 <sup>b</sup> ± 1,2
Numero de hojas en tallo principal	14,4 <sup>a</sup> ± 0,9	14,3 <sup>a</sup> ± 2,5	9,8 <sup>b</sup> ± 1,1	14,4 <sup>a</sup> ± 2,7	12,3 <sup>a</sup> ± 1,6
Altura del tallo primario	12,1 <sup>a</sup> ± 2,0	11,4 <sup>ac</sup> ± 1,6	8,6 <sup>b</sup> ± 1,0	9,6 <sup>bc</sup> ± 1,7	10,0 <sup>ab</sup> ± 1,8
Altura del tallo principal	18,3 <sup>a</sup> ± 1,9	19,5 <sup>a</sup> ± 3,2	15,1 <sup>b</sup> ± 1,1	14,7 <sup>c</sup> ± 1,7	14,9 <sup>bc</sup> ± 1,6
Altura del tallo lateral	15,5 <sup>a</sup> ± 1,0	15,8 <sup>a</sup> ± 2,3	12,1 <sup>b</sup> ± 1,9	10,8 <sup>b</sup> ± 2,0	11,8 <sup>b</sup> ± 3,4
Longitud del internodo	1,08 ± 0,3	1,08 ± 0,2	1,13 ± 0,2	0,88 ± 0,3	1,0 ± 0,3
Área foliar	40,8 ± 8,5	38,3 ± 6,3	35,5 ± 9,2	46,7 ± 11,3	40,0 ± 7,0

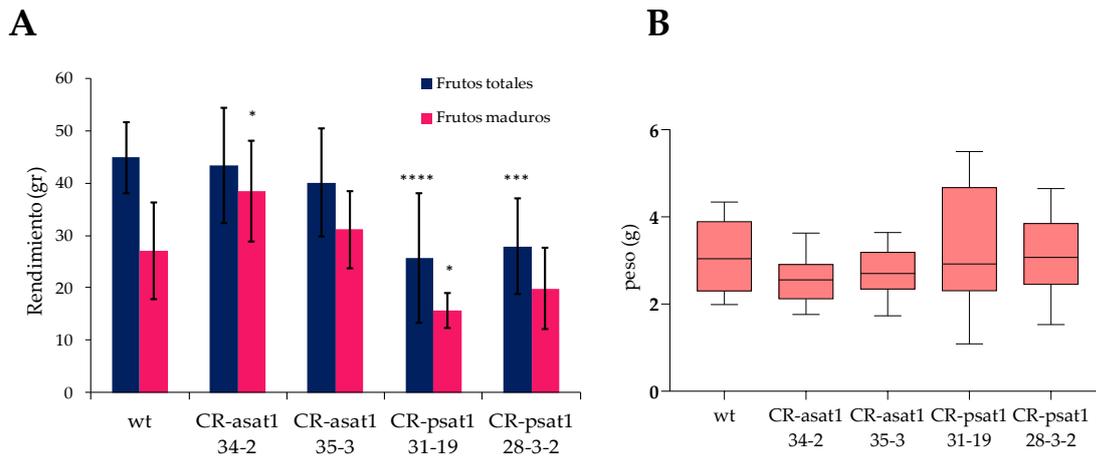
Las mediciones se realizaron en plantas de 7 semanas. Los valores son medias con desviación estándar (n=10 plantas). Para realizar no solo la comparación contra el wt sino también entre los mutantes, se efectuó un análisis estadístico por ANOVA de una vía (\*\*P<0,001) seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) usando el programa GraphPad Prism versión 8.2.1 (GraphPad Software, San Diego, California EUA). Los resultados de cada análisis de comparación se expresan mediante superíndices (a, b, c) en cada fila. Cuando los valores son significativamente diferentes, no comparten una determinada letra. La ausencia de superíndice en las dos últimas filas es debido a que no hay diferencias significativas entre los distintos valores.

En la figura 41B se muestran imágenes representativas de la cuarta hoja a partir del cotiledón de plantas wild type y de los mutantes (*CR-asat1* y *CR-psat1*). La inactivación de SIPSAT1 se traduce en alteraciones en la morfología de las hojas, que se caracterizan por una cierta asimetría en la disposición de los folíolos. El pecíolo es aparentemente más corto y el folíolo terminal está muy cercano a los folíolos primarios, hasta el punto de que parecen estar sobrepuestos, especialmente en las plantas de la línea 31-19 que son, además las que presentan una menor estatura (Figura 41A y B). En los mutantes con la SIASAT1 inactiva no se observan alteraciones en la disposición de los folíolos, que es similar a la de las hojas wild type. En conjunto, estos resultados sugieren que la inactivación de SIPSAT1 provoca alteraciones moderadas del desarrollo vegetativo, en contraste con la inactivación de SIASAT1 que aparenta no tener ningún efecto.



**Figura 41. Características fenotípicas de las plantas *CR-asat1* y *CR-psat1* en fase vegetativa.** Imágenes representativas de plantas de 50 días post germinación (A) y de la cuarta hoja contando desde la base del cotiledón de plantas de 5 semanas de edad (B). Barra de escala= 2 cm.

Se colectaron los frutos de cada planta en el punto donde se observa la mayoría de frutos maduros, pero sin signos visibles de sobre maduración (90 dpv). Se determinó el peso total de los frutos maduros y de los frutos totales por planta (rendimiento) y el promedio del peso de cada fruto. En comparación con las plantas wild type, el rendimiento de frutos totales de las plantas *CR-psat1* es menor, mientras que el de las plantas *CR-asat1* se mantiene sin diferencias. En cuanto al rendimiento de frutos maduros, hay una tendencia al alza en comparación con el wild type en las plantas *CR-asat1*, que es más evidente en las de la línea 34-2 (aumento de un 42%), mientras que la tendencia es a una menor productividad en el caso de las plantas de las líneas *CR-psat1*, especialmente en la línea 31-19 (diminución de un 42,5%) (Figura 42A). Por lo que respecta al peso individual del fruto, no difiere significativamente entre mutantes y wild type (Figura 42B). En conjunto, estos resultados indican que la inactivación de *SIASAT1* y *SIPSAT1* influye sobre la productividad de las plantas en términos de peso total de frutos, no así sobre el peso promedio de los frutos, y que los efectos son más evidentes en la inactivación de *SIPSAT1* que tiene consecuencias negativas sobre la producción de frutos.



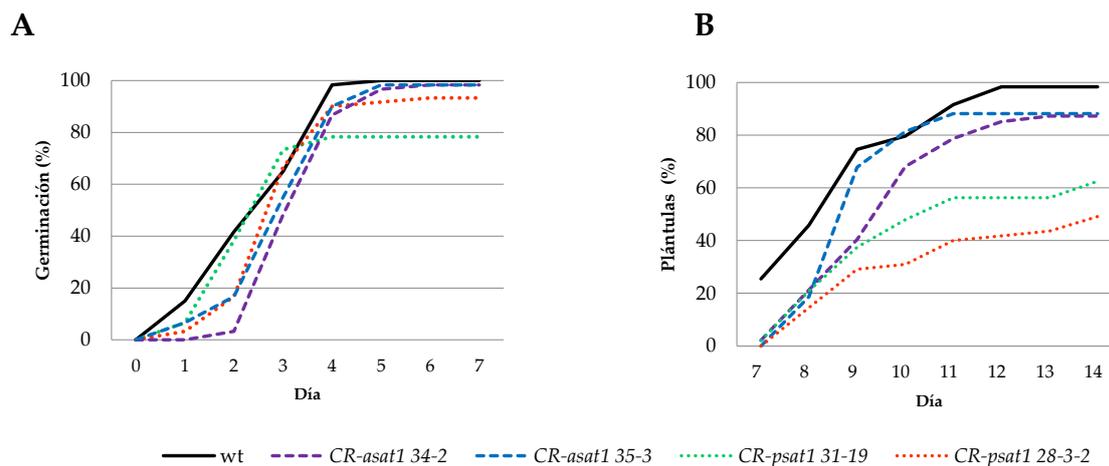
**Figura 42. Evaluación del rendimiento de las plantas *CR-asat1* y *CR-psat1*.** Promedio del rendimiento de frutos totales y maduros por planta (A) y peso promedio de los frutos maduros (B). Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con el wild type (n=10 plantas) por ANOVA de dos vías ( $\alpha=0,05$ ) seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunnett (\*\*\*\* $p<0.0001$ ) para el rendimiento (A), y ANOVA de una vía ( $\alpha=0,05$ ) seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey ( $P<0.05$ ) para el peso de frutos (B).

### 3.3.8. Ensayos de germinación

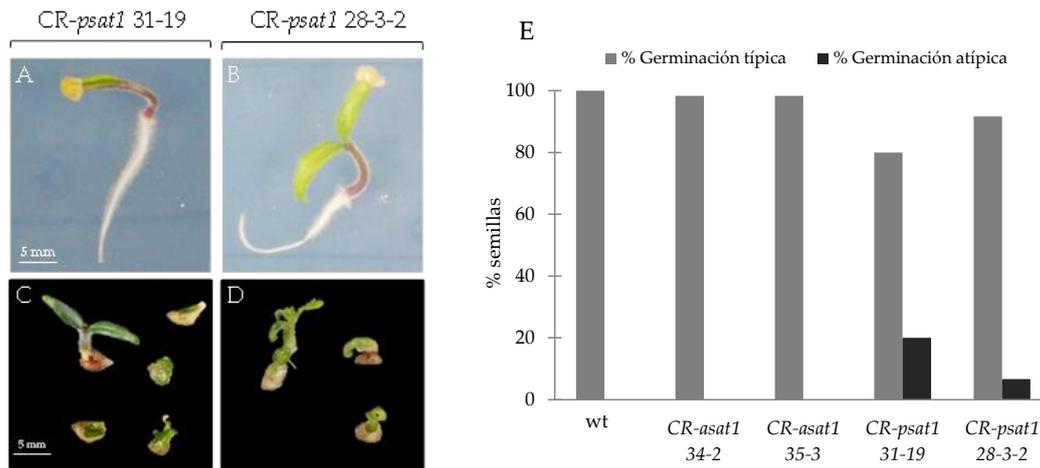
Durante la realización de los experimentos para determinar los niveles de esteroides en hojas de los mutantes de tomate *CR-asat1* y *CR-psat1* se detectaron retrasos en la germinación de las semillas de estas plantas. Para analizar de forma sistemática este fenómeno, se analizó la germinación de las semillas de las cuatro líneas mutantes, incluyendo semillas wild type como control (apartado 6.1.3). En la figura 43 se muestra el resultado de estos análisis. En el caso de las semillas *CR-asat1*, ambas líneas muestran un retraso en la germinación de uno a dos días en comparación con las semillas wild type, aunque la tasa final de germinación al cabo de 7 días acaba siendo idéntica a la de las semillas wild type. En las semillas *CR-psat1* se observa también un retraso en la germinación. Particularmente en las semillas de la línea 28-3-2, que en este caso el retraso está asociado también a una ligera disminución de la tasa final de germinación, que es del 93% en comparación con las semillas wild type. En contraste, la germinación de las semillas *CR-psat1* 31-19 no se retrasa con respecto a las wild type, pero la tasa final de germinación se ve más reducida, hasta el 80% en comparación con las semillas wild type (Figura 43A). En conjunto, estos resultados sugieren que la pérdida de función de SIASAT1 retrasa la germinación sin alterar la tasa final de semillas que germinan, mientras que la inactivación de SIPSAT1 afecta a ambos parámetros.

Además de los efectos sobre la germinación, se observó un retraso severo en la aparición de las hojas verdaderas en las plántulas con SIPSAT1 inactivado, y un retraso algo más moderado en las líneas con SIASAT1 inactivado. Cuando en la práctica totalidad de las plántulas wild type habían aparecido las primeras hojas verdaderas

(día 12 post germinación), en las plántulas de las líneas *CR-asat1* se habían formado las hojas verdaderas en un 85% (línea 34-2) y 88% (línea 35-3) de las plántulas. Con respecto a las líneas *CR-psat1*, apenas un 56% (línea 31-19) y un 41% (línea 28-3-2) de las plántulas presentaban las hojas verdaderas formadas (Figura 43B). Es importante mencionar que estos porcentajes se calcularon en plántulas provenientes de semillas que presentaron lo que se ha definido como germinación típica, ya que en ambas líneas con la SIPSAT1 inactivada se observa un porcentaje (20% en la línea 31-19 y 7% en la 28-3-2) de semillas en donde los cotiledones emergen antes que la radícula (Figura 44E), lo que sugiere que los cotiledones comienzan a formarse de manera prematura. Se observó que en estos casos de germinación atípica las plántulas no son viables, porque el cotiledón y/o la raíz no se desarrollaron (Figura 44C y D). En algunos casos el desarrollo se detuvo con ambas partes formadas, pero sin hojas verdaderas. Estas anomalías en el establecimiento de las plántulas (seedling/cotyledon establishment) no se observan en las semillas de plantas con la SIPSAT1 inactivada, por lo que puede atribuirse específicamente a la inactivación de SIPSAT1 y las consiguientes alteraciones en el perfil de esteroides de estas semillas.



**Figura 43. Evaluación de la germinación de las semillas de las líneas *CR-asat1* y *CR-psat1*.** Tasa de germinación referida como porcentaje de semillas en las que se observa la emergencia de la radícula. Se evaluaron 60 semillas de cada línea mutante, incluyendo semillas wild type (A). Porcentaje de aparición de las primeras hojas verdaderas en plántulas (seedling establishment) obtenidas a partir de semillas con un patrón de germinación convencional (B).



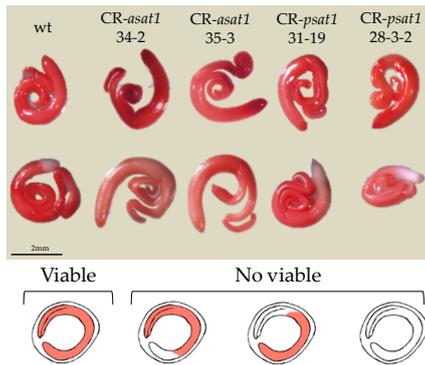
**Figura 44. Efecto de la inactivación de SIASAT1 y SIPSAT1 en la germinación de las semillas.** Imágenes con ejemplos de germinación típica (A-B) y atípica (C-D) de semillas de las líneas CR-*psat1*. Barra de escala= 5mm. Tasa de germinación típica y atípica expresada como porcentaje de semillas (n = 60.) en las que emerge primero la radícula y semillas en las que emergen antes los cotiledones que la radícula, respectivamente (E).

### 3.3.9. Viabilidad de las semillas

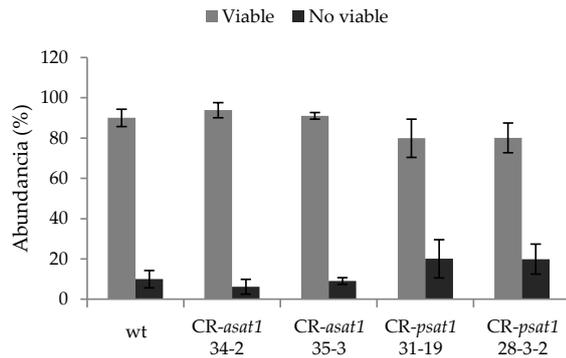
Para profundizar un poco más en el estudio del fenotipo de germinación anómala, se analizaron embriones CR-*psat1*, CR-*asat1* y wild type de semillas teñidas con una solución de sales de tetrazolio (TZ) como se describe en el apartado 6.7. Inicialmente el TZ es incoloro, y por acción de deshidrogenasas celulares presentes en los embriones y el endospermo, se convierte en un formazán que da coloración rojiza (Rich et al, 2001; Yurukova-Grancharova, et al., 2011). Los embriones se evaluaron individualmente y se clasificaron como viables aquellos embriones completamente teñidos, y como no viables los embriones con partes esenciales (radícula, cotiledones o ambos) no teñidos (Peters, 2000; Santos et al., 2007) (Figura 45A).

En base al criterio anterior, se procedió a cuantificar los embriones viables y no viables en las semillas de las líneas CR-*asat1* y CR-*psat1*. Las líneas CR-*asat1* presentan alrededor de un 90% de embriones viables, que es un porcentaje similar al encontrado en las semillas wild type, mientras que en las semillas de CR-*psat1* se encontró alrededor de un 80% de embriones viables. Aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas cuando se comparan con el wild type, ponen de manifiesto que en los mutantes CR-*psat1* tienen una mayor tendencia a presentar embriones anómalos que es coherente con la mayor tendencia de las semillas de estas plantas a presentar alteraciones en la germinación y el establecimiento de las plántulas (Figura 43 y Figura 44). Los resultados de la observación de los embriones al microscopio también pusieron de manifiesto la ausencia de malformaciones en los embriones de las semillas CR-*asat1* y CR-*psat1*, que están completamente diferenciados. Incluso en aquellos donde la radícula no está teñida los cotiledones están formados.

A



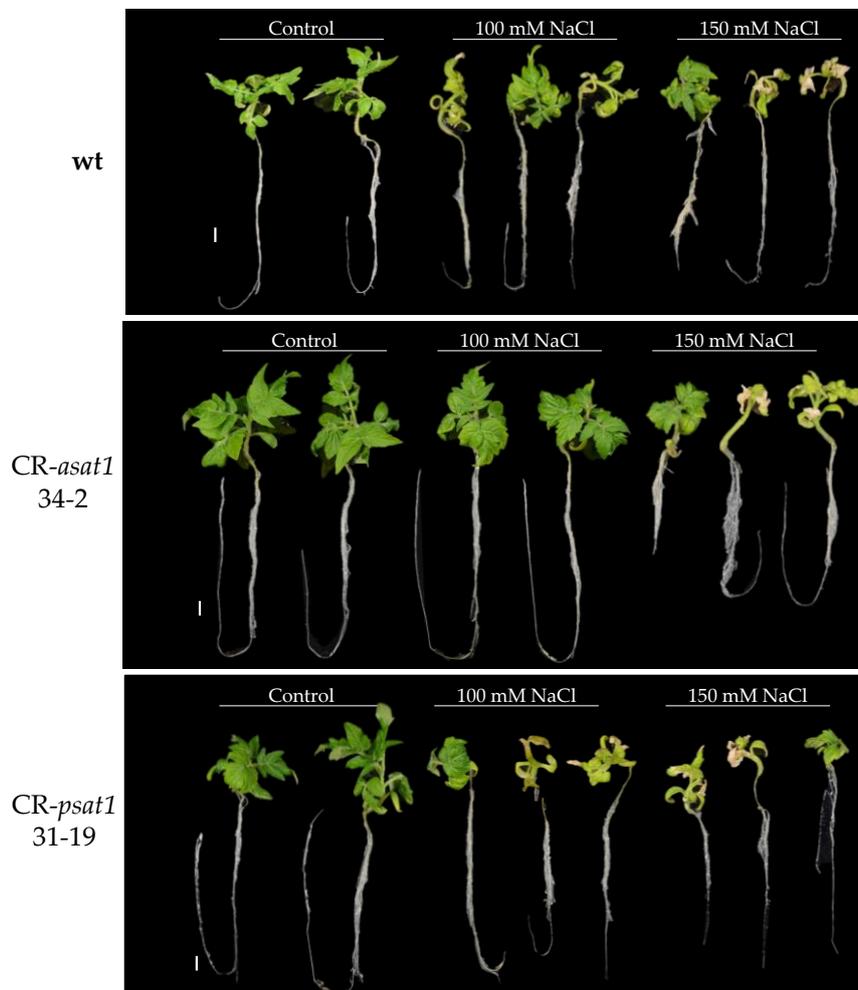
B



**Figura 45. Evaluación de la viabilidad de las semillas de las plantas *CR-asat1* y *CR-psat1* por tinción con sales de tetrazolio.** (A) Imágenes representativas de embriones viables (imágenes superiores) y no viables (imágenes inferiores). Barra de escala= 2 mm. (B) Abundancia de embriones viables y no viables en las semillas wild type, *CR-asat1* y *CR-psat1*. Se analizaron un total de 90 semillas de cada tipo de planta. Los resultados que se muestran son el promedio con desviación estándar empleando ANOVA de una vía  $\alpha=0,05$ , seguido de una prueba comparación por Tukey ( $P<0,05$ ).

### 3.3.10. Evaluación de la respuesta a estrés salino de los mutantes *CR-asat1* y *CR-psat1*

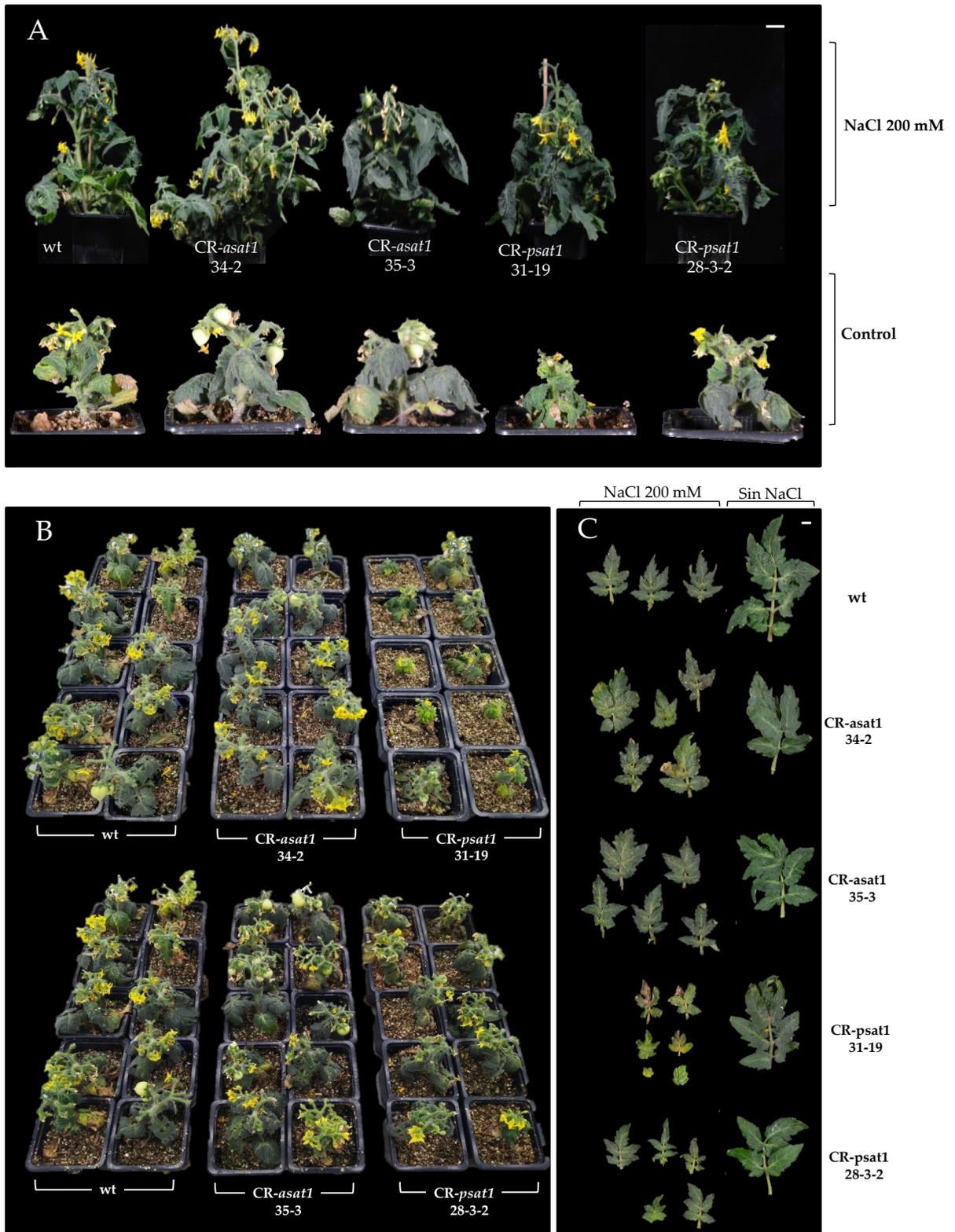
Para comenzar a estudiar la respuesta *in vitro* a estrés abiótico de las plantas *CR-asat1* y *CR-psat1*, se analizó su respuesta frente al estrés salino (NaCl) en condiciones axénicas (cultivo *in vitro*), siguiendo lo descrito en el apartado 6.9. En estas condiciones se observó que las plantas *CR-psat1* (línea 31-19) muestran signos severos de senescencia y retraso del desarrollo cuando crecen expuestas a NaCl 100 mM, mientras que las plantas *CR-asat1* (línea 34-2) muestran incluso menos sensibilidad al estrés producido por esta concentración de sal que las plantas wild type. En presencia de NaCl 150 mM, las plántulas de las 3 líneas analizadas muestran signos de senescencia avanzada, pero de nuevo se aprecia una sensibilidad ligeramente mayor (menor longitud de la raíz) a la sal en los mutantes *CR-psat1* que en los mutantes *CR-asat1* y las plantas wild type (Figura 46).



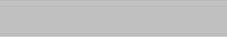
**Figura 46. Efecto del estrés por NaCl en plántulas de tomate wild type, *CR-asat1* y *CR-psat1* cultivadas *in vitro*.** Fotografías representativas de plántulas tomadas después de 10 días de crecimiento en medio de cultivo suplementado con NaCl (100 mM y 150 mM) y control (sin NaCl). Barra de escala = 1 cm.

La evaluación de la respuesta a estrés salino se realizó también en plantas CR-*asat1* (líneas 34-2 y 35-3), CR-*psat1* (líneas 31-19 y 28-3-2) y wild type de 3 semanas que se regaron durante 33 días con una solución de NaCl 200 mM. Como se observa en la figura 47, las plantas de todas las líneas mutantes y wild type están muy afectadas en su crecimiento y desarrollo. En consonancia con los análisis de tolerancia a sal *in vitro*, los mutantes CR-*psat1* son los más severamente afectados, mientras que los mutantes CR-*asat1* están afectadas aparentemente de forma similar a las plantas wild type (Figura 47A y B). Estas diferencias de respuesta se ponen claramente de manifiesto al comparar la cuarta hoja contando desde la base del cotiledón (Figura 41C). Se aprecia una notable reducción del tamaño de las hojas de los dos mutantes CR-*psat1*, especialmente acusado en las plantas de la línea 31-19, en comparación con las hojas de las plantas CR-*asat1* y wild type crecidas en las mismas condiciones, cuyas hojas presentan un aspecto y unas dimensiones similares (Figura 47C). El tamaño de las hojas resulta muy variable e incluso no fue posible coleccionar hojas de cada planta, ya que por efectos del tratamiento, las hojas se desprendieron del tallo en todas las líneas evaluadas.

Considerando las limitaciones del experimento, los resultados de los experimentos anteriores avalan la idea de que el estrés salino produce un efecto más drástico en las plantas con niveles extremadamente bajos de SE (CR-*psat1*) mientras que el efecto sobre las que contienen niveles aumentados de SE (CR-*asat1*) es semejante al producido en las plantas wild type.



**Figura 47. Efecto del estrés por NaCl en plantas de tomate wild type, CR-*asat1* y CR-*psat1* cultivadas en tierra.** Al cabo de 3 semanas las plantas fueron expuestas durante 33 días a una concentración de NaCl 200 mM (A, B). Imágenes representativas de la 4<sup>ta</sup> hoja de plantas expuestas a sal y control de crecimiento (C). Barra de escala = 1 cm.



## **4.DISCUSIÓN**



## Caracterización funcional de enzimas involucradas en la biosíntesis de esteroides esterificados en tomate

Las enzimas que sintetizan los SE son un grupo de proteínas que pertenecen al grupo de las aciltransferasas, concretamente las que transfieren grupos acilo de cadena larga sobre el grupo hidroxilo 3' de los esteroides. La información disponible actualmente relacionada con la biosíntesis de los ésteres de esteroides en plantas es todavía muy limitada. En particular, destaca la identificación y caracterización de los dos genes de *A. thaliana* que codifican las enzimas ASAT1 (Chen et al., 2007) y PSAT1 (Banaś et al., 2005) y, mucho más recientemente, la identificación y caracterización estructural y funcional de los genes ortólogos de *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom que codifican SIASAT1 (Solyc11g012260) y SIPSAT1 (Solyc09g072710) llevada a cabo por nuestro grupo de investigación (Lara et al., 2018).

A diferencia del único gen que codifica SIPSAT1, en el genoma de tomate se identificaron, además de SIASAT1, otros siete genes con capacidad para codificar posibles enzimas con actividad ASAT. Con anterioridad al inicio de este trabajo, se habían obtenido líneas del mutante *asat1-1* defectivo en la actividad ASAT1 (Bouvier-Navé et al., 2010) que expresan constitutivamente las enzimas de tomate SIASAT2 (Solyc11g012210), SIASAT5 (Solyc11g012240) y SIASAT8 (Solyc12g089050) (Lara, 2017). Este último es el miembro de la familia de proteínas tipo ASAT de tomate con menor número de aminoácidos en comparación con SIASAT1, que es la más larga de todas, (317 vs 444 aa) y la que tiene la identidad de secuencia más baja (32,5%) respecto a dicha enzima. Las otras dos candidatas ASAT (SIASAT2 y SIASAT5) tienen 353 aminoácidos, por lo que también son proteínas sensiblemente más cortas que ASAT1 (353 vs 444 aa), aunque tienen una mayor identidad de secuencia (47% y 49% de identidad de ASAT5 y ASAT2 vs ASAT1, respectivamente) (Lara et al., 2018). Al expresar constitutivamente SIASAT2 en el mutante *asat1-1* el fenotipo bioquímico de SE no se revierte, porque el contenido total de SE y de FS en semillas del mutante retransformado es similar al observado en las semillas del mutante sin transformar (Figura 7). El análisis del perfil de esteroides se realizó en semillas porque es donde se observa un incremento consistente y más acusado de los niveles de SE en el mutante *asat1-1* respecto al wild type, los cuales retornan a sus valores normales cuando se expresa SIASAT1 (Figura 7; Lara et al., 2018). Por esta razón, se consideró que las semillas eran el tejido más adecuado para evaluar el resultado de los experimentos de complementación funcional. Al expresar constitutivamente SIASAT5 y SIASAT8 en el mutante *asat1-1* se observó que los niveles de SE en las semillas de estas plantas no solo no retornan a sus valores basales sino que en ambos casos se produce un aumento significativo de los niveles de SE totales con respecto al contenido en las semillas del mutante sin transformar, mientras que en todos los casos el contenido de FS se mantuvo sin cambios (Figura 7). Ante la posibilidad de que SIASAT5 y SIASAT8

podiesen estar implicadas en la esterificación de los esteroides finales mayoritarios en lugar de preferir como sustrato al intermediario cicloartenol, tal y como ocurre en el caso de SIASAT1 (Lara et al., 2018), se analizó también la capacidad de SIASAT8 para revertir el fenotipo de toxicidad por mevalonato del mutante de *Arabidopsis psat1-2* (Bouvier-Navé et al., 2010). La toxicidad de este intermediario de la biosíntesis de esteroides se debe a que provoca un aumento del flujo de la vía, con la consiguiente acumulación de esteroides libres, los cuales, al no poder esterificarse debido a la ausencia de actividad PSAT, resultan tóxicos y acaban causando la muerte de la planta. Se escogió SIASAT8 para retransformar el mutante *psat1-2* porque el incremento de SE observado al expresarla en el mutante *asat1-1* era incluso mayor que el obtenido al sobreexpresar SIASAT5 en dicho fondo mutante (Figura 7). En cuanto a las plantas del mutante *psat1-2* que expresan SIASAT1, se obtuvieron para confirmar que la especificidad de sustrato de SIASAT1 y SIPSAT1 es efectivamente distinta (Lara et al., 2018), por lo que su expresión no debería revertir la toxicidad del mevalonato, y usarla como control negativo en el experimento anterior. El fenotipo de toxicidad por mevalonato fue en ambos casos igual al observado en el mutante *psat1-2* sin retransformar (Figura 10), lo que demostró que la expresión de SIASAT8 no es capaz de revertir la pérdida de función PSAT1 en *Arabidopsis*. Esto, unido a que tampoco es capaz de revertir el fenotipo metabólico del mutante de *Arabidopsis asat1-1*, indica que la función de SIASAT8 en el metabolismo de los SE es distinta a la de SIASAT1 y SIPSAT1, debido probablemente a su diferente especificidad de sustrato, aunque esta hipótesis queda pendiente de demostrar. En cualquier caso, los resultados son coherentes con la diferencia de tamaño (317 vs 444 aa) y la reducida identidad de secuencia (36,5%) existentes entre SIASAT1 y SIASAT8.

Estudios previos de localización subcelular de SIASAT1 empleando técnicas de inmunoblot y microscopía láser confocal habían demostrado que SIASAT1 es una proteína integral de la membrana plasmática, lo cual es plenamente coherente con la predicción en su estructura primaria de ocho secuencias de transmembrana. Esta localización contrasta con la de su homólogo funcional AtASAT1, que se localiza en la membrana del RE y en cuya secuencia se predicen nueve regiones de transmembrana. El hecho de que ambas enzimas tengan preferencia por el cicloartenol como sustrato, y que la enzima de tomate complementa el fenotipo bioquímico del mutante de *Arabidopsis asat1-1* (Lara et al., 2018), plantea la cuestión relativa a cómo la SIASAT1 de la membrana plasmática tiene acceso al cicloartenol, que se encuentra muy probablemente en la membrana del RE, que es donde se acepta mayoritariamente que tiene lugar la síntesis de esteroides que luego se transportan a la membrana plasmática (Benveniste, 2004; Schaller, 2004). La posibilidad de que una enzima situada en un determinado sistema membranoso tenga acceso a un sustrato localizado en las membranas de otro sistema distinto está descrita y se ha definido como actividad enzimática en *trans* (Haj et al., 2012; Mehrshahi et al., 2013; Stefan et al., 2011; Tavassoli

et al., 2013). Por lo tanto, es razonable especular que SIASAT1 puede actuar en *trans* esterificando el cicloartenol del RE cuando ello es necesario para mantener la homeostasis del metabolismo de esteroides (Lara et al., 2018). De hecho las predicciones de topología de inserción a membrana de SIASAT1 y AtASAT1 indican que dos aminoácidos catalíticamente importantes de ambas proteínas, Asn299 en SIASAT1 y Asn202 en AtASAT1, e His343 en SIASAT1 e His245 en AtASAT1 (Huang et al., 2014; Lin et al., 2003), se encuentran, en el caso de la Asn en un bucle proyectado hacia el citosol desde la membrana plasmática (SIASAT1) o el RE (AtASAT1), y en el caso de la His, en la sexta (SIASAT1) y séptima (AtASAT1) secuencias de transmembrana (Figura 11). En base a estas observaciones se ha propuesto que la ASAT1 de tomate podría actuar en *trans* esterificando el cicloartenol del RE a través de los puntos de contacto que se establecen entre la membrana plasmática y el RE (Lara et al., 2018). En animales, levaduras y plantas, la membrana del RE establece contactos físicos con las membranas de otros orgánulos celulares, especialmente con la membrana plasmática en la periferia celular (Pérez-Sancho et al., 2016; Saheki & De Camilli, 2017; Stefan et al., 2013). En los contactos MP-RE se han detectado distintos tipos de proteínas, entre las que se incluyen proteínas de anclaje, reguladores del transporte de calcio, enzimas de la biosíntesis de lípidos, tanto fosfolípidos como esteroides, y proteínas de transferencia de lípidos específicas de esteroides (Gatta et al., 2015; Pichler et al., 2001).

Como se ha indicado anteriormente, la proteína SIASAT1 consta de 444 aminoácidos mientras que AtASAT1 tiene 345 aminoácidos. Esta diferencia de tamaño se debe en buena parte a la diferente longitud del bucle citosólico que conecta los dominios transmembrana 3 y 4 de SIASAT1, y 4 y 5 de AtASAT1 (127 *vs* 18 aminoácidos, respectivamente). Se ha especulado que este bucle puede ser responsable de la distinta localización subcelular de estas dos proteínas (MP *vs* RE), y/o contribuir a la posible actividad en *trans* de la enzima de tomate (Lara et al., 2018). Para comenzar a abordar este aspecto se ha analizado la localización subcelular de dos proteínas quiméricas ASAT1, en las que secuencias de aminoácidos que forman los mencionados bucles citosólicos se han intercambiado entre ambas proteínas. En concreto, 101 aminoácidos del bucle citosólico de SIASAT1 se han sustituido por los 18 aminoácidos del dominio equivalente de AtASAT1, y viceversa. Estas secuencias se han seleccionado en base a la topología de inserción a membrana de ambas proteínas (Figura 11) y el alineamiento de sus secuencias aminoacídicas (Lara et al., 2018). Las predicciones de la topología de inserción a membrana de las proteínas quiméricas ATA (Arabidopsis-Tomate-Arabidopsis) y TAT (Tomate-Arabidopsis-Tomate) resultantes indican que los residuos de Asn e His importantes para la catálisis enzimática se mantienen en sus posiciones en los bucles citosólicos (Asn) y dominios transmembrana (His) de las quimeras equivalentes a los de las proteínas originales (Figura 13). El análisis de la localización subcelular de estas proteínas quiméricas expresadas en hojas de *N. benthamiana* indicó que la proteína TAT-GFP se localiza en la periferia celular con un patrón de

fluorescencia equivalente al de la proteína SIASAT1-YFP de la que deriva (Figura 13Figura 14). Esto indica que la secuencia de 101 aminoácidos incluida en el bucle citosólico de 127 residuos aminoacídicos no es necesaria para que la proteína se localice en la membrana plasmática. Sin embargo, la secuencia de 18 aminoácidos que da lugar al bucle citosólico equivalente de AtASAT1 sí parece ser esencial para que la proteína se distribuya de forma más homogénea a lo largo del RE, ya que la quimera resultante de sustituirla por la secuencia equivalente de 101 aminoácidos de SIASAT1 se sigue localizando en el RE, pero concentrada en puntos muy concretos del mismo en lugar de distribuirse homogéneamente por todo el RE como hace AtASAT1-YFP (Figura 13Figura 14). Este resultado permite especular con la posibilidad de que la quimera ATA-GFP se localice precisamente en los sitios de contacto RE-MP, ya que este patrón de fluorescencia es muy similar al patrón punteado descrito en *N. benthamiana* y *Arabidopsis* que expresan proteínas presentes en los sitios de contacto RE-MP (NET3C, VAP27 y SYT1) fusionadas a GFP (Pérez-Sancho et al., 2015; Wang et al., 2014). Si bien estos resultados son todavía preliminares, son un punto de partida prometedor para continuar trabajando sobre esta hipótesis. Entre los aspectos más inmediatos a investigar están, por ejemplo, demostrar que las proteínas quiméricas mantienen realmente su actividad enzimática y, por lo tanto, son capaces de esterificar cicloartenol cuando se expresan en hojas de *N. benthamiana*, y que la proteína ATA-GFP se localiza verdaderamente en los contactos RE-MP mediante experimentos de co-expresión con proteínas marcadoras de estas asociaciones.

### **Implicación de los esteroides conjugados en la respuesta a estrés biótico causado por infección con *Pseudomonas syringae* en plantas de *Arabidopsis thaliana***

En su entorno natural las plantas están expuestas a diferentes tipos de estrés tanto abiótico como biótico. Para adaptarse a estas condiciones, las plantas activan complejos mecanismos moleculares intrínsecos que les permiten percibir las señales externas e iniciar vías de respuesta de defensa (Fujita et al., 2006). La interacción entre diferentes vías se traduce en una respuesta más eficiente, en particular si algunos genes y compuestos están implicados en la respuesta protectora frente a más de un tipo de estrés (Atkinson & Urwin, 2012), como parece ser el caso de los esteroides. Estos compuestos tienen un efecto estabilizador de las membranas, por lo que desempeñan un papel muy relevante en los procesos de adaptación de las plantas al entorno. De hecho, la variación en la composición de esteroides de las membranas se considera uno de los componentes de la respuesta de las células vegetales a factores externos (Valitova et al., 2016). Existe abundante información bibliográfica que permite relacionar cambios en el perfil de esteroides libres y glicosilados con respuestas específicas a diferentes tipos de estrés, sin embargo son muy escasas las evidencias experimentales que relacionan directamente los SE con estas respuestas (Ferrer et al.,

2017; Ramirez-Estrada et al., 2017). Esto refleja, probablemente, el hecho de que los FS, SG y ASG son componentes esenciales de la MP, mientras que los SE se consideran un reservorio de FS que no se localiza en la MP sino en cuerpos lipídicos en el citosol.

En este trabajo, como una primera aproximación para conocer la posible implicación de los SE en la respuesta de las plantas a estrés biótico, se ha estudiado la respuesta de los mutantes de *Arabidopsis* *asat1-1* y *psat1-2* a la infección con la bacteria *P. syringae* pv. *tomate* DC3000. Esta es una bacteria patógena que tiene como huésped natural la planta de tomate, causando la enfermedad conocida como “peca bacteriana”, pero también es capaz de infectar plantas de *Arabidopsis* en el laboratorio, lo que la convierte en un organismo modelo adecuado para estudiar la relación planta-patógeno (Whalen et al., 1991; Xin & He, 2013). Los resultados obtenidos muestran que las plantas mutantes *psat1-2* son más sensibles a la infección con *Pst* DC3000 que las plantas wild type, ya que como se observa en la figura 15, tres días después de infiltrar las plantas con una suspensión bacteriana, el número de ufc en el mutante fue significativamente superior que en las plantas wild type, y similar al detectado en el mutante de respuesta a *Sa sid2*, el cual se ha descrito que es más sensible a la infección con la bacteria (Nawrath & Métraux, 1999). Sin embargo este fenotipo no se observó en el mutante *asat1-1*, ya que 3 días después de la infección no se detectaron diferencias significativas en el número de ufc en relación con las plantas wild type (Figura 15). La susceptibilidad del mutante *psat1-2* a la infección se confirmó inoculando la bacteria en esta línea mutante y plantas wt por inmersión de las hojas en una suspensión de *Pst* DC3000. Como puede observarse en la figura 16, tres días después de la infección los signos de clorosis fueron más marcados en la línea mutante que en las plantas wild type, y el número de ufc incrementó de forma significativa en el mutante en comparación con las plantas wt. Estos resultados sugieren que AtPSAT1 y, consecuentemente, la esterificación de los esteroides mayoritarios, desempeñan un papel más relevante que AtASAT1 y la esterificación de esteroides intermediarios, en la respuesta de las plantas a patógenos.

Los resultados de este trabajo contrastan con los obtenidos por Kopischke et al. (2013) al infectar el mismo mutante de *Arabidopsis* *psat1-2* con *Phytophthora infestans*, ya que en este caso el mutante presentó una mayor resistencia al patógeno que las plantas wild type. Sin embargo, la respuesta observada no pudo correlacionarse con cambios específicos en la fracción de SE, ya que en las hojas del mutante no sólo disminuyen los niveles de esta fracción de esteroides, sino también los de ASG, mientras que los de SG aumentan y los FS permanecen inalterados. Además, cabe destacar que *Phytophthora* es un patógeno auxotrófico para esteroides, por lo que el perfil alterado de esteroides en el mutante, junto con la capacidad de PR1 (proteína relacionada con patogénesis 1) para inhibir el crecimiento del patógeno secuestrando sus esteroides (Gamir et al., 2017) podrían explicar el fenotipo de resistencia del mutante *psat1-2*.

En respuesta al ataque por patógenos, las plantas activan una serie de respuestas dirigidas a inhibir la colonización de los tejidos vegetales por los microorganismos (Heath, 2000). Los procesos que determinan el éxito o el fracaso de los patógenos tienen lugar en la membrana y, por lo tanto, el apoplasto representa el escenario de batalla en la interacción planta-patógeno (Hoefle & Hüchelhoven, 2008). En el caso de *P. syringae* pv *tabaco*, se ha descrito que el silenciamiento del gen que codifica escualeno sintasa (SQS), una enzima clave en la biosíntesis de esteroides (Figura 3), en *N. benthamiana*; así como el del gen que codifica la esterol metiltransferasa 2 (SMT2), implicada en la síntesis de los fitoesteroides mayoritarios presentes en la MP ( $\beta$ -sitoesterol y estigmasterol) (Figura 3), en *Arabidopsis* (mutante *smt2*), incrementan la sensibilidad de las plantas a la infección como resultado de un mayor crecimiento bacteriano, el cual se atribuye a un incremento del flujo de nutrientes desde el citosol hacia el apoplasto debido a un aumento de la permeabilidad de la MP (Rico & Preston, 2008; Wang et al., 2012). Se ha sugerido que una disminución de los niveles de nutrientes en el apoplasto debida, al menos en parte, a la síntesis y homeostasis de fitosteroides, que regulan la permeabilidad de la MP, inmediatamente después del contacto planta-patógeno o justo antes de que se inicie el proceso de infección, podría ser un mecanismo efectivo de defensa de las plantas frente a los patógenos (Griebel & Zeier, 2010; Wang et al., 2012).

En el caso de *P. syringae*, una vez la bacteria entra en la célula vegetal comienza a reproducirse utilizando los nutrientes presentes en el apoplasto del huésped hasta causarle la muerte, y los tejidos infectados muestran signos severos de clorosis y, finalmente, necrosis (Xin & He, 2013). El apoplasto de las hojas contiene muy pocos nutrientes, y constantemente intercambia componentes con el citosol. Aunque el flujo de nutrientes al apoplasto involucra transportadores específicos (Chen et al., 2010), la permeabilidad de la membrana desempeña también un papel esencial en este proceso, por lo que cualquier cambio en el contenido y perfil de esteroides afectará a la composición de nutrientes en el apoplasto y, consecuentemente, a la respuesta a la infección por patógenos (Wang et al., 2012). Como ya se ha indicado, los SE sirven como una reserva de esteroides que contribuye a mantener los niveles adecuados de esteroides en la MP durante el desarrollo y crecimiento de la planta. En el mutante de *Arabidopsis psat1-2*, como se ha mencionado previamente, se reducen significativamente los niveles de SE, pero también disminuyen los niveles de ASG, mientras que los de SG aumentan y no se modifican los de FS en relación a plantas wild type (Bouvier-Navé et al., 2010). Por tanto, no es extraño suponer que la permeabilidad de la MP en este mutante pueda estar alterada y, tal como se propone en el caso de las plantas de tabaco y *Arabidopsis* que tienen bloqueada la síntesis de esteroides por silenciamiento de SQS o SMT2, respectivamente, esto se traduzca en un incremento del flujo de nutrientes hacia el apoplasto, que favorecería el crecimiento que *Pst* DC3000 en la línea mutante *psat1-2*. Esta hipótesis explicaría también el hecho

de que el mutante *ast1-1* no presente un fenotipo alterado de respuesta a *Pst* DC3000, ya que en dicho mutante los niveles de fitoesteroles mayoritarios en la MP no están alterados. Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar esta hipótesis, y determinar si el fenotipo de sensibilidad a *Pst1* DC3000 observado en el mutante *psat1-2* de *Arabidopsis* es debido a la disminución de los niveles de SE y/o a los cambios en los niveles de esteroides glicosilados descritos en este mutante (Bouvier-Navé et al., 2010). Estudios recientes realizados en nuestro grupo de investigación, han demostrado que el doble mutante de *Arabidopsis* *ugt80A2;B1*, el cual presenta niveles muy reducidos de esteroides glicosilados (SG + ASG) por inactivación de los dos genes que codifican SGTs, es más tolerante a *Botrytis cinerea* que las plantas wild type (Castillo et al., 2019).

A fin de obtener nuevos datos que permitan clarificar la participación de las diferentes fracciones de esteroides conjugados (SE, SG y ASG) en la respuesta a estrés biótico de las plantas, en el presente trabajo se han generado mutantes dobles y triples de *Arabidopsis* defectivos en los genes que codifican PSAT1, ASAT1 y SGTs (*UGT80A2* y *UGT80B1*) (Tabla 2). Estos mutantes son una herramienta muy útil que, en futuros estudios, permitirán conocer como afectan las alteraciones en el metabolismo de esteroides, no sólo a la respuesta de la plantas frente a estrés biótico y abiótico, sino también al crecimiento y desarrollo vegetal, así como profundizar en los mecanismos moleculares y celulares implicados en estos procesos.

### **Efecto de las alteraciones en el metabolismo de esteroides esterificados sobre el crecimiento, desarrollo y respuesta a estrés de plantas de tomate con pérdida de función de SIPSAT1 y SIASAT1**

La genética inversa es extraordinariamente útil para establecer la función biológica del producto de un gen, y se basa en el análisis de los efectos fenotípicos que pueden derivarse de la atenuación o la pérdida completa de su función (Alonso & Ecker, 2006; Gilchrist & Haughn, 2010). La edición del genoma mediante nucleasas dirigidas para actuar sobre secuencias diana concretas se basa en generar cortes en ambas cadenas que activan los mecanismos endógenos de reparación del daño causado en el DNA introduciendo mutaciones. En general, la reparación de las lesiones del DNA se realiza a través de dos mecanismos: recombinación homóloga (HR) o unión de extremos no homólogos (NHEJ). Este último es el más común en la mayoría de los organismos, incluyendo las plantas superiores (Puchta, 2005). Cuando se activa, causa inserciones y deleciones (indels) aleatorias en la secuencia reparada, que si ocurren en la secuencia codificante del gen diana pueden dar lugar a mutaciones por alteración del marco de lectura que conducen a la pérdida de función de la proteína codificada (Bortesi & Fischer, 2015). Entre los sistemas de edición génica más ampliamente utilizados por su eficacia se encuentra el sistema CRISPR/Cas9, que se está empleando con éxito en una gran variedad de organismos (Zhang et al., 2014), incluyendo plantas como

Arabidopsis, arroz y tomate, por citar solo algunos ejemplos (Brooks et al., 2014; Dahan-Meir et al., 2018; LeBlanc et al., 2018; Li et al., 2018; Li et al., 2019; Ma et al., 2015; Pan et al., 2016; Schiml et al., 2016; Ueta et al., 2017; Yin et al., 2017; Zhang et al., 2014). Por ello, la mutagénesis mediada por CRISPR/Cas9 fue el método elegido para obtener mutantes de tomate (cv. Micro-Tom) con los genes *SIASAT1* y *SIPSAT1* inactivados, cuya caracterización permitiese estudiar la función biológica de estas aciltransferasas (Figura 21).

Para identificar las mutaciones causadas por este sistema de edición se han empleado distintas estrategias basadas en amplificar por PCR una pequeña región del DNA genómico que incluye la secuencia diana de la nucleasa Cas9, para luego, (i) clonar los fragmentos amplificados y secuenciar los insertos de un número mínimo de clones, (ii) secuenciar directamente los productos de amplificación y analizarlos con la herramienta TIDE (Tracking of Indels by DEcomposition), o (iii) someterlos a análisis por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Finalmente, tras un largo proceso de selección, se obtuvieron dos líneas homocigotas *CR-asat1*, portadoras de una delección de 16 nucleótidos (línea 34-2) y una inserción de un nucleótido (línea 35-3) en el sitio diana (Figura 26), y otras dos líneas homocigotas *CR-psat1*, con una delección de 4 nucleótidos (línea 31-19) y una inserción de un nucleótido (línea 28-3-2) en el sitio diana (Figura 29). En todos los casos, los indels dan lugar a la aparición de codones de parada prematuros en las secuencias codificantes de ambos genes, lo que se traduce en proteínas truncadas en distinta medida que no son funcionales (Figura 27Figura 30). En el caso de los mutantes *CR-asat1*, las proteínas producto de los genes editados carecen de los aminoácidos Asn e His que son esenciales para la función catalítica (Huang et al., 2014; Lin et al., 2003), y en el de los mutantes *CR-psat1*, les faltan los aminoácidos Ser, Asp, His que constituyen la triada catalítica imprescindible para la catálisis (Banaś et al., 2005). Además del valor intrínseco de estos mutantes como herramientas para estudiar la función biológica de *SIASAT1* y *SIPSAT1*, su obtención ha servido para poner a punto en nuestro laboratorio la edición génica mediada por CRISPR/Cas9, que ya se está empleando para inactivar otros genes relacionados con el metabolismo de los esteroides libres y conjugados.

La edición de los genes *SIASAT1* y *SIPSAT1* en las plantas de tomate provoca cambios moderados en el contenido total de esteroides, que en las semillas y las hojas de ambos tipos de mutantes tiende a disminuir y aumentar, respectivamente, en comparación con las plantas wild type (Figura 32 y Figura 35). Sin embargo, los efectos de la pérdida de función de ambos genes son mucho más evidentes cuando se analizan por separado los niveles de esteroides en las distintas fracciones (Figura 31 y Figura 34; Tabla 7 y Tabla 8). Tanto en semillas como en hojas, la inactivación de *SIPSAT1* provoca una disminución muy marcada del contenido de ésteres de los esteroides mayoritarios  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campesterol y colesterol, y del intermediario biosintético

cicloartenol (Tabla S1 y Tabla S2). La correlación observada entre la disminución de los niveles de cicloartenol esterificado y los de los ésteres de esteroides mayoritarios sugiere que todos ellos son sustrato de la enzima y, por lo tanto, que la PSAT1 de tomate tiene relativamente poca especificidad de sustrato, igual que la PSAT1 de *Arabidopsis* (Banaś et al., 2005). Resultados obtenidos por estos autores en ensayos de actividad enzimática *in vitro* revelaron que AtPSAT1 es capaz de esterificar esteroides finales y también intermediarios biosintéticos como el cicloartenol, particularmente en presencia de esteroides finales libres como el  $\beta$ -sitosterol. Se ha propuesto que los esteroides finales en forma libre son activadores alostéricos de la PSAT, que al esterificar precursores biosintéticos como el cicloartenol y retirarlos de la vía, provoca una disminución del flujo metabólico que evita la sobreacumulación de esteroides finales libres por encima de un determinado nivel a partir del cual son tóxicos (Banaś et al., 2005). En cualquier caso, la menor capacidad para esterificar esteroides de los mutantes CR-*psat1* se traduce en un incremento de los niveles de esteroides libres tanto en semillas como en hojas (Figura 31 y Figura 34). Una respuesta similar se observa en hojas del mutante *psat1-2* de *Arabidopsis* (Shimada et al., 2019). En ambos tejidos el metabolismo de SE es importante: en las semillas se acumulan cantidades considerablemente más altas de SE que las hojas (Figura 31 y Figura 34; Tabla 7 Tabla 8), que sirven como reserva que garantiza el suministro de los esteroides libres necesarios para la germinación y el rápido crecimiento de las plántulas en las etapas iniciales del desarrollo (Dyas & Goad, 1993; Harker et al., 2003). En hojas se postula que los SE son importantes para mantener su viabilidad durante el proceso de envejecimiento al participar activamente en el reciclaje de los esteroides y ácidos grasos de las membranas de las células senescentes (Bouvier-Navé et al., 2010). En cualquier caso, tanto en semillas como en hojas de los mutantes CR-*psat1* continua detectándose la presencia de SE, lo que sugiere la existencia de alguna otra enzima con capacidad para esterificar esteroides además de SIPSAT1, que puede ser la propia SIASAT1 y/o alguna de las candidatas ASAT de tomate todavía no caracterizadas, tal y como se ha propuesto que puede ocurrir en *Arabidopsis* (Lara et al., 2018).

Resultados previos obtenidos al caracterizar la ASAT1 de *Arabidopsis* y tomate indican que esta enzima tiene preferentemente una función reguladora del flujo de la vía de síntesis de esteroides al controlar los niveles del intermediario cicloartenol libre (Bouvier-Navé et al., 2010; Lara et al., 2018). Los niveles de esteroides esterificados en semillas de los mutantes CR-*asat1* se mantienen prácticamente iguales a los de las semillas wild type (Figura 31; Tabla 7). En cambio, la inactivación de SIASAT1 en hojas se traduce en un incremento muy acusado del contenido total de esteroides esterificados (Figura 34 y Tabla 8). Una respuesta similar se ha observado en el mutante de *Arabidopsis asat1-1*, aunque en este caso fue en las semillas y no en las hojas donde se observó el incremento de SE (Lara et al., 2018). Para explicar esta respuesta, se ha postulado que el aumento de los niveles de cicloartenol libre causado por la pérdida de

función ASAT1 provoca un aumento del flujo de síntesis de esteroides que se traduce en una mayor disponibilidad de sustratos de la PSAT1, tanto esteroides finales como cicloartenol en forma libre, que los esterificaría para neutralizar su potencial toxicidad. SIPSAT1 sería pues la responsable final del aumento de los niveles totales de SE observado al inactivar SIASAT1. Como se ha indicado antes, SIPSAT1 también puede esterificar cicloartenol y, de hecho, tanto en semillas como en hojas de los mutantes CR-*asat1* los niveles de cicloartenol esterificado no se reducen sino que aumentan mucho respecto a los de las plantas wild type (Figura 33 y Figura 36). Esta observación concuerda parcialmente con resultados previos obtenidos en *Arabidopsis* que indican que los niveles de cicloartenol esterificado en el mutante *asat1-1* se mantienen constantes en lugar de disminuir (Lara et al., 2018). Queda por establecer si el hipotético incremento de actividad PSAT1 se debe simplemente a un aumento de la concentración de sus sustratos, de hecho se ha propuesto que PSAT1 no es una enzima limitante de flujo en el metabolismo de esteroides en plantas (Bouvier-Navé et al., 2010), o bien a una activación de la enzima que, de producirse, sería a nivel postranscripcional, ya que la pérdida de función SIASAT1 en los mutantes CR-*asat1* no induce un aumento de la expresión del gen *SIPSAT1* ni en hojas ni en semillas (Figura 38). En conjunto, el análisis de los perfiles de esteroides en los mutantes CR-*psat1* y CR-*asat1* apoya la hipótesis de que estas dos enzimas tienen una función parcialmente especializada, esterificando preferentemente determinados esteroides libres, pero con una especificidad de sustrato relativamente baja, hasta el punto de que la pérdida de función de uno de ellos da lugar a cambios en el perfil de esteroides que no son los que se esperarían si se tratase de enzimas con una alta especificidad de sustrato. En cualquier caso, los mutantes generados en este trabajo presentan perfiles de esteroides libres y conjugados diversos, que serán de gran utilidad para abordar en el futuro estudios orientados a analizar sus efectos sobre el desarrollo y la respuesta a estrés biótico y abiótico en tomate.

Los SE representan una reserva de esteroides que contribuye a mantener la homeostasis de esteroides en la membrana plasmática durante las diferentes etapas del crecimiento y desarrollo de las plantas. Cuando aumenta el flujo de la vía de síntesis de esteroides, éstos se esterifican y los ésteres resultantes se almacenan en LDs, cuya estructura permite almacenar lípidos hidrofóbicos en el entorno hidrofílico del citoplasma creando una emulsión gracias a la monocapa de fosfolípidos anfipáticos que los envuelven (Thiam et al., 2013). Además de contener SE y TAG, los LDs pueden contener diversos tipos de proteínas como, por ejemplo, proteínas estructurales, enzimas responsables de la síntesis o degradación de los lípidos almacenados, proteínas implicadas en su biogénesis, la fusión con otros LDs o la interacción con otros orgánulos, etc. (Huang, 2018). Estudios previos de localización subcelular han permitido establecer que SIPSAT1-GFP se localiza en los LDs (Lara et al., 2018). En las hojas de las plantas, el número y tamaño de los LDs depende de la cantidad de lípidos

neutros que hay que almacenar, la cual varía en función del estadio de desarrollo de las hojas (Zhou et al., 2019). En línea con lo anterior, la disminución próxima al 25% del contenido de SE observada en hojas de los mutantes *CR-psat1* se refleja en una disminución aproximadamente a la mitad del número de LDs respecto a las hojas wild type, lo que sugiere que los LDs en las hojas del mutante pueden ser también más pequeños que los de las hojas wild type (Figura 37E y F). El menor número de LDs en hojas de los mutantes *CR-psat1* concuerda con la reducción del número de LDs que acumulan específicamente SEs observada en el mutante *psat1-2* de Arabidopsis (Shimada et al., 2019). Estos autores describen también que la sobreexpresión de AtPSAT1 en el mutante de Arabidopsis *hise1* defectivo en el gen *HISE1* esta asociada a una hiperacumulación de SE y SE-LDs (Shimada et al., 2019). Este gen codifica un regulador negativo de la cantidad de proteína HMGR. Los autores proponen que PSAT1 es determinante en la formación de LDs y que el exceso de esteroides se convierte en SE en microdominios del RE donde se sintetizan los LDs, y en los que también se localiza AtPSAT1 (Shimada et al., 2019). Ello es compatible, además, con el hecho de que el número de LDs en los mutantes *CR-asat1* sea similar al de las hojas de plantas wild type, a pesar de que estos mutante acumulan cerca de 5 veces más SE que las plantas control. Asumiendo que los niveles de SIPSAT1 en los mutantes *CR-asat1* se mantienen constantes (Figura 38) y el papel determinante propuesto para PSAT1 en la formación de LDs (Shimada et al., 2019), se puede especular que esta es la causa del mantenimiento prácticamente constante del número de LDs en estas plantas que, por otra parte, parecen tener incluso mayor tamaño que los de las plantas control (Figura 37C y D). El mecanismo por el cual los LDs crecen es desconocido y puede diferir entre tipos de células, pudiendo alcanzar su tamaño final cuando aún se encuentran unidos a la membrana del RE, o cuando una vez desprendidos del RE se siguen depositando lípidos dentro de los LDs ya formados (Laibach et al., 2015).

La pérdida de función ASAT1 y el consiguiente aumento de los niveles de SE (Figura 34) no afectan significativamente ni al desarrollo ni a la productividad de las plantas de tomate (Tabla 9; Figura 41 y Figura 42), de forma parecida a lo observado en el mutante *asat1-1* de Arabidopsis que tampoco muestra ningún fenotipo (Bouvier-Navé et al., 2010). Estas observaciones confirman que la acumulación de ésteres de esteroides en estructuras subcelulares especializadas es una forma de neutralizar la toxicidad de un exceso de esteroides libres (Figura 10). En cambio, la pérdida de función PSAT1 en los mutantes *CR-psat1* produce un fenotipo de enanismo moderado, debido principalmente a una reducción de la longitud de los tallos primario, principal y laterales (Figura 41A y Tabla 9), y también una disminución de la producción de frutos (Figura 42). Estos fenotipos pueden asociarse a la escasez de esteroides de reserva que afectaría de forma particular a estos tejidos. Se ha descrito que los esteroides glucosilados son predominantes especialmente en el tallo y las raíces de plántulas de tomate (Dupéron et al., 1984), por lo que el fenotipo observado en los tallos podría

deberse también a los cambios observados en la fracción de esteroides glucosilados (Figura 34), aunque habría que determinar el perfil de esteroides en estos tejidos para poder establecer una asociación más sólida entre ambos hechos. El área foliar en los mutantes no se ve afectada por la sobreacumulación o la reducción de los SE (Tabla 9). Sin embargo, la disposición de los folíolos entre los dos mutantes CR-*psat1* y en comparación con las plantas wild type es distinta (Figura 41 B). No se puede descartar que ello se deba también al moderado incremento de SGs observado en hojas de estos mutantes (Figura 34), puesto que los niveles de SG en las hojas de los mutantes CR-*asat1* son iguales a los de las hojas wild type y, además, el resto de fracciones de esteroides de membrana (FS y ASG) en hojas de los mutantes CR-*psat1* se mantiene en niveles parecidos a los de las hojas de los mutantes CR-*asat1*, que no muestran alteraciones en la disposición de los folíolos.

La reducción del contenido de SE en semillas de los mutantes CR-*psat1* (Figura 31) afecta negativamente tanto a la germinación de las semillas como al desarrollo inicial de las plantas (Figura 43), a diferencia de lo observado en los mutantes CR-*asat1*, cuyos niveles de SE son normales (Figura 31) y donde estos efectos son mucho menos acusados, aunque perceptibles (Figura 43). Estas anomalías fenotípicas son coherentes con la disminución del contenido de SEs de las semillas, que en condiciones normales se almacenan junto con TAG para luego movilizarlos durante la germinación a fin de sostener el crecimiento de la plántula durante las primeras etapas de desarrollo (Athenstaedt & Daum, 2006). Durante la maduración de las semillas de *Nicotiana tabacum* L. y colza se ha descrito un incremento progresivo de la síntesis de SE, a diferencia de los esteroides libres cuyos niveles se mantienen constantes (Harker et al., 2003). La actividad responsable de esterificar esteroides en las semillas de tabaco alcanza su máximo coincidiendo con el momento en que se alcanza el nivel máximo de SE, para luego decrecer bruscamente cuando la semilla madura completamente. Se ha descrito que los mutantes de *Arabidopsis* *fk*, *smt1/cph* e *hyd1* con pérdida de función de distintas enzimas de la biosíntesis de esteroides (C-14 reductasa, C-24 metiltransferasa, y C-8,7 isomerasa, respectivamente) presentan defectos en la división y expansión celular, así como defectos del patrón de embriogénesis (Clouse, 2002; Schaller, 2003). Estos mutantes tienen niveles de sitosterol y campesterol reducidos, además de acumular diferentes esteroides intermediarios, pero todos muestran el mismo fenotipo embrionario. Se ha propuesto que la acumulación de intermediarios es la causa de los defectos encontrados en la embriogénesis de estos mutantes de *Arabidopsis*, ya que posiblemente funcionan como moléculas de señalización (Schrack et al., 2002). Más recientemente, a partir del análisis del perfil de esteroides en semillas de *Pisum sativum*, se ha planteado la posibilidad de que el intermediario biosintético isofucoesterol desempeñe un papel importante en los procesos de división celular rápida y/o la diferenciación celular que se producen durante el desarrollo de la semilla (Schrack et al., 2011). En las semillas de ambos mutantes CR-*psat1* los niveles del intermediario

isofucoesterol se encuentran elevados en comparación con el contenido en las semillas wild type (Tabla S1). Por lo tanto, es razonable atribuir directa o indirectamente la responsabilidad de las alteraciones observadas en los embriones y la germinación de las semillas del mutante *CR-psat1* (Figura 43) al contenido excesivamente bajo de SE en las semillas de dichos mutantes *CR-psat1*.

Cuando las semillas secas y viables absorben agua, se inicia una cadena de eventos que finaliza con la aparición de la radícula, lo que significa que la germinación se ha completado con éxito. La respiración, la actividad de enzimas y orgánulos, y la síntesis de RNA y proteínas son actividades celulares fundamentales íntimamente involucradas en la germinación y la preparación para el crecimiento posterior (Bewley et al., 1994). El efecto contrastante de la inactivación de SIASAT1 y SIPSAT1 sobre la germinación de las semillas también se manifiesta en forma de alteraciones en el establecimiento de los cotiledones, que en un porcentaje significativo de semillas de los mutantes *CR-psat1* emergen antes que la radícula (Figura 44), y un mayor porcentaje de embriones no viables que se caracterizan porque la radícula no se tiñe con sales de tetrazolio (Figura 45), lo que indica que la actividad respiratoria en las células es baja (Yurukova-Grancharova et al., 2011).

El estrés salino, es uno de los factores ambientales que tiene un impacto más negativo sobre el desarrollo y productividad de las plantas, limitando seriamente la producción de los cultivos (Flowers et al., 2010; Qadir et al., 2008). Estos efectos son debidos al estrés osmótico producido como consecuencia de un déficit hídrico, y a un desequilibrio en la homeostasis celular de iones, que se traduce un exceso de iones sodio en el citosol, los cuales interfieren con procesos bioquímicos esenciales para el correcto funcionamiento celular (Zhang & Blumwald, 2001). Además en condiciones de estrés salino incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que dañan la célula por oxidación de macromoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos o lípidos de membrana (Mansour, 2013). Como consecuencia de todos estos efectos se producen diversas alteraciones en la membrana que afectan a su permeabilidad (Ashraf & Ali, 2008; Mansour & Stadelmann, 1994; Mansour et al., 1993), potencial (Serrano et al., 1999), composición de lípidos (Kerkeb et al., 2001; Mansour et al., 1994; Salama et al., 2007; Wu et al., 1998), y actividad de las proteínas unidas a la misma (Cosentino et al., 2010; Mansour et al., 2003; Qiu et al., 2007; Senadheera et al., 2009). Por tanto, el mantenimiento de la integridad de la MP es esencial en el proceso de adaptación de las plantas a condiciones de estrés salino (Golldack et al., 2014). De hecho, en algunos casos, la permeabilidad de la MP se considera un criterio para seleccionar variedades vegetales tolerantes a sal. De forma que, en condiciones de estrés salino, en las variedades sensibles a sal se observa un incremento en la permeabilidad de la MP que no se detecta en las variedades resistentes (Ashraf & Ali,

2008; Mansour & Stadelmann, 1994; Mansour et al., 1993; Mansour, 2013; Tuna et al., 2007; Yang et al., 2009).

Como se ha mencionado en la Introducción los esteroides libres y glicosilados son componentes estructurales de la MP que regulan su fluidez y permeabilidad, y se ha descrito que ambos tipos de esteroides desempeñan un papel importante en las respuestas adaptativas de las plantas a diferentes tipos de estrés abiótico (Beck et al., 2007; Hugly et al., 1990; Kumar et al., 2015; Mishra et al., 2013; Mishra et al., 2015; Pandey et al., 2014; Posé et al., 2009; Saema et al., 2016; Urbany et al., 2013; Wagatsuma et al., 2015; Wang H. et al., 2012; Wang K. et al., 2012). Sin embargo, se conoce muy poco sobre la posible función de los esteroides esterificados en este proceso.

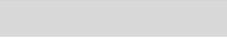
Como una primera aproximación para intentar conocer si los SE participan de alguna manera en la respuesta de las plantas a estrés salino, se estudió la respuesta a este tipo de estrés de los mutantes *CR-psat1* y *CR-asat1*, tanto en plantas crecidas *in vitro* (Figura 46) como en cultivo hidropónico (Figura 47), ya que en un trabajo previo realizado en nuestro grupo de investigación se había observado que, en plántulas de tomate crecidas *in vitro*, los genes que codifican las enzimas SIPSAT1 y SIASAT1 respondían de forma diferencial al tratamiento con una concentración elevada de sal en el medio de cultivo durante 48 h. De forma que, mientras la expresión de *SIASAT1* no experimentaba cambios en respuesta al tratamiento, la expresión de *SIPSAT1* disminuía de forma significativa (Lara et al., 2018). Los resultados obtenidos en este trabajo, aunque preliminares, sugieren que los mutantes *CR-psat1*, que presentan niveles muy reducidos de SE (Figura 34), son más sensibles a estrés salino que las plantas *wt*, tanto *in vitro* (Figura 46) como *in vivo* (Figura 47). Sin embargo este fenotipo no se observa en los mutantes *CR-asat1*, que presenta niveles de SE superiores a los de las plantas *wt* (Figura 34).

Se ha descrito que, en diferentes especies vegetales, los niveles de esteroides incrementan en condiciones de estrés salino, y se considera que una elevada relación FE/fosfolípidos en la MP incrementa la tolerancia a sal, debido a que incrementa la rigidez de la membrana y, de esta forma, reduce la entrada de  $\text{Na}^+$  al citosol. Por otra parte, se ha observado que la sobreexpresión de la enzima SGT, responsable de la síntesis de SG, incrementa la tolerancia a estrés salino y térmico en plantas de *Arabidopsis*, tabaco y *Whitania somnifera* (Mishra et al., 2013; Pandey et al., 2014; Saema et al., 2016). Aunque los resultados obtenidos en este trabajo son preliminares, puesto que los SE son formas de reserva de FS que permiten mantener la homeostasis de los mismos en la MP, se podría pensar que los niveles de SE en mutantes *CR-psat1* no son suficientes para realizar esta función y paliar los efectos deletéreos provocados por el estrés salino en la MP, lo que explicaría también porque los mutantes *CR-asat1* no presentan el fenotipo de sensibilidad a sal. Estos datos sugieren que, igual que se ha observado en el caso de estrés biótico en *Arabidopsis*, la enzima SIPSAT1 tendría un

papel más prominente en la respuesta de las plantas a estrés salino que la SIASAT1. Sin embargo, se requieren más datos experimentales para confirmar esta hipótesis, entre ellos conocer los niveles de las diferentes fracciones de esteroides en los mutantes y plantas wild type expuestas a estrés salino. Por otra parte, cabe mencionar que, en este trabajo, las determinaciones de esteroides se ha realizado en hojas de plantas wild type y de los mutantes *CR-psat1* y *CR-asat1*; mientras que el exceso de sal es detectado inicialmente en la raíz, por lo que se considera que los principales procesos implicados en la adaptación de las plantas a estrés salino tienen lugar en este órgano. Debido a ello, las raíces tienen una elevada capacidad para controlar su concentración de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> (Basyuni et al., 2009). Además, la endodermis y, en menor medida, la exodermis, son barreras apoplásticas de la raíz que controlan la toma y el transporte radial (corta distancia) de agua y solutos hasta el xilema (Lux et al., 2004). Estudios muy recientes realizados en nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto que en plantas de tomate wt expuestas a estrés salino, los niveles de SE en la raíz incrementan de forma muy marcada, por lo que un análisis de la composición de esteroides en las raíces de mutantes *CR-psat1* y *CR-asat1*, podría contribuir a entender el papel que desempeñan los SE en la respuesta de tomate a estrés salino y la participación de SIPSAT1 y SIASAT1 en este proceso. Además, la disponibilidad de dobles mutantes *CR-psat1 x CR-asat1*, que se han empezado a obtener durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, puede contribuir a clarificar este último aspecto, así como la función e importancia de ambas enzimas en el desarrollo de la planta y el fruto de tomate.

En conjunto los resultados obtenidos en este trabajo, aunque preliminares, apoyan la idea de que los SE están implicados en la respuesta a estrés abiótico, concretamente a estrés salino, y que las enzimas de tomate implicadas en la síntesis de estos compuestos (SIPSAT1 y SIASAT1) desempeñan papeles diferenciados en este proceso.





## **5.CONCLUSIONES**



- 1.- Las enzimas SIASAT2, SIASAT5 y SIASAT8 son funcionalmente distintas a SIASAT1 porque, a diferencia de ésta, no son capaces de revertir el fenotipo bioquímico de las semillas del mutante de *Arabidopsis asat1-1* caracterizado por un aumento del nivel de SE.
- 2.- La enzima SIASAT8 es también funcionalmente distinta a SIPSAT1 porque, a pesar de su capacidad para esterificar esteroides finales en el fondo mutante *asat1-1*, no restaura la capacidad del mutante de *Arabidopsis psat1-2* para crecer en presencia de mevalonato exógeno tal y como hace SIPSAT1.
- 3.- El bucle citosólico de 18 aminoácidos que conecta la cuarta y quinta secuencias de transmembrana de AtASAT1 es importante para que la enzima se distribuya homogéneamente en la membrana del retículo endoplasmático, mientras que la región equivalente de 101 aminoácidos que conecta la segunda y tercera secuencias de transmembrana de SIASAT1 puede estar involucrada en la hipotética localización de esta enzima en sitios de contacto entre el retículo endoplasmático y la membrana plasmática.
- 4.- El mutante de *Arabidopsis psat1-2* presenta un fenotipo de sensibilidad a la infección con *P.syringe* pv. *tomate* DC3000 que no se observa en el mutante *asat1-1*, el cual podría atribuirse a alteraciones en la permeabilidad de la membrana del mutante *psat1-2* como resultado de los cambios en el contenido de las diferentes fracciones de esteroides descritos en este mutante, pero no en *asat1-1*.
- 5.- Se ha generado una amplia colección de semillas de mutantes nulos dobles y triples de *Arabidopsis* afectados en la síntesis de las distintas fracciones de esteroides conjugados, que permitirá establecer el impacto de las diferentes combinaciones de alelos mutantes sobre los niveles de esteroides libres, glucosilados y esterificados, y estudiar su efecto en la respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés.
- 6.- Mediante edición por CRISPR/Cas9 de la secuencia codificante de los genes *SIASAT1* y *SIPSAT1* se han obtenido líneas mutantes de tomate cv. Micro-Tom con las enzimas SIASAT1 o SIPSAT1 inactivadas, denominadas *CR-asat1* y *CR-psat1*, respectivamente.
- 7.- La pérdida de función SIPSAT1 provoca una reducción muy marcada del contenido de esteroides finales esterificados en semillas y hojas de tomate, y un aumento moderado de los niveles de esteroides libres, mientras que la pérdida de función SIASAT1 no altera de forma significativa ni los niveles de esteroides finales esterificados ni de esteroides libres en semillas, a diferencia de lo que ocurre en las hojas, donde provoca un incremento drástico de los niveles de esteroides esterificados y mucho más moderado de los esteroides libres.

8.- La pérdida de función de SIPSAT1 causa una disminución de los niveles del intermediario cicloartenol esterificado tanto en semillas como en hojas, mientras que la inactivación de SIASAT1 produce el efecto contrario, ya que en ambos tejidos los niveles de cicloartenol esterificado aumentan de forma muy acusada.

9.- El análisis de los perfiles de esteroles libres y esterificados en hojas y semillas de los mutantes de tomate *CR-asat1* y *CR-psat1* sugiere que las preferencias para el sustrato esterol de SIASAT1 y SIPSAT1 son distintas aunque parcialmente solapantes.

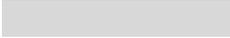
10.- La reducción del contenido de SE en hojas de los mutantes *CR-psat1* se correlaciona con una disminución del número de cuerpos lipídicos por unidad de área de tejido en comparación con las hojas de las plantas wild type, mientras que en hojas de los mutantes *CR-asat1* el aumento de SE no se traduce en un aumento del número de LDs, lo que sugiere que la formación de cuerpos lipídicos en tejidos vegetativos de tomate está estrechamente relacionada con la esterificación de esteroles mediada por SIPSAT1.

11.- La pérdida de función SIPSAT1 retrasa la germinación, altera el establecimiento de las plántulas observándose un porcentaje significativo de semillas en que los cotiledones emergen antes que la radícula, y se asocia a un mayor porcentaje de embriones con tejidos no viables, mientras que los efectos de la inactivación de SIASAT1 sobre estos procesos son prácticamente inexistentes, por lo que estos fenotipos pueden atribuirse a los niveles reducidos de esteroles esterificados de las semillas de los mutantes *CR-psat1*.

12.- La inactivación de SIPSAT1, a diferencia de la de SIASAT1, produce un fenotipo de enanismo moderado, caracterizado por una reducción de la longitud de los tallos primario, principal y laterales, anomalías en la morfología de las hojas y una disminución de la producción de frutos cuyo peso no muestra diferencias significativas con los frutos de las plantas wild type.

13.- La inactivación de SIPSAT1, a diferencia de la de SIASAT1, produce un fenotipo de sensibilidad a estrés salino, que podría deberse a que los bajos niveles de SE presentes en los mutantes *CR-psat1* no serían suficientes para mantener los niveles adecuados de esteroles libres y/o glicosilados en la MP requeridos para paliar los efectos deletéreos provocados en la misma por el estrés salino.

14.- Los mutantes nulos de tomate generados en este trabajo presentan distintos perfiles cualitativos y cuantitativos de esteroles libres y conjugados que permitirán abordar futuros estudios orientados a conocer la función de estos metabolitos en el desarrollo y la respuesta a estrés biótico y abiótico del tomate.



## **6.MATERIALES Y MÉTODOS**



## 6.1. Material vegetal

Las plantas utilizadas para la realización de este trabajo fueron tomate (*Solanum lycopersicum* cultivar Micro-Tom), *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 (Col-0).

### 6.1.1. Mutantes de *Arabidopsis thaliana*

**Mutante *asat1-1*** (GB-056B09): Mutante para el gen *ASAT1* (At3g51970). Fondo genético Col-0 (NASC ID: N405301). La inserción de T-DNA se encuentra en la posición +799 respecto a la primera base del codón ATG de inicio de la traducción. El mutante presenta resistencia a sulfadiazina.

**Mutante *psat1-2*** (SALK\_117091): Mutante para el gen *PSAT1* (At1g04010). Fondo genético Col-0 (NASC: N663767). La inserción de T-DNA le confiere resistencia a kanamicina y se encuentra en la posición +695 respecto a la primera base del codón ATG de inicio de la traducción (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>).

**Mutante *ugt80A2*** (SALK\_020939): Mutante para el gen *UGT80A2* (At3g07020). Fondo genético Col-0 (NASC ID: N25034). La inserción de T-DNA le confiere resistencia a kanamicina y se encuentra en la posición +175 respecto a la primera base del codón ATG de inicio de la traducción (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>)

**Mutante *ugt80B1*** (SALK\_103581): Mutante para el gen *UGT80B1* (At1g43620). Fondo genético Col-0 (NASC ID: N2105582). La inserción de T-DNA le confiere resistencia a kanamicina y se encuentra en la posición +29 respecto a la primera base del codón ATG de inicio de la traducción (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>)

**Mutante *ugt80A2B1***: Doble mutante para los genes *UGT80A2* (At3g07020) y *UGT80B1* (At1g43620) en fondo genético Col-0 (Stuck et al., 2015). Poseen carácter de resistencia al herbicida BASTA.

### 6.1.2. Cultivo en tierra de tomate cv Micro-Tom

Se sembraron las semillas a 5 mm de profundidad en turba (Klasmann TS2) previamente humedecida en macetas pequeñas (5 cm x 5 cm x 6,5 cm) contenidas en una bandeja con agua hasta 1 cm de altura y se cubrieron con película plástica para mantener una humedad relativa del 100%. Se llevaron a invernadero en condiciones de día largo (16 h luz/8 h oscuridad) a 26-28°C (día) y 22-24°C (noche). Al cabo de una semana, una vez que empieza la formación de cotiledones, se perforó la cubierta para abrir la ventilación y empezar la aclimatación a las condiciones del invernadero, y una semana después se retiró por completo la cubierta (humedad relativa del 60-70%). Una vez que las plántulas tuvieron los cotiledones completamente expandidos y dos pares de hojas verdaderas (3 semanas después del sembrado) se transfirieron a macetas de

mayor tamaño (13 cm de diámetro x 10 cm de altura) y se sustituyó el sustrato por una mezcla de turba (Klasmann TS2), perlita y vermiculita (2:1:1). Las plantas se mantuvieron en invernadero en las mismas condiciones. Las semillas se extrajeron a partir de frutos rojos maduros, se enjuagaron con abundante agua destilada en un colador y se colocaron sobre papel filtro durante 3 a 4 días hasta que se secaron lo suficiente para después recolectarlas en tubos Eppendorf que se conservaron a temperatura ambiente.

### 6.1.3. Cultivo *in vitro* de tomate cv Micro-Tom

Las semillas se esterilizaron enjuagándolas en agua estéril durante 30 min, seguido de un tratamiento con anti fúngico Captan (Bayer) a una concentración de 3 g/L durante 5 min y 2 enjuagues con agua estéril de 5 min cada uno. A continuación, se lavaron durante 15 min con una solución al 2% NaClO (40% lejía comercial) y 0,01% Tween 20, y se enjuagaron 5 min con agua estéril 3 veces más. Finalmente, se retiró el agua y las semillas estériles fueron sembradas en placas con medio sólido 0,5 MSO (2,5 g/L de sales basales Murashige-Skoog [MS], vitaminas Gamborg B5 [inositol 100 mg/L, ácido nicotínico 1 mg/L, piridoxina 1 mg/L y tiamina 1 mg/L], agar 8 g/L, pH 5,7-5,9). Las plantas se dejaron crecer en condiciones de día largo (16 h luz/8 h oscuridad) con una irradiación de 150  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a 24°C.

### 6.1.4. Cultivo en tierra de *Nicotiana benthamiana*

Las semillas de *N. benthamiana* se sembraron en macetas pequeñas con turba y se cultivaron en invernadero en condiciones de día largo, con una temperatura de 24-28°C (día) y 22-24°C (noche). Transcurridos unos 10 días, cada plántula se trasplantó a una maceta más grande, donde se dejaron crecer entre 3-6 semanas hasta alcanzar el estadio adecuado para la agroinfiltración: 4 hojas totalmente extendidas y antes de la formación de inflorescencias. El cultivo de *N. benthamiana* fue realizado por el servicio de invernaderos del CRAG.

### 6.1.5. Obtención de semillas de *Arabidopsis thaliana*

Se sembraron semillas de *A. thaliana* sin esterilizar en macetas pequeñas (6,5 cm x 5 cm x 5 cm) conteniendo una mezcla de turba (Klasmann TS2), perlita y vermiculita (2:1:1) previamente humedecida, se colocaron en una bandeja con agua hasta 1 cm de profundidad y se cubrieron con película plástica para mantener una humedad relativa del 100%. Se estratificaron a 4°C en oscuridad durante 3 días y se llevaron a invernadero a 22-24°C en condiciones de día largo (16 h luz/8 h oscuridad). Una vez las semillas germinaron, se perforó la cubierta para permitir la aclimatación a las condiciones del invernadero. Al cabo de una semana se retiró la cubierta por completo y las plantas se dejaron crecer con ayuda de tutores de madera. Una vez que se produjeron las silicuas y éstas empezaron a virar a color marrón (aproximadamente 8

semanas después de la germinación) se cubrieron con sobres de papel y se suspendió el riego. Cuando los tallos se encontraban completamente secos (aproximadamente 3 semanas después de poner los sobres), se cortaron y se recolectaron las semillas, que se tamizaron hasta eliminar los restos de material vegetal seco. Las semillas se almacenaron a temperatura ambiente en tubos Eppendorf.

#### **6.1.6. Cultivo *in vitro* de *Arabidopsis thaliana***

Una cantidad de semillas equivalente de 100  $\mu\text{L}$  se colocaron en un tubo Eppendorf de 1,5 mL, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% (v/v) y se agitaron en vórtex durante 30 seg. Una vez retirada la solución anterior, se realizó un lavado con 500  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto. Para eliminar los restos de etanol, se colocaron los tubos abiertos en la cabina de flujo laminar el tiempo necesario para que las semillas estuvieran secas. Las semillas estériles se sembraron en placas con medio 0,5 MS (2,2 g/L de sales basales Murashige-Skoog, 1 g/L de MES [ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidrato], sacarosa 1% p/v y 8 g/L de agar, pH 5,7-5,9). Las placas se envolvieron con papel de aluminio para crear condiciones de oscuridad y se dejaron en la cámara fría a 4°C durante 48 h para estratificar. Posteriormente, se llevaron a la cámara de cultivo donde las plantas se dejaron crecer en condiciones de día largo (16 h luz/8 h oscuridad) con una irradiación de 150  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a 24°C.

#### **6.1.7. Obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana***

El sistema de recombinación Gateway se usó para transferir los cDNA SIASAT1 y SIASAT8 de los plásmidos pENT-SIASAT1 y pENT-SIASAT8 al vector binario de expresión en planta pEarleyGate100 (Earley et al., 2006) que confiere resistencia a fosfotricina (PPT, DL-Phosphotricin) y fue obtenido del “Arabidopsis Biological Resource Center” (ABRC; stock CD3-724). Los vectores resultantes pEG100-SIASAT1 y pEG100-SIASAT8, se introdujeron en *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 por electroporación y se usaron para transformar plantas mutantes de *Arabidopsis psat1-2* por el método de inmersión floral (Clough & Bent, 1998) que se describe a continuación.

Se emplearon 6 macetas ( $\varnothing$  10cm x 9cm) para cada evento de transformación en las cuales se sembraron de 6 a 10 semillas del mutante de *Arabidopsis*. El sustrato contenido en cada maceta está compuesto por mezcla de turba (Klasmann TS2), perlita y vermiculita (2:1:1) previamente humedecida, que se cubrió con una malla de nylon y se aseguró con una goma de plástico para prevenir que el sustrato caiga en el medio de inoculación. Las macetas se colocaron en una bandeja con agua hasta 1 cm de profundidad y para mantener una humedad relativa al 100% se colocó una cubierta de plástico. Las bandejas permanecieron durante dos días a 4°C en oscuridad para estratificar las semillas. Posteriormente, se llevaron a invernadero a 22-24°C en

condiciones de día corto (8 h luz/16 h oscuridad). Una vez iniciada la germinación, se perforó la cubierta plástica para permitir la aclimatación a las condiciones del invernadero y una semana después se retiró la cubierta por completo. Después de 5 semanas, las plantas se trasladaron al invernadero en condiciones de día largo (16 h luz/8 h oscuridad) para dejarlas crecer durante 4 semanas más. Para obtener más botones florales por planta, se cortaron las inflorescencias cuando en la mayoría de las plantas se había formado los tallos primarios, de tal forma que disminuye la dominancia apical y se favorece la aparición sincronizada de múltiples tallos secundarios. Las plantas se sumergieron en el medio de inoculación con *A. tumefaciens* cuando se contaba con el mayor número de botones florales cerrados (8-10 días después del corte de los tallos primarios).

La cepa de *A. tumefaciens* GV3101 portadora del plásmido de interés se sembró en medio sólido YEB suplementado con antibióticos (rifampicina 100 µg/mL, kanamicina 25 µg/mL y carbenicilina 100 µg/mL) y se incubó a 28°C durante 48 h. Para la preparación del pre-cultivo, se inocularon con una colonia aislada de *A. tumefaciens* 3 mL de medio líquido YEB suplementado con las mismas concentraciones de los antibióticos anteriores y el cultivo se incubó a 28°C en agitación durante 18 h. Posteriormente, se tomaron 250 µL del pre-cultivo que se inocularon en 250 mL de medio YEB suplementado con los mismos antibióticos que el cultivo anterior, y el cultivo se incubó a 28°C en agitación (12-16 h) hasta obtener una densidad óptica de 0,6-1 ( $\lambda=600$  nm). El precipitado de células se recuperó por centrifugación a 5000 rpm durante 15 min y se resuspendió en 150 mL de una solución de sacarosa (5% p/v) y Silwet L-77 (0,025%).

Las plantas de *Arabidopsis* en el adecuado estadio de desarrollo se sumergieron durante un minuto en la suspensión de *A. tumefaciens* previamente preparada. Las plantas inoculadas se mantuvieron en horizontal sobre papel filtro en bandejas separadas conforme al tipo de construcción usada en la transformación y se colocó una cubierta de plástico para mantener la humedad. Una vez las inflorescencias comenzaron a curvarse hacia arriba, se retiró el plástico y las macetas se colocaron de nuevo en vertical. Las plantas se llevaron al invernadero en condiciones de día largo (16 h luz/8 h oscuridad) para completar su desarrollo hasta producir semillas.

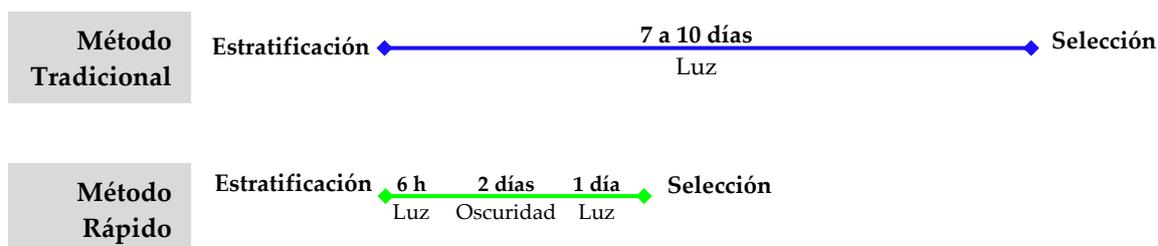
#### **6.1.7.1. Selección de plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas**

La selección de las semillas transformadas se basó en la capacidad de germinar y crecer de las plántulas en placas con medio 0,5 MS suplementado con PPT (16 µg/mL), el herbicida al que da resistencia el T-DNA del plásmido pEarlyGate100 empleado en la transformación.

El mutante *asat1-1* presenta resistencia a sulfadiazina que le aporta el T-DNA del plásmido pAC161, por lo que las semillas de este mutante se seleccionaron por su

capacidad de germinar y crecer las plántulas en presencia de sulfadiazina en medio 0,5 MS con sacarosa 1% suplementado con sulfadiazina 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Se aplicó el método de selección rápida en las plántulas de semillas T<sub>1</sub> propuesto por Harrison y colaboradores (2006), el cual permite la rápida identificación de transformantes en placas con medio MS suplementado con PPT (Figura 48).



**Figura 48. Métodos de selección de plántulas transformantes de *Arabidopsis*.** Adaptado de Harrison et al., 2006.

Las semillas estériles se sembraron en placas con medio 0,5 MS con PPT (16  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) o con sulfadiazina (2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), y se estratificaron durante 48 h en oscuridad a 4°C. Se transfirieron a una cámara de cultivo donde se mantuvieron durante 6 h a 22°C en constante iluminación (150  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) para estimular la germinación. Para promover el incremento de la longitud del hipocotilo y facilitar la posterior extracción de las plántulas resistentes, las placas se cubrieron con papel de aluminio y se incubaron durante 2 días a 22°C. Posteriormente las placas con las semillas se llevaron a la cámara de cultivo donde las plantas se dejaron crecer en condiciones de día largo (16 h luz/8 h oscuridad) con una irradiación de 150  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a 24°C. Después de 24 h los transformantes ya son fácilmente identificables. Las semillas de los transformantes primarios resistentes al herbicida PPT obtenidos en la primera selección rápida se analizaron para la segregación del carácter de resistencia a PPT, y las plantas de semillas con una segregación 3:1 se crecieron en tierra para obtener líneas homocigotas T<sub>3</sub>. La selección de líneas homocigotas independientes se realizó por el método tradicional, con 2 días de estratificación de las semillas en medio 0,5 MS con PPT seguido por un periodo de 7 a 10 días de crecimiento en condiciones de día largo (Figura 48).

### 6.1.8. Obtención de dobles y triples mutantes de *Arabidopsis thaliana* por polinización cruzada

Para cruces más eficientes, se eligió como planta femenina la que tenía desarrolladas de 5 a 6 inflorescencias y como planta masculina la que había iniciado la formación de silicuas. De la inflorescencia de la planta femenina, se eliminaron las silicuas maduras así como las flores abiertas y los botones florales maduros. El meristemo floral y los botones que eran demasiado pequeños se eliminaron mediante unas pinzas finas lavadas con etanol al 96%. Normalmente de 3 a 5 botones florales tienen el tamaño adecuado y son los que se emplean para el cruce. Los botones se abrieron insertando la punta de las pinzas entre los pétalos y los sépalos, que se eliminaron cuidadosamente, así como las anteras inmaduras, dejando expuesto el estigma. El mismo procedimiento se repitió con los botones restantes de la inflorescencia y la inflorescencia emasculada se marcó con un trozo de hilo alrededor del tallo. Los estigmas de las flores emasculadas se cubrieron con el polen de una flor abierta y madura de la planta masculina. Para ello, la flor se sujeta con unas pinzas y se acercan las anteras al estigma para depositar tanto polen como sea posible. Las inflorescencias polinizadas se cubrieron con plástico transparente para evitar la pérdida excesiva de humedad, que se retiró dos días después. Las plantas se mantuvieron en el invernadero en condiciones de día largo (16 h luz/8 h oscuridad) y se vigiló constantemente la formación de las silicuas para recolectarlas justo antes que empezaron a abrirse. Cada silicua recolectada se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 mL sin cerrar pero cubierto con Parafilm con pequeñas perforaciones. Las silicuas deben mantenerse de esta forma durante un par de días a temperatura ambiente para una mayor maduración. Las semillas de las silicuas obtenidas se sembraron en sustrato y se dejaron crecer en condiciones de día largo hasta que fue posible tomar una muestra de hojas de la roseta para genotipar las plantas.

### 6.1.9. Cultivo de *Arabidopsis thaliana* para tratamiento con mevalonolactona

Para evaluar el efecto del aumento de síntesis de esteroides libres causado por la adición externa de mevalonato en las plantas del mutante *psat1-2* retransformadas con los genes de tomate ASAT1 y ASAT8 se siguió el protocolo usado por Bouvier-Nave y colaboradores (2010). Las semillas de las líneas de interés se germinaron en vertical en placas con medio 1/3 MS (1,4 g/L de MS, 1 g/L de MES, sacarosa al 1% p/v, 8 g/L de agar, pH 5,7-5,9) bajo condiciones de día largo (16 h luz/8 h oscuridad). Después de 15 días, se transfirieron 10 plántulas a matraces Erlenmeyer conteniendo 100 mL de medio líquido 0,5 MS (2,2 g/L de MS, 1 g/L de MES, sacarosa al 1% p/v, 8 g/L de agar, pH 5,7-5,9). Se agregó mevalonolactona (Sigma) en solución etanólica 5 M al medio de cultivo líquido, para obtener una concentración final de 3 mM. Paralelamente, se crecieron las

plántulas de las mismas líneas en medio líquido sin mevalonolactona para utilizarlo como control de crecimiento. En estos matraces, se añadió la cantidad correspondiente de etanol al 95% el cual fue utilizado como disolvente de la mevalonolactona. Las plántulas se cultivaron durante dos semanas bajo las mismas condiciones de luz y temperatura con agitación (120 rpm).

#### **6.1.10. Infección de *Arabidopsis thaliana* con *Pseudomonas syringae***

La inoculación de las plantas de *Arabidopsis* se realizó de forma independiente por infiltración e inmersión (Katagiri et al., 2002) utilizando una solución bacteriana del patógeno *P. syringae* pv. *tomate* (*Pst* DC3000) en una concentración de  $1 \times 10^6$  ufc/mL ( $DO_{600}=0,002$ ) y  $2,5 \times 10^7$  ufc/mL ( $DO_{600}=0,05$ ), respectivamente. En ambos procedimientos la solución bacteriana de inoculación se preparó a partir de un cultivo de *Pst* DC3000 en medio sólido King Agar B ( $K_2PO_4$  1,5 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1,5 g/L, agar 15 g/L, peptona 20 g/L, glicerol 10 ml/L, pH 7) con rifampicina (100  $\mu$ g/mL) y kanamicina (25  $\mu$ g/mL). Para colectar las bacterias de la placa de Petri, se agregaron 5 mL de  $MgCl_2$  (10 mM), se separaron las colonias del medio con un asa de cultivo y se transfirieron a un tubo de plástico estéril de 15 mL. La densidad óptica de la solución bacteriana se ajustó diluyendo con una solución de  $MgCl_2$  10 mM + Sylwet L77 200  $\mu$ L/L para obtener la concentración deseada.

##### **6.1.10.1. Inoculación del patógeno en hojas de roseta por infiltración**

Se emplearon 12 macetas (5 cm x 5 cm x 6,5 cm) para cada línea de *Arabidopsis* de interés, con una sola planta por maceta. El sustrato contenido en cada maceta se componía de una mezcla de turba (Klasmann TS2), perlita y vermiculita (2:1:1) previamente humedecida. Hojas de roseta de plantas de 4 semanas de edad cultivadas en condiciones de día corto (8 h luz/16 h oscuridad) se infiltraron con una solución bacteriana de *Pst* DC3000. Para esto se empleó una jeringa de 1 mL sin aguja y se infiltró la suspensión bacteriana en la cara abaxial de diferentes hojas de una misma planta, las cuales se marcaron con rotulador para su posterior identificación. Como control no infectado se utilizaron plantas infiltradas por el mismo procedimiento pero sólo con la solución de  $MgCl_2$  + Sylwet (Mock). Las bandejas que contenían las plantas inoculadas y las plantas control, se cubrieron con una cabina de mini-invernadero para mantener el 100% de humedad relativa durante 48 h.

El crecimiento bacteriano en el tejido foliar se determinó contando las unidades formadoras de colonias (ufc) en diluciones seriadas, obtenidas a partir de muestras recolectadas una hora post-infección (1 hpi) y 3 días post-infección (3 dpi). Para ello, cuatro discos de 0,5 mm diámetro tomados de las hojas infectadas de una sola planta se homogeneizaron con 500  $\mu$ L de  $MgCl_2$  + Sylwet. Del homogeneizado se tomaron 100  $\mu$ L y se diluyeron en 900  $\mu$ L de  $MgCl_2$  + Sylwet para realizar diluciones seriadas 1:10

para cada muestra (hasta una dilución  $10^{-7}$ ). Una alícuota de 3  $\mu\text{L}$  de cada dilución se inoculó en medio sólido LB con kanamicina y rifampicina por duplicado y después de que las gotas se hubiesen embebido en el medio, se incubaron las placas durante 48 h a  $28^{\circ}\text{C}$ . La siguiente fórmula se utilizó para cuantificar la densidad bacteriana en cada muestra.

$$\log \text{ ufc /cm}^2 = \log_{10} \frac{\text{ufc en la última dilución}}{\text{volumen muestra } \mu\text{L}} \times \frac{\text{factor de dilución}}{\text{área muestra cm}^2}$$

#### 6.1.10.2. Inoculación del patógeno en planta por inmersión

Se emplearon 6 macetas (5 cm x 5 cm x 6,5 cm) para cada línea de Arabidopsis de interés, en las cuales se sembraron de 4 a 6 semillas. El sustrato contenido en cada maceta se componía de una mezcla de turba (Klasmann TS2), perlita y vermiculita (2:1:1) previamente humedecida, que se cubrió con una malla de nylon y se aseguró con una goma de plástico para prevenir que el sustrato cayese al medio de inoculación.

La inoculación de la bacteria se realizó sumergiendo las plantas durante 60 segundos en 100 mL de una suspensión bacteriana de  $2,5 \times 10^7$  ufc/mL. Para el control no infectado se realizó el mismo procedimiento de inoculación pero sólo con la solución de  $\text{MgCl}_2$  + Sylwet (Mock). Las bandejas que contenían las plantas inoculadas y las plantas control, se cubrieron con una cabina de mini-invernadero para mantener el 100% de humedad relativa. Transcurridas 1 y 72 h de la inoculación, se colectaron y pesaron 10 hojas de la roseta de cada línea inoculada y control por triplicado. Este material vegetal se homogeneizó con 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  + Sylwet y una vez homogeneizado, se agregaron 500  $\mu\text{L}$  más de  $\text{MgCl}_2$  + Sylwet.

La densidad de bacterias en el tejido vegetal (unidades formadoras de colonia por mg de peso fresco de tejido; ufc/mg) se calculó a partir de diluciones seriadas (hasta  $10^{-7}$ ) del homogeneizado. Para ello, se inocularon 3  $\mu\text{L}$  de cada dilución en una placa con medio LB suplementado con kanamicina y rifampicina, por duplicado. Después de que las gotas se habían embebido en el medio, se incubaron las placas durante 48 h a  $28^{\circ}\text{C}$  y se contó el número de colonias en cada placa. Para cuantificar la densidad bacteriana en cada muestra se utilizó la siguiente fórmula:

$$\log \text{ ufc /mg} = \log_{10} \frac{\# \text{ ufc en la última dilución}}{\text{volumen de muestra } \mu\text{L}} \times \frac{\text{factor de dilución}}{\text{peso muestra mg}}$$

## 6.2. Material microbiológico

### 6.2.1. Células competentes

*E. coli* **TOP10**. F<sup>-</sup> mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu) 7697 galU galK λ<sup>-</sup> rpsL (StrR) endA1 nupG, y **DH5α**: F<sup>-</sup> φ80lacZΔM15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>) phoA supE44 λ<sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1. Empleadas para la transformación con plásmidos recombinantes portadores de productos de amplificación por PCR y de productos de recombinación entre plásmidos del sistema Gateway.

*E. coli* **DB3.1**. F<sup>-</sup> gyrA462 endA1 glnV44 Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20 (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 (Sm<sup>r</sup>) xyl5 Δleu mtl1. Usada para la propagación de plásmidos conteniendo el gen letal *ccdB* utilizado durante la selección de plásmidos del sistema Gateway.

*A. tumefaciens* **GV3101::pMP90**. Cepa resistente a rifampicina y gentamicina portadora del plásmido Ti pMP90 (pTiC58DT-DNA) que contiene los genes *vir*, esenciales para la inserción del T-DNA en el genoma de la planta. Empleada en la transformación estable de plantas de *A. thaliana* y transformación de cotiledones de tomate.

*A. tumefaciens* **EHA105**. Cepa resistente a Rifampicina y estreptinomicina portadora del plásmido Ti pEHA105 (pTiBo542DT-DNA). Empleada en la expresión transitoria de proteínas en plantas de *N. benthamiana*.

### 6.2.2. Medios de cultivo

**LB (Luria-Bertani)**: 10 g/L de NaCl, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de triptona a pH 7,4. El medio sólido se preparó añadiendo 15 g/L de agar bacteriológico.

**YEB (Yeast Extract Broth)**: 1 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de extracto de carne, 5 g/L peptona, 5 g/L de sacarosa y 0,5 g/L de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O a pH 7,2. El medio sólido se preparó añadiendo 15 g/L de agar bacteriológico.

Tabla 10. Antibióticos y suplementos utilizados en la preparación de medios para cultivos bacterianos.

Antibiótico	Concentración del stock	Concentración de trabajo
Kanamicina	25 mg/mL	25 µg/mL
Carbenicilina	100 mg/mL	100 µg/mL
Rifampicina	50 mg/mL	100 µg/mL
Gentamicina	100 mg/mL	25 µg/mL
Espectinomicina	50 mg/mL	100 µg/mL
IPTG	100 mM	0,5 mM
X-Gal	20 mg/mL	80 µg/mL

### 6.3. Análisis de la expresión génica

#### 6.3.1. Extracción de RNA de plantas

Las muestras de tejido vegetal de las diferentes especies fueron congeladas en N<sub>2</sub> líquido inmediatamente después de su recolección y luego se trituraron con mortero y pistilo en presencia de N<sub>2</sub> líquido. Se extrajo RNA total a partir de aproximadamente 100 mg de tejido mediante el kit Maxwell® 16 LEV Plant RNA (Promega) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El RNA extraído se cuantificó por espectrofotometría mediante NanoDrop y se midió la relación de absorbancia A260/A280 como un índice para valorar la pureza de la muestra (la relación A260/A280 debe aproximarse a 2). Las muestras de RNA también se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa para comprobar la integridad del RNA y la ausencia de DNA genómico contaminante.

#### 6.3.2. Extracción de RNA de semillas

Se empleó el método descrito por Vicent y Delseny (1999) que se basa en el uso de LiCl para la extracción y precipitación del RNA, seguido de diferentes extracciones fenólicas. Se pesaron 150-200 mg de semillas de *Arabidopsis* y se trituraron en mortero con N<sub>2</sub> líquido. El material triturado se colocó en un microtubo de 2 mL y se agregó 1 mL de buffer de extracción (LiCl 8 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 2%) previamente enfriado. La muestra se homogeneizó y se incubó toda la noche a 4°C en agitación suave. Se centrifugó 5 segundos a 13000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 2mL. El sobrenadante se centrifugó a 13000 rpm durante 30 min a 4°C y se recuperó el precipitado que se lavó con etanol al 70% frío y se resuspendió en 0,5 mL de buffer de solubilización (SDS 0,5%, NaCl 100 mM, EDTA 25 mM pH 8, Tris-HCl 10 mM pH 7,6,  $\beta$ -mercaptoetanol 2%). Se realizaron dos extracciones con el mismo volumen de fenol equilibrado (pH 7,6), una extracción con un volumen de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y una extracción con un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). En todas las extracciones se mezclaron manualmente la fase acuosa y la orgánica, que posteriormente se separaron por centrifugación a 13000 rpm, a 4°C durante 15 min. A la fase acuosa extraída se le añadieron 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 1,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Las muestras se incubaron a -20°C toda la noche y se centrifugaron a 13000 rpm, a 4°C durante 30 min. Se eliminó el sobrenadante y al precipitado con el RNA se añadieron 0,25 mL de acetato de sodio 3 M. Se agitó vigorosamente durante un minuto para resuspenderlo y después se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 10 min. El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 50-100  $\mu$ L de agua tratada con DEPC. El RNA se cuantificó por espectrofotometría mediante NanoDrop y se midió la relación de absorbancia A260/A280. Las muestras de RNA también se

analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa para comprobar la integridad del RNA y la ausencia de DNA genómico contaminante.

### 6.3.3. Síntesis de cDNA

La reacción de síntesis de cDNA mediante transcripción reversa (RT) se realizó a partir de 1 µg de RNA total de cada muestra mediante el kit NZY First-Strand cDNA Synthesis (NZYtech) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción, que estaba compuesta por 10 µL de NZYRT 2X Master Mix (incluye oligo (dT)<sub>18</sub>, hexámeros random, MgCl<sub>2</sub> y dNTPs), 2 µL de NZYRT Enzyme Mix (incluye NZY Reverse transcriptase y NZY Ribonuclease Inhibitor), 1 µg de RNA total y agua tratada con DEPC hasta un volumen de 20 µL, se incubó en un termociclador a 25°C durante 10 min seguido de 30 min a 50°C. Transcurrido este tiempo, se detuvo la reacción calentando la mezcla 5 min a 95°C y después se enfrió en hielo. Por último, se agregó a la mezcla 1 µL de NZY RNase H y se incubó a 37°C durante 20 min. La integridad del cDNA se comprobó amplificando un fragmento de un gen de referencia en cada muestra mediante PCR semicuantitativa: El gen de actina (*Solyc03g078400*) para muestras de tomate y el de ubiquitina UBC21 (*At5g25760*) para muestras de *Arabidopsis*.

### 6.3.4. PCR semicuantitativa

Para la determinar la expresión de los genes *SIASAT1* y *SIASAT8* en el mutante de *Arabidopsis psat-2* se realizó una PCR semicuantitativa utilizando cDNA sintetizado como se especifica en el apartado anterior. La mezcla de reacción se preparó con 5 µL de Green Taq Master mix (Promega), 1 µL de cada primer (10 µM), 1 µL de cDNA diluído 1:10 y agua mQ hasta completar un volumen final de 10 µL. Las condiciones de reacción fueron: 5 min de desnaturalización inicial a 94°C, seguido de 30 a 32 ciclos que incluían 30 seg de desnaturalización a 94°C, 30 seg de hibridación a una temperatura 3°C más baja que la T<sub>m</sub> menor de los primers, 1 min/kb de extensión a 72°C, y una extensión final de 5 min a 72°C. En la Tabla 11 se presentan las secuencias de los primers utilizados en cada caso. Los productos de amplificación resultantes se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

**Tabla 11. Primers para PCR semicuantitativa.**

Gen	Código gen	Nombre	Secuencia
SIASAT1	Solyc11g012260	SAT1 TRANS FW	GACCAAGGTCCACTTTCTGATTC
		SAT1 TRANS RV	GGGCCTAAGGATACGAGTGAC
SIASAT8	Solyc12g089050	SAT4 TRANS FW	CGTGGATCGAAAATACGAGATT
		SAT4 TRANS RV	GAAATTCTTGCATCCATAATTAC
UBC21	At5g25760	AtUBC qPCR F	TCAAATGGACCGCTCTTATC
		AtUBC qPCR R	CTTGGACGCTTCAGTCTGTG

### 6.3.5. PCR cuantitativa (qPCR)

Se utilizó el equipo LightCycler480 (Roche) y el fluoróforo SYBRGreen (Roche). Los primers se diseñaron mediante el programa PrimerQuest de IDT <https://eu.idtdna.com/PrimerQuest> (Owczarzy et al., 2008), seleccionando la opción para diseñar primers para qPCR empleando colorantes intercalados como SYBR®. Cada pareja de primers se diseñó siguiendo los siguientes criterios: hibridación con la secuencia del gen diana en una región cercana al extremo 3'; amplificación de un fragmento de cDNA separado por un intrón en el gen correspondiente; tamaño del amplicón entre 100 y 200 nucleótidos; contenido de GC de 50 a 60%; longitud entre 18 y 24 nucleótidos; Tm comprendida entre 58°C y 63°C; mínima probabilidad de formación de heterodímeros, homodímeros y horquillas. Se determinó la eficiencia de cada pareja de primers para determinar la concentración a la cual la amplificación se produce de forma lineal. Se realizó una recta de calibración con los valores de Ct obtenidos en la amplificación a partir de diferentes concentraciones de cDNA (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160) con cada pareja de primers, representando el valor de Ct frente al logaritmo de la concentración de la pareja de primers. La eficiencia se calculó empleando la fórmula:  $\text{Eficiencia} = 2^{-10^{(1/\text{pendiente de la recta})}}$ . Un valor igual a 2,0 equivale a una eficiencia del 100% y se aceptaron valores de  $2,0 \pm 0,2$ . Para normalizar la expresión de los genes diana analizados se emplearon como genes de referencia, el gen de actina (Solyc03g078400) en muestras de tomate y el gen de ubiquitina UBC21 (At5g25760) en muestras de Arabidopsis. En la tabla 12 se muestran, respectivamente, los genes de tomate y Arabidopsis cuya expresión fue analizada y las secuencias de los primers utilizados en cada caso.

Tabla 12. Primers para qPCR en muestras de tomate y Arabidopsis.

Gen	Código gen	Nombre	Secuencia
<b>Actina</b>	Solyc03g078400	qPCR.Actin.fw	CCTTCCACATGCCATTCTCC
		qPCR.Actin.rev	CCACGCTCGGTCAGGATCT
<b>SIPSAT1</b>	Solyc09g072710	SIPSAT qPCR FW	TGCTATTGGGATTACGGGAAAG
		SIPSAT qPCR RV	GTGTGACAGGATGTGAGATGTAG
<b>SIASAT1</b>	Solyc11g012260	SIASAT1qPCR-FW	GAAGTTAGTTGAAAATGGTTCTAGTG
		SIASAT1qPCR-RV	TTGACCTTTGTTGGACTTTGC
<b>SIASAT2</b>	Solyc11g012210	SIASAT3.1qPCR-FW	GCTAGCTCGCTTCAGGATT
		SIASAT3.1qPCR-RV	CGGGATCTGGTCCACAATAAC
<b>SIASAT5</b>	Solyc11g012240	SIASAT3.4qPCR-FW	TGGTGGCTAACCGGATTC
		SIASAT3.4qPCR-RV	ACATCATGACTTCACCATTAGGT
<b>SIASAT8</b>	Solyc12g089050	SIASAT4qPCR-FW	ATGGAATCGATACTCATCGAAA
		SIASAT4qPCR-RV	GAAACCACAAATGTACACACAA
<b>UBC21</b>	At5g25760	AtUBC qPCR F	TCAAATGGACCGCTCTTATC
		AtUBC qPCR R	CTTGGACGCTTCAGTCTGTG

Cada reacción de amplificación contenía 2 µl de una dilución 1:10 de cada muestra de cDNA, 0,25 µl de cada primer (10 µM), 5 µl de SYBR Green (Master mix 2X compuesta por DNA polimerasa FastStart Taq y colorante SYBR Green I) y 2,5 µl de agua mQ hasta un volumen final de 10 µl. Se realizaron tres réplicas técnicas para cada muestra y los valores de Ct resultantes se promediaron aceptando una desviación estándar máxima de 0,3 unidades. La cuantificación de los productos de amplificación se realizó a partir de los valores de Ct que se exportaron a una hoja de cálculo estándar. El cálculo de los niveles de expresión de un determinado gen respecto al gen de referencia se llevó a cabo de acuerdo al método comparativo de Ct o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001; Wong & Medrano, 2005). Este método asume la eficiencia de amplificación de los primers como 2 siempre que se esté trabajando en un rango de concentración de primer donde la amplificación se produce de forma lineal.

$$2^{-[(Ct \text{ gen interés} - Ct \text{ gen referencia}) \text{ muestra problema} - (Ct \text{ gen interés} - Ct \text{ gen referencia}) \text{ muestra control}]}$$

## 6.4. Técnicas de clonación

### 6.4.1. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR

El genotipado de plantas transgénicas y la comprobación de los procesos de clonación se realizó por PCR utilizando la Green Taq Master mix (Promega) en una mezcla de reacción que contenía 1  $\mu$ L del DNA molde a una concentración de entre 50-100 ng, 1  $\mu$ L de cada primer (10  $\mu$ M), 5  $\mu$ L de Green Taq Master mix (Promega) y agua destilada estéril hasta completar un volumen final de 10  $\mu$ L. Los primers utilizados para el genotipado se muestran en la tabla 13. Las condiciones de reacción fueron: 5 min de desnaturalización inicial a 94°C, seguido de 30 a 32 ciclos incluyendo 30 seg de desnaturalización a 94°C, 30 seg de hibridación a una temperatura 3°C más baja de la Tm menor de los primers, 1 min/kb de extensión a 72°C, y una extensión final de 5 min a 72°C. Los productos de amplificación resultantes se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

Tabla 13. Primers utilizados para genotipar mutantes por inserción de T-DNA de Arabidopsis.

Gen/secuencia diana	Nombre	Orientación	Secuencia
AtASAT	Pr5	Directo	GGCGAGTTTCATCAAGGCATGG
	Pr6	Reverso	AAGATATGCGGTCAGTTTCCTCCTGA
T-DNA LB <i>asat1-1</i>	o8474	Reverso	ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT
UGT80A2	ugtA2 for	Directo	CTCTCCTTCACTTTCTGGGATTC
	ugtA2 rev	Reverso	TGGGATTGGTCTCAAGTTCTTC
UGT80B1	SGT81-LP	Directo	TGGGTAGAGCCATTTTCATTTG
	SGT81-RP	Reverso	ATGTAGGTGGTTTGTGTGCTGC
T-DNA LB	LBa1	Directo	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG

#### 6.4.2. Amplificación de fragmentos de DNA para clonación

Para amplificar fragmentos destinados a ser clonados se utilizó la polimerasa de alta fidelidad AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Thermo Fisher Scientific) en una mezcla que contenía 5  $\mu\text{L}$  de Tampón II 10X AccuPrime™, 1  $\mu\text{L}$  de cada primer a una concentración 10  $\mu\text{M}$ , el volumen correspondiente a 50 ng del DNA molde, 1.0 unidades (0,2  $\mu\text{L}$ ) de AccuPrime High Fidelity DNA polimerasa, y el volumen de agua destilada estéril necesaria para un volumen final de reacción de 50  $\mu\text{L}$ . Las condiciones de reacción utilizadas normalmente fueron: 5 min de desnaturalización inicial a 94°C, seguido de 22 a 25 ciclos incluyendo 30 seg de desnaturalización a 94°C, 30 seg de hibridación a una temperatura 3°C más baja que la  $T_m$  menor de los primers, 1 min/kb de extensión a 68°C, y una extensión final de 5 min a 68°C.

#### 6.4.3. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de interés se separaron e identificaron por electroforesis en gel de agarosa. Se aisló la porción de gel que contenía los fragmentos con la ayuda de un bisturí y se recolectaron en tubos Eppendorf. El DNA se purificó empleando el kit Gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 6.4.4. Clonación en el vector pGEM-T Easy

El vector pGEM®-T Easy (Promega) es un vector lineal con una desoxitimidina (T) protuberante en ambos extremos 3'. Estas protuberancias T en el sitio de inserción mejoran en gran medida la eficiencia de la ligación de los productos de PCR ya que evita la recircularización del vector y proporcionar extremos compatibles para productos de PCR generados por algunas polimerasas termoestables. Es el caso de la polimerasa de alta fidelidad (AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity) empleada, que añade una sola desoxiadenosina (A) al extremo 3' del producto facilitando la ligación por complementariedad de bases.

El producto de PCR purificado (Apartado 6.4.3) se mezcló con en el vector pGEM®-T Easy con una relación molar inserto-vector 3:1 y siguiendo las indicaciones del fabricante. Este es un vector de rápida ligación, donde las reacciones deben incubarse un mínimo de 1 h a temperatura ambiente, aunque este periodo puede extenderse para incrementar la eficiencia de la ligación. Generalmente, una incubación durante toda la noche a 4°C produce el número máximo de transformantes. Una vez completada la ligación, se utilizaron 1-5  $\mu\text{L}$  de la ligación para transformar células competentes Top10.

La inactivación por inserción del fragmento clonado en la secuencia que codifica para el péptido  $\alpha$  de la enzima  $\beta$ -galactosidasa en el vector pGEM®-T Easy, permite la identificación de recombinantes por selección de colonias azules o blancas en placas

con IPTG y X-Gal. Es por esto que se utilizó como medio de selección LB sólido suplementado con IPTG (0,5 mM), X-Gal (0,08 mg/mL) y carbenicilina (0,1 mg/mL). Un mínimo de 10 colonias blancas se seleccionaron para comprobar mediante PCR de colonia la presencia del plásmido recombinante. Partiendo de colonias positivas, se preparó un cultivo líquido para purificar el plásmido de interés (Miniprep) y los insertos se verificaron por secuenciación empleando los primers M13 FW (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') y M13 RV (5'-AACAGCTATGACCATG-3').

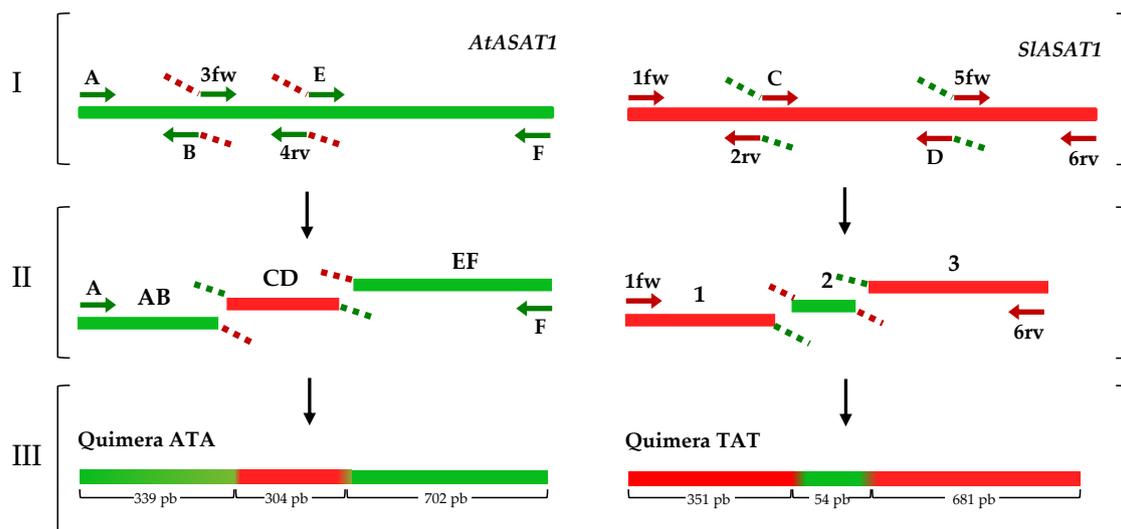
#### **6.4.5. PCR solapante para la construcción de secuencias quiméricas codificantes para proteínas ASAT.**

Las secuencias quiméricas ATA (Arabidopsis-Tomate-Arabidopsis) y TAT (Tomate-Arabidopsis-Tomate) se generaron por PCR solapante utilizando fragmentos de DNA obtenidos de forma paralela como se describe a continuación.

A partir de los vectores pENTR-AtASAT1 y pENTR-SIASAT1 (Lara et al., 2018) se amplificaron los fragmentos destinados a la construcción de las secuencias codificantes para las proteínas quiméricas ASAT. La amplificación se realizó utilizando polimerasa de alta estabilidad *Pfx50*<sup>TM</sup> (Invitrogen) en una mezcla de reacción conteniendo 5 µL de 10X *Pfx50*<sup>TM</sup> PCR Mix, 1,5 µL del mix dNTP 10 mM, 1,5 µL de cada primer 10 µM, 1 µL de MgSO<sub>4</sub>, el volumen correspondiente a 50 ng del DNA plasmídico molde, 1 µL de polimerasa AccuPrime<sup>TM</sup> Pfx (5 U/µL) y el volumen necesario de agua destilada estéril para llevar la reacción a un volumen final de 50 µL.

Las condiciones de reacción utilizadas normalmente fueron: 5 min de desnaturalización inicial a 94°C, seguido de 22 a 25 ciclos: 30 seg de desnaturalización a 94°C, 30 seg de hibridación a una temperatura 3°C más baja que la T<sub>m</sub> menor de los primers, 1 min/kb de extensión a 68°C, y una extensión final de 5 min a 68°C.

Se generaron productos de PCR conteniendo sitios attB, utilizando los primers "A" y "1 fw" que poseen 4 residuos de guanina en el extremo 5' seguidos del sitio attB1 de 25 pb y a continuación, la secuencia específica del fragmento a amplificar incluyendo el codón ATG de inicio de traducción (indicado en negrita). Los primers "F" y "6 rv" incluyen la secuencia attB2 y la secuencia específica para amplificar la región de interés sin incluir el codón de parada (Tabla 14). Los productos de amplificación resultantes se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.



**Figura 49. PCR solapante.** Los primers diseñados con colas sobresalientes de 9 nucleótidos se indican en el cDNA del gen *AtASAT1* y *SIASAT1* (I). Los fragmentos destinados a la construcción de secuencias quiméricas obtenidos se extendieron y amplificaron por PCR solapante (II). Representación de las secuencias quiméricas obtenidas ATA y TAT (III). Los primers para generar la quimera ATA fueron diseñados de tal manera que el extremo 3' del fragmento AB sea complementario en el extremo 5' del fragmento CD, y a su vez que el extremo 3' del fragmento CD sea complementario del extremo 5' del fragmento EF. Los primers B, C, D y E contienen 18 nucleótidos complementarios a la secuencia molde y 9 nucleótidos como secuencia sobresaliente. La misma estrategia se siguió para generar la quimera TAT.

Para generar la quimera ATA, los fragmentos AB, CD y EF se mezclaron e hibridaron por complementariedad de las colas sobresalientes, y se extendieron y amplificaron por PCR (Figura 49) usando las parejas de primers A y F (Tabla 14). Para ello, se preparó una mezcla compuesta por 5  $\mu\text{L}$  de 10X *Pfx50*<sup>TM</sup> PCR Mix, 1,5  $\mu\text{L}$  del mix dNTP 10 mM, 1,5  $\mu\text{L}$  de cada primer 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgSO}_4$ , 10 ng de cada producto de PCR purificado (AB, DC y EF), 1  $\mu\text{L}$  de *Pfx50*<sup>TM</sup> DNA polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ ) y el volumen necesario de agua destilada estéril para un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ .

Usando esta misma estrategia, pero partiendo de los fragmentos 1, 2 y 3, se generó la quimera TAT usando los primers 1 fw y 6 rv (Tabla 14). En ambos casos, los productos de la PCR final se separaron en gel de agarosa al 1% y la banda correspondiente al tamaño esperado de la quimera se purificó y se secuenció para descartar la presencia de mutaciones. La secuenciación se llevó a cabo en el servicio de secuenciación del CRAG, utilizando el kit "BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing" (Applied Biosystems).

Tabla 14. Primers para la generación de las quimeras ATA y TAT.

Quimera ATA ( <i>Arabidopsis</i> – <i>Tomate</i> – <i>Arabidopsis</i> )		
Fragmento	Nombre	Secuencia
AB	A	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGAGTTTCATCAAGG
	B	AGATTTTGTCTGAATCTTGATGGGCAAG
CD	C	AAGATTCAGCAAAAATCTCAAATTTAT
	D	ATAAATCAACTTTTGACCTTTGTTGGA
EF	E	GGTCAAAAGTTGATTTATAACCATAAAG
	F	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAAAAGATATGCGGTCAGTTCC

Quimera TAT ( <i>Tomate</i> – <i>Arabidopsis</i> – <i>Tomate</i> )		
Fragmento	Nombre	Secuencia
1	1 fw	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAGGGAAATATTTAAAGATG
	2 rv	TGGGCTCAGTTGAATCTTGATAGGTAAACA
2	3 fw	CAAGATTCAACTGAGCCCAAAACCTAC
	4 rv	GCCATAATTTAAAGGACCCTCTGTGGATCC
3	5 fw	GAGGGTCCTTTAAATTATGGCATAAAG
	6 rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCTCGAAAATGTTGATTTACAGC

#### 6.4.6. Clonación empleando el sistema Gateway

La Tecnología Gateway® usa el sistema de recombinación del bacteriófago lambda para facilitar la clonación y la transferencia de fragmentos de DNA entre vectores (Hartley et al., 2000). Para la clonación por recombinación, los fragmentos de interés deben estar flanqueados por sitios att modificados. Los vectores Gateway® contienen dos sitios att que flanquean un casete que contiene el gen *ccdB* para la selección negativa (presente en los vectores donador, de destino y de entrada) y el gen de resistencia al cloranfenicol (CmR) para contraselección (presente en los vectores donador y de destino). Después de la reacción de recombinación BP o LR, el casete *ccdB* es reemplazado por el fragmento de interés generando clones de entrada y clones de expresión, respectivamente. Las células transformadas con vectores portadores del gen *ccdB* no pueden crecer, permitiendo la selección eficiente de las colonias portadoras de los plásmidos deseados.

Dos reacciones de recombinación constituyen la base de la Tecnología Gateway®. La reacción BP catalizada por la mezcla de enzimas BP Clonase™, permite la recombinación de un fragmento de DNA portador de secuencias attB (producto attB-PCR o un clon de expresión attB linearizado) con un vector portador de secuencias attP

(vector donador). Este producto de recombinación genera la secuencia attL y se denomina clon de entrada. La reacción LR facilita la recombinación de un vector portador de secuencias attL (clon de entrada) con un vector portador de secuencias attR (vector de destino), generando el producto con secuencias attB denominado vector de expresión. Esta reacción está catalizada por la mezcla de enzimas LR Clonase™.

Los clones de entrada conteniendo los cDNA que codifican las quimeras ATA y TAT se obtuvieron clonando los productos de PCR solapante en el vector pDONR207™ 1:1 empleando el kit Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen) con una relación molar inserto-vector. Se incubó la reacción a temperatura ambiente 1 h y se transformaron células competentes *E.coli* TOP 10, como se indica en el apartado 6.4.7. Las colonias resistentes a gentamicina se confirmaron por PCR de colonia con las parejas de primers A - F y 1 fw - 6 rv. Las colonias positivas se inocularon en medio LB líquido para purificar los plásmidos recombinantes mediante Miniprep. El correcto mantenimiento del marco de lectura entre las secuencias codificantes para las quimeras ATA y TAT, se confirmó mediante secuenciación con los primers que se indican en la tabla 15 (PDONR207-F y PDONR207-R). Para descartar específicamente mutaciones en la región central de la quimera ATA, se secuenciaron también los plásmidos con primers Arab ASAT1-Tomate FW y Arab ASAT1-Tomate RV (Tabla 15).

Para la obtención de las quimeras ATA y TAT con la GFP fusionada en C-terminal, los fragmentos ATA y TAT se transfirieron al vector binario pEarleyGate103, mediante el kit Gateway™ LR Clonase™ II (Invitrogen). Células competentes *E. coli* Top10 se transformaron con 5 µL de la reacción LR. Las colonias resistentes a kanamicina se comprobaron por amplificación de la región de fusión a GFP por medio de PCR de colonia con los primers E/5 fw (Tabla 14) y GFP rev (Tabla 15). De las colonias positivas se realizó un cultivo líquido suplementado con kanamicina, para después extraer DNA plasmídico y enviar una muestra a secuenciar y así descartar mutaciones.

**Tabla 15. Primers para comprobación de secuencias codificantes de las quimeras de ASAT.**

Quimera	Nombre	Secuencia
ATA	Arab ASAT1-Tomate FW	CGCGGTCCTCTCTCTCAAACC
	Arab ASAT1-Tomate RV	GGATCGCGTAGAGAGTCAGC
ATA / TAT	PDONR207-F	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC
	PDONR207-R	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC
ATA / TAT	GFP rev	GTAGTGACAAGTGTGGCCACGG

#### **6.4.7. Transformación de *E. coli* por shock térmico**

Alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  de células competentes almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  se descongelaron en hielo durante 10 min y enseguida se añadieron entre 5 y 10 ng de DNA plasmídico o bien, 5-10  $\mu\text{L}$  de las mezclas de ligación o recombinación Gateway. Se dejaron reposar en hielo durante 5 min y se incubaron en baño de agua a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 30 seg. Inmediatamente después se incubaron en hielo durante 2 min y se les añadieron 300  $\mu\text{L}$  de medio LB sin antibiótico. Tras mezclar con suavidad, se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación (180 rpm) durante un mínimo de 1 hora. A continuación, se sembraron 100  $\mu\text{L}$  del cultivo por extensión en superficie en placas de medio LB sólido suplementado con los antibióticos de selección a las concentraciones apropiadas, y se incubaron toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ . Las colonias transformadas con los plásmidos de interés se identificaron mediante PCR de colonia.

#### **6.4.8. Análisis de clones recombinantes por PCR de colonia**

Se seleccionaron al azar 10 colonias bacterianas crecidas en placa que se transfirieron con una punta de pipeta estéril a una nueva placa con el mismo medio que la original para replicar la colonia y conservarla. Luego se frotó con la misma punta el fondo de un tubo para PCR a fin de transferir el resto de la colonia, cuyo material genético serviría de molde en la reacción de PCR. A continuación se añadió a cada tubo una mezcla de reacción conteniendo 1  $\mu\text{L}$  de cada primer (10  $\mu\text{M}$ ), 5  $\mu\text{L}$  de Green Taq Master mix (Promega) y 3  $\mu\text{L}$  de agua mQ para tener un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . Las condiciones de reacción fueron: 5 min de desnaturalización inicial a  $94^{\circ}\text{C}$ , seguido de 30 a 32 ciclos incluyendo 30 seg de desnaturalización a  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 seg de hibridación a una temperatura  $3^{\circ}\text{C}$  más baja de la  $T_m$  de los primers, 1 min/kb de extensión a  $72^{\circ}\text{C}$ , y una extensión final de 5 min a  $72^{\circ}\text{C}$ . Los productos de amplificación resultantes se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

#### **6.4.9. Miniprep para la extracción de DNA plasmídico**

Se inocularon 5 mL de medio LB con los antibióticos de selección apropiados (10 mL para vectores de bajo número de copias) con una colonia aislada conteniendo el vector de interés y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación a 180 rpm durante toda la noche. Las células se recolectaron por centrifugación a 14000 rpm durante 30 seg y se purificó el DNA de los plásmidos mediante el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification systems (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante.

## 6.5. Expresión transitoria de proteínas en *Nicotiana benthamiana*

### 6.5.1. Transformación de *A. tumefaciens*

Alícuotas de 100  $\mu$ L de células competentes de *A. tumefaciens* (GV3101, EHA105) almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  se descongelaron en hielo durante 10 min y se les añadió el volumen correspondiente a 500 ng de DNA plasmídico. Se mezclaron suavemente y se incubaron en hielo durante 5 min. Enseguida se sumergió el tubo en nitrógeno líquido, donde se mantuvo durante 5 min. La mezcla se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 5 min y, a continuación, se añadieron 300  $\mu$ L de medio YEB, y el cultivo se incubó durante 4 h a  $28^{\circ}\text{C}$  en agitación a 220 rpm. Alícuotas de 100  $\mu$ L se sembraron en placas de medio YEB sólido con los antibióticos de selección adecuados (Tabla 10), que se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$  hasta la aparición de las colonias de células transformadas (durante 48 h aproximadamente).

### 6.5.2. Agroinfiltración de *N. benthamiana*

A partir de un cultivo en placa de *A. tumefaciens* portador del plásmido de interés, se inocularon 3 mL de medio YEB suplementado con los antibióticos de selección adecuados, y el cultivo se incubó a  $28^{\circ}\text{C}$  en agitación a 180 rpm durante 16 h. A continuación, se inocularon 30 mL de medio YEB fresco suplementado con los antibióticos de selección con 30  $\mu$ L del cultivo saturado, y se incubó en las mismas condiciones alcanzar una  $\text{OD}_{600}$  de 0,5 (aproximadamente 4 h). Este cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min y el precipitado de células se resuspendió en 8 mL del medio de agroinfiltración (MES 10 mM pH 5,5,  $\text{MgCl}_2$  10 mM y acetosiringona 150  $\mu$ M), dejándose en reposo a temperatura ambiente entre 3 y 4 h. Simultáneamente, se preparó el cultivo de *Agrobacterium* con el plásmido que codifica la proteína supresora de silenciamiento HC-Pro (helper component proteinase), cuya expresión en tabaco permite mitigar el silenciamiento post-transcripcional inducido por la introducción de transgenes. Justo antes de la agroinfiltración, se mezclaron volúmenes iguales de dos cultivos de *Agrobacterium* (cada uno con  $\text{OD}_{600} = 0,5$ ). A continuación, se empleó una jeringa de 1 mL sin aguja para infiltrar la suspensión de *Agrobacterium* en la cara abaxial de las hojas de una misma planta, y se marcó con rotulador permanente el contorno de las zonas infiltradas para su posterior identificación. Después de 3 días, las regiones infectadas se analizaron mediante microscopía láser confocal.

### 6.5.3. Análisis de la localización subcelular

Los plásmidos recombinantes que codifican las proteínas quiméricas fusionadas a GFP (pEG103-ATA y pEG103-TAT) bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S se transformaron en *Agrobacterium* EHA105 y se agroinfiltraron en hojas de *N. benthamiana*. Se recolectó un área de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de las regiones de interés de las hojas infiltradas con ayuda de un bisturí, se colocaron en un portaobjetos y se cubrieron con una gota de agua y un cubreobjetos. Las proteínas de fusión expresadas transitoriamente en *N. benthamiana* se observaron mediante microscopía láser confocal empleando un microscopio Olympus FV1000 con un objetivo de inmersión en agua 60X apertura numérica 1.20. Se utilizó un láser de argón para la excitación a una longitud de onda de 488 nm de las proteínas YFP y GFP. La ventana de emisión para la visualización de la fluorescencia se fijó entre 500-545 nm. Se utilizó el software FV10-ASW (Olympus) para la captura de imágenes.

## 6.6. Generación de plantas de tomate transgénicas con genes ASAT1 y PSAT1 inactivados

### 6.6.1. Diseño de gRNA y vectores CRISPR/Cas9

La inactivación de los genes de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) SIPSAT1 y SIASAT1 se llevó a cabo utilizando la tecnología de edición génica CRISPR/Cas9. Las construcciones fueron diseñadas para crear mutaciones en las secuencias codificantes de los genes SIASAT1 y SIPSAT1 al expresar el correspondiente RNA guía (single guide RNA, sgRNA) junto con la endonucleasa Cas9. Las secuencias de los sgRNA se diseñaron utilizando el servidor web *Breaking-Cas* (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas>, Oliveros et al., 2016). Para el diseño de los RNA guía se usaron como molde las secuencias de los genes SIASAT1 (Solyc11g012260) y SIPSAT1 (Solyc09g072710.2).

Los plásmidos CRISPR/Cas (*Streptococcus pyogenes*) fueron obtenidos del Instituto de Tecnología Karlsruhe (Karlsruhe Institute of Technology, KIT). El plásmido pDE-CAS9 es un vector que permite expresar la nucleasa CAS9 bajo el control del promotor constitutivo Ubi4-2, contiene el gen ccdB, el gen SpecR que confiere resistencia a espectinomocina en bacterias y el gen BAR que confiere resistencia a PPT en plantas. En este plásmido el gen BAR se reemplazó por el gen de resistencia a kanamicina (NPTII) mediante digestión con la enzima de restricción *HindIII* y la subsecuente ligación para generar el vector pDE-Cas9-Kan<sup>R</sup>. El plásmido pEn-Chimera es el vector que permite expresar el sgRNA bajo el control del promotor U6-26 y contiene el gen Amp<sup>R</sup> que confiere resistencia a ampicilina en bacterias. La hibridación de las parejas de primers correspondientes a cada construcción (Tabla 16) se realizó en una mezcla de reacción

conteniendo 2  $\mu\text{L}$  de cada primer (50  $\mu\text{M}$ ) y 46  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril. Se incubó durante 5 min a 95°C y se enfrió a temperatura ambiente durante 20 min.

**Tabla 16. Primers para la generación de sgRNAs.**

Nombre	Secuencia	Gen diana
ASAT-1 CRISPR 1F	ATTGGGCTTGGCCCGCGGGCTTCT	SIASAT
ASAT-1 CRISPR 1R	AAACAGAAGCCCCGCGGGCCAAGCC	
PSAT CRISPR-F3	ATTGGGCGATTACTCGAAGCTGTC	SIPSAT
PSAT CRISPR-R3	AAACGACAGCTTCGAGTAATCGCC	

El vector pEn-Chimera se digirió con la enzima de restricción *Bbs*I para generar los correspondientes extremos protuberantes. Para ello, se preparó una mezcla con 2  $\mu\text{L}$  de pEn-Chimera (3  $\mu\text{g}$ ), 6  $\mu\text{L}$  de buffer G 10X, 3  $\mu\text{L}$  de enzima *Bbs*I (Thermo Scientific™, 10 U/ $\mu\text{L}$ ) y 49  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril, y se incubó la reacción durante 2 h a 37°C. El plásmido linearizado se purificó y su concentración se ajustó a 50 ng/ $\mu\text{L}$ .

Para generar los vectores pEn-Chimera/ASAT y pEn-Chimera/PSAT, se mezclaron 2  $\mu\text{L}$  del plásmido pEn-Chimera lineal (100 ng) con 6  $\mu\text{L}$  de la solución de primers hibridados, 1  $\mu\text{L}$  de T4 ligasa (1 U/ $\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de buffer T4 DNA Ligasa (Thermo-Scientific) y 9  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, y la mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. La ligasa se inactivó a 70°C durante 5 min y se usaron 5  $\mu\text{L}$  de la reacción de ligación para transformar células competentes *E.coli* Top10 por el método de shock térmico. Se comprobó presencia del inserto por PCR de colonia con los primers ASAT-1 CRISPR 1F/PSAT CRISPR-F3 (Tabla 16) y SS129 REV (Tabla 17) en un mínimo de 10 colonias obtenidas en la transformación. De las colonias que contenían el inserto se realizó un cultivo líquido LB de 3 mL suplementado con espectinomicina, que se incubó a 37°C en agitación toda la noche. Se purificó el DNA plasmídico de los cultivos líquidos tal y como se ha descrito anteriormente y se confirmó la secuencia de los sgRNA mediante secuenciación con el primer SS129.

Para la reacción de recombinación se utilizaron 3  $\mu\text{L}$  del vector pEn-Chimera/ASAT o pEn-Chimera/PSAT (50 ng/ $\mu\text{L}$ ), 3  $\mu\text{L}$  de pDE-Cas9-Kan<sup>R</sup> (50 ng/ $\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de buffer TE (Tris-HCl 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8) y 2  $\mu\text{L}$  de LR clonasa II. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante un mínimo de 2 h. Finalmente se agregó 1  $\mu\text{L}$  de proteinasa K y se incubó a 37°C durante 10 min. Con 5  $\mu\text{L}$  de la reacción se transformaron células competentes de *E. coli* Top10 y en las colonias obtenidas se comprobó la presencia de los plásmidos recombinantes por PCR de colonia utilizando los primers que amplifican un fragmento del terminador y del promotor AtU6-26 (Seq CRISPR FW y Seq CRISPR RV, Tabla 17). A partir de las colonias positivas se realizaron cultivos líquidos en 3 mL de LB suplementado con espectinomicina para

purificar los plásmidos pDE-Cas9 ASAT1 y pDE-Cas9 PSAT1. Los plásmidos resultantes se utilizaron para transformar *A. tumefaciens* GV3101 y, posteriormente, plantas de tomate.

Tabla 17. Primers para la comprobación de construcciones CRISPR/Cas9.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Dirección
Seq CRISPR FW	ACAGTCTTTCACCTCTCTTTGG	Directo
Seq CRISPR RV	GGCCTGCTTCTCTTTCA	Reverso
SS129 REV	CACAGGAAACAGCTATGAC	Reverso

### 6.6.2. Transformación de cotiledones de tomate

Los cultivos de *Agrobacterium* para la transformación se prepararon como se ha descrito para la infiltración de hojas de *N. benthamiana* (Apartado 6.5.2) con los antibióticos de selección adecuados (rifampicina 100 mg/L, gentamicina 30 mg/L y kanamicina 25 mg/L), con la diferencia que el precipitado final de células se resuspendió con 30 mL de medio KCMS líquido (4,3 g de sales MS con vitaminas, sacarosa 20 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  200 mg/L, pH 5,8, tiamina 0,9 mg/L, ácido 2,4-diclorofenoxiacético 2 mg/L, kinetina 1 mg/L, acetosiringona 200  $\mu\text{M}$ ).

Las semillas de tomate cv Micro-Tom se germinaron en medio 0,5 MSO en jarras estériles (Apartado 6.1.3). Luego de 10 días a 25°C en condiciones de día largo, los cotiledones se cortaron por la mitad eliminando el ápice, se colocaron en placas de Petri con medio KCMS sólido (agar 8 g/L) con el envés orientado hacia el medio de cultivo, y se incubaron en oscuridad a 25°C durante 24 h. Los cotiledones se transfirieron del medio KCMS sólido a una placa de Petri de vidrio estéril a la que se añadió la correspondiente suspensión de *Agrobacterium* y se agitó a 50 rpm durante 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se eliminó el medio con *Agrobacterium* y los cotiledones se secaron sobre papel de filtro estéril, depositándose de nuevo en medio KCMS sólido. Se incubaron durante 48 h a 25 °C en oscuridad y se transfirieron a medio de selección 2Z (sales MS 1x, sacarosa 30 g/L, vitaminas Nitsch [biotina 0,05 mg/L, ácido fólico 0,5 mg/L, glicina 2 mg/L, inositol 100 mg/L, piridoxina 0,5 mg/L, tiamina 0,5 mg/L, ácido nicotínico 5 mg/L], zeatina 2 mg/L, timentina 250 mg/L, kanamicina 100 mg/L y agar 8 g/L, pH 5,8). Tras 15 días de incubación a 25°C en condiciones de día largo, los cotiledones sanos se transfirieron a medio 2Z fresco. En este punto empezó la formación de callos. Cada 15 días se repitió la transferencia a medio 2Z fresco de los callos con potencial para desarrollar explantes: apariencia sana, color blanco con áreas verdes y primeros indicios de diferenciación de tejido. De ser necesario, se eliminaron con un bisturí estéril las partes de tejido necrótico antes de

pasar los callos al medio nuevo. Una vez alcanzada la formación de tallo y hoja, los explantes se limpiaron para eliminar restos de callo y se transfirieron a jarras de cultivo *in vitro*, colocando un máximo de 5 explantes por jarra, conteniendo medio de enraizamiento (sales MS 0,5x, sacarosa 10 g/L, vitaminas Nitsch, timentina 75 mg/L, kanamicina 100 mg/L, pH 5,8, agar 8 g/L). En cuanto las plántulas desarrollaron raíces suficientes y la parte aérea medía alrededor de 4-5 cm se extrajeron del medio, se lavó la raíz con agua corriente para eliminar residuos de medio y callo, y se transfirieron a macetas pequeñas tal y como se describe en el Apartado 6.6.3. Seguidamente, las plantas se transfirieron al invernadero y se sometieron al mismo proceso de aclimatación descrito en dicho apartado.

### **6.6.3. Aclimatación de plantas de tomate procedentes de cultivo *in vitro***

Las plántulas se extrajeron del medio y se lavó la raíz con agua corriente para eliminar residuos de medio y callo. Enseguida se sembraron en sustrato (Klasmann TS2) previamente humedecido y contenido en macetas pequeñas, que se dispusieron en una bandeja con 1 cm de agua y se taparon con una cabina de mini-invernadero cerrada para mantener la humedad en condiciones de día largo (16 h día/8 h noche) a 26-28°C (día) y 22-24°C (noche). Una semana después se abrió una ventanilla de la tapa de la cabina de mini-invernadero y una semana más tarde se abrió la otra, y tras una semana más se levantó parcialmente la tapa para permitir la homogeneización gradual de las condiciones de temperatura y humedad en el interior de la cabina con las del invernadero. Luego se retiró completamente la tapa y las plantas se transfirieron a macetas grandes como se describe en el Apartado 6.1.2.

### **6.6.4. Extracción de DNA genómico de hojas de tomate**

Cuando las plantas habían desarrollado dos pares de hojas verdaderas, se colectó un foliolo de la primera hoja en tubos Eppendorf de 2 mL conteniendo un par de balines de vidrio, se congelaron inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido y se trituró el tejido utilizando el TissueLyser II (Qiagen). A cada muestra se le añadieron 600 µL de tampón de extracción frío (Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM, pH 8) y 80 µL de SDS al 10% (p/v). Se agitaron vigorosamente durante 4 min y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Se añadieron 180 µL de NaAc 3 M (pH 5,2), se agitaron las muestras de nuevo y se incubaron en hielo durante 30 min. Las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. Se añadió el mismo volumen de isopropanol, se mezcló y se incubó en hielo durante 30 min. Se centrifugó durante 10 min a 10000 rpm, se descartó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar a 65°C en un bloque térmico. A continuación, se resuspendió en 375 µL de Tris-HCl 10 mM (pH 8) y se le añadió un volumen de solución CTAB (CTAB 2% p/v, NaCl 2 M, EDTA 0,05 M, Tris-HCl 0,2 M, pH 8), para luego incubarse durante 15 min a

65°C. Se añadieron 375 µL de cloroformo, se mezcló y se centrifugó durante 5 min a 14000 rpm a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa y se le añadió un volumen de isopropanol. Se incubó a -20°C por un periodo mínimo de 2 h, transcurrido el cual se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar a 65°C en un bloque térmico. Finalmente, el DNA genómico se resuspendió en 100 µL de agua mQ estéril y se determinó la concentración mediante un espectrofotómetro NanoDrop.

### 6.6.5. Detección de mutaciones inducidas por CRISPR/Cas9

A partir de las plantas transformantes obtenidas se extrajo DNA genómico siguiendo el protocolo descrito en el Apartado anterior. La presencia del transgen se detectó por PCR con los pares de primers que amplifican un fragmento del promotor AtU6-26 (Tabla 17). De muestras de DNA genómico de aquellas plantas donde se detectó el transgén, se amplificó por PCR una región de alrededor de 300 pb que incluye el sitio diana del sgRNA con polimerasa de alta fidelidad (Apartado 6.4.2) con los primers que se muestran en la tabla 14. Los productos de amplificación resultantes se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

**Tabla 18. Primers para genotipado de plantas de tomate transgénicas generadas por CRISPR/Cas9.**

Gen	Código gen	Nombre	Secuencia
SIASAT	Solyc11g012260	ASAT crispr genotip FW	GCAAAGTCCAACAAAGGTCAAAAG
		ASAT crispr genotip RV	TATTCGCGGAGAGGCTTAGA
SIPSAT1	Solyc09g072710	Crispr PSAT Genot FW	CCAATCCCAGCGGCAAAAAGTC
		Crispr PSAT Genot RV	AGTGTCGAGCCAGACTAAATCG

Una vez comprobada la amplificación por electroforesis, se purificaron los productos de PCR y se clonaron en el vector pGEM®-T Easy (Promega). A partir de un mínimo de 10 colonias positivas de cada línea transgénica, se realizó un cultivo líquido y se extrajo el DNA plasmídico (miniprep). Para identificar las mutaciones las muestras se secuenciaron con los primers M13 FW y M13 RV (Apartado 6.4.4) y se analizaron los resultados con el programa Serial Cloner versión 2.6.1 (Perez, 2004).

Para estimar de forma rápida la eficiencia de edición e identificar el tipo de indels (inserciones y deleciones) predominantes producidas por CRISPR/Cas en plantas de generaciones posteriores a las analizadas por clonación en el vector pGEM®-T Easy, se analizaron las secuencias de productos de PCR usando la herramienta bioinformática TIDE (Brinkman et al., 2014). Para este cometido, los productos de PCR correspondientes a la región diana del sgRNA se enviaron a secuenciar con los primers "ASAT crispr genotip FW" o "Crispr PSAT Genot FW" (Tabla 18).

### 6.7. Análisis de embriones

Antes de la tinción con sales de tetrazolio, las semillas se pre-acondicionaron para obtener una penetración adecuada de la solución y prevenir el daño de los embriones. Las semillas se hidrataron entre varias capas de papel secante humedecido con agua destilada durante 18 h a 37°C. Posteriormente, la cubierta de las semillas se pinchó con una aguja hasta un tercio de la semilla, entre el micrópilo y el embrión. Las semillas se colocaron en una placa de 12 pocillos, se cubrieron con 5 mL de TZ 0,1% p/v (cloruro de trifeniltetrazolio, Sigma) y se incubaron durante toda la noche en oscuridad a 37°C. Por último, la solución de TZ se eliminó y las semillas se enjuagaron con agua fría. Para la observación de los embriones, las semillas se cortaron longitudinalmente con un bisturí y el embrión se extrajo con unas pinzas finas y se observó al microscopio con un objetivo de 40X. Los embriones se clasificaron como viables y no viables basándose en la tinción.

### 6.8. Tinción de cuerpos lipídicos

Los cuerpos lipídicos en hoja de tomate se tiñeron con TopFluor® Cholesterol para visualizarlos *in situ* (Zhou et al., 2019) y se observaron mediante microscopía láser confocal empleando un microscopio Olympus FV1000.

Se prepararon discos de 0,5 cm de diámetro a partir de hojas frescas, se transfirieron a una jeringa de 20 mL conteniendo 2 mL de la solución TopFluor® Cholesterol 10  $\mu$ M (Avanti Polar Lipids, diluido de una solución stock 0,578 mM en DMSO) conteniendo 30  $\mu$ M de metil- $\beta$ -ciclodextrina (diluido de una solución stock 30 mM en etanol 95%) y se infiltraron bajo presión negativa tirando del émbolo durante 30 s. Después de recuperar la presión atmosférica, los discos de hoja se mantuvieron durante 4 h en oscuridad antes de observarlos al microscopio.

Los discos teñidos se colocaron en un portaobjetos y se cubrieron con una gota de agua y un cubreobjetos. Los cuerpos lipídicos se observaron con un objetivo de inmersión en agua 60X apertura numérica 1,20. Para detectar la señal de la sonda TopFluor se utilizó un láser de argón para la excitación a una longitud de onda de 488 nm. La ventana de emisión para la visualización de la fluorescencia se fijó entre 490-520 nm. La captura de imágenes se realizó con el software FV10-ASW (Olympus) en modo Z-stack. Los cuerpos lipídicos se contaron en cada imagen con el programa ImageJ 1.48v y se promedió por área de hoja.

### 6.9. Evaluación de la respuesta a estrés salino en plantas transgénicas de tomate

Se germinaron semillas estériles de las plantas transgénicas y wild type en placas con medio sólido 0,5 MSO (Apartado 6.1.3). Plántulas de 8-12 días se transfirieron a medio de cultivo semisólido MSO (2,2 g/L de sales basales Murashige-Skoog [MS], vitaminas Gamborg B5 [inositol 100 mg/L, ácido nicotínico 1 mg/L, piridoxina 1 mg/L y tiamina 1 mg/L], agar 4 g/L, pH 5,7-5,9) y de dejaron crecer en condiciones de día largo (16 h luz/8 h oscuridad) con una irradiación de  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a  $24^{\circ}\text{C}$  durante una semana. Posteriormente, las plántulas se transfirieron a jarras de vidrio con 50 mL de medio líquido MSO. Para cada línea de estudio se utilizaron 3 jarras con 4 plántulas y con medio de cultivo líquido MSO suplementado con NaCl 50 mM. Como control de crecimiento se utilizaron 3 jarras con el mismo número de plántulas con medio líquido MSO sin NaCl. Las jarras con las plantas se incubaron en condiciones de día largo (16 h luz/8 h oscuridad) a  $24^{\circ}\text{C}$  y cada 3 días se reemplazó el medio del cultivo; primero con MSO + NaCl 100 mM y luego con MSO + NaCl 150 mM. A su vez, el medio en las jarras control se reemplazó con medio líquido fresco MSO sin NaCl.

Además de realizarse los experimentos in vitro, la respuesta a estrés salino se evaluó también en plantas creciendo en condiciones hidropónicas. En este caso se sembraron las semillas a 5 mm de profundidad en vermiculita previamente humedecida en macetas pequeñas (5 cm x 5 cm x 6,5 cm), contenidas en una bandeja con agua hasta 1 cm de altura y se cubrieron con película plástica para mantener una humedad relativa del 100%. Las bandejas se llevaron a invernadero en condiciones de día largo (16 h luz/8 h oscuridad) a  $26-28^{\circ}\text{C}$  (día) y  $22-24^{\circ}\text{C}$  (noche). Al cabo de una semana, una vez que empieza la formación de cotiledones, se perforó la cubierta para abrir la ventilación y empezar la aclimatación a las condiciones del invernadero, y una semana después se retiró por completo la cubierta (humedad relativa del 60-70%). Una vez que las plántulas tuvieron los cotiledones completamente expandidos (7-10 días post germinación) se comenzó la irrigación con solución nutritiva Hoagland modificada ( $\frac{1}{2}$ ; diluida en partes iguales con agua). Para realizar el ensayo de estrés salino, se utilizaron 24 plantas wild type y de los mutantes *CR-asat1* y *CR-psat1* con el primer par de hojas verdaderas formadas (aproximadamente 3 semanas post-germinación). Cada grupo fue dividido en dos, uno utilizado como control de crecimiento el cual fue regado con la solución  $\frac{1}{2}$  Hoagland, y el otro grupo de plantas, se regaron con solución nutritiva  $\frac{1}{2}$  Hoagland suplementada con NaCl cuya concentración fue aumentando progresivamente. Para evitar un shock osmótico, primero se regaron con  $\frac{1}{2}$  Hoagland + 50 mM y cada dos días se aumentó 50 mM la concentración hasta llegar a 200 mM. Las plantas se regaron por 33 días con la solución  $\frac{1}{2}$  Hoagland + NaCl 200 mM. Las soluciones se cambiaron después de 5 días para mantener su composición.

## 6.10. Análisis de esteroides

### 6.10.1. Extracción de esteroides de tejido vegetal

Para realizar la extracción de esteroides a partir de tejido vegetal, se recolectaron 3 g de tejido fresco que se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido, se trituró en mortero hasta obtener un polvo fino y se liofilizó. En el caso de la extracción de esteroides de semillas de tomate, se congelaron y trituraron 200-400 mg de semillas en nitrógeno líquido y de la misma forma que para el tejido vegetal, el polvo fino obtenido se liofilizó.

La extracción de los esteroides glucosilados (SG y ASG) y los esteroides libres y esterificados (FE y SE) se realizó por separado, para lo cual se pesaron entre 25 y 30 mg de tejido liofilizado en tubos de vidrio pyrex (10 x 15 mm). Antes de la extracción de la fracción de FE y SE se añadieron 100 µl de una mezcla de colestanol y palmitato de colestanoilo (0,025 mg/mL y 0,05 mg/mL, respectivamente) disueltos en cloroformo:metanol (2:1), y en el caso de la fracción de SG y ASG se añadieron 100 µl del estándar interno compuesto por una mezcla de colestanol y colestanoil-β-D-glucósido (0,05 mg/mL de cada uno) disueltos en cloroformo:metanol (2:1). En ambos casos, se añadieron 3 mL de cloroformo:metanol (2:1) a las muestras y se agitaron vigorosamente durante 2 min. Seguidamente, las muestras se sonicaron en un baño de ultrasonidos (Selecta Ultrasons-H) durante 15 min a temperatura ambiente y se dejaron reposar durante 1 h para asegurar la completa liberación de los esteroides. A continuación, se añadieron 1,5 mL de una solución de NaCl 0,9% (p/v) para conseguir una mejor separación de las dos fases, que se llevó a cabo centrifugando durante 5 min a 5000 rpm y a temperatura ambiente. Se recuperó la fase orgánica (inferior) que contiene los esteroides, con una pipeta Pasteur de vidrio y se transfirió a un tubo de vidrio Pyrex pasándolos por otra pipeta Pasteur con filtro de algodón previamente lavado con metanol. El filtrado se evaporó a sequedad en Speed-Vac. El proceso de extracción se repitió añadiendo otros 3 mL de cloroformo-metanol (2:1) a la fase acuosa remanente, repitiendo la centrifugación y la recuperación de la fase orgánica, la cual se añadió al tubo que contenía el primer extracto. Los extractos se evaporaron a sequedad en Speed-Vac y se resuspendieron en 100 µl de cloroformo-metanol (2:1).

Los extractos obtenidos como se ha descrito, se separaron mediante cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography, TLC). Como fase estacionaria, se utilizaron placas de silicagel 60 F254 20 x 20 (Merk, Darmstadt) que fueron previamente marcadas con lápiz para indicar el origen de la cromatografía (1 cm del borde inferior de la placa) y el frente del disolvente (2 cm del borde superior de la placa). Sobre el origen se marcaron los carriles para la siembra de muestras con 1 cm de separación entre los mismos, incluyendo carril para sembrar los estándares internos correspondientes. Las placas fueron activadas durante 30 min en horno a 80°C. A

continuación, se colocaron sobre un bloque térmico a 60°C ubicado dentro de la campana de extracción para favorecer la evaporación del solvente y con una pipeta Pasteur de vidrio se sembraron los 100 µL de extractos obtenidos. En cada placa se sembraron también 40 µL de la mezcla de los estándares internos disueltos en cloroformo-metanol (2:1 v/v) a una concentración de 0,25 mg/mL; colestanol y palmitato de colestanoilo para la determinación de los FS y SE, y colestanol-β-D-glucósido y palmitoil-glucosilcolestanol para determinar los SG y ASG. Los 3 últimos compuestos fueron sintetizados en el laboratorio del Dr. Rodolfo Lavilla (Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación, Universidad de Barcelona).

La separación de los SE y FE se realizó mediante una cromatografía en dos etapas (Schmidt et al., 2013). La primera, empleando como fase móvil una mezcla de éter de petróleo-dietiléter-ácido acético (35:15:1 v/v), se dejó migrar hasta llegar a una tercera parte de la placa. En este punto, la placa se retiró de la cubeta y se dejó secar completamente antes de continuar con la siguiente cromatografía, en la que la fase móvil fue una mezcla de éter de petróleo-dietil éter (49:1 v/v) que se dejó migrar hasta 2 cm por debajo del borde superior de la placa. La cromatografía para fraccionar los SG y ASG se llevó a cabo con una mezcla de diclorometano-metanol (98:2 v/v). Una vez que el frente de la fase móvil alcanzó el límite fijado, se sacó la placa de la cubeta de cromatografía y se dejó secar en la campana de extracción en posición vertical.

Una vez que las placas estuvieron secas, se rociaron uniformemente con una solución de primulina (Sigma-Aldrich) 0,01% (p/v) y se secaron con aire caliente usando un secador de mano de uso doméstico. Las bandas correspondientes a las diferentes fracciones de esteroides (SE, FS, SG y ASG) se visualizaron mediante una lámpara de luz UV y con la ayuda de una hoja de bisturí se rasparon las placas para recuperar un tubo de vidrio pyrex (10 x 15 mm) la silicagel que contenía los esteroides.

Las fracciones que contenían SE se hidrolizaron con 1,5 mL de KOH 7,5% en metanol, incubando 2 h a 85°C en baño de agua. Posteriormente se agregaron 1,5 mL de NaCl 0,9% (p/v). Las fracciones que contenían los FS se resuspendieron en 1,5 mL de metanol y se incubaron a 85°C durante 2 h. Transcurrido este tiempo, se añadieron 1,5 mL de solución 0,9% NaCl (p/v) y se procedió a extraer los esteroides libres mediante la adición de 3 mL de n-hexano seguida de agitación vigorosa y centrifugación a 5000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. La fase hexánica (superior) que contenía los esteroides se recuperó con una pipeta Pasteur de vidrio y se filtró pasándola por otra pipeta Pasteur con algodón lavado con n-hexano previamente. El filtrado se recolectó en un tubo de vidrio Pyrex (10 x 13 mm) y se evaporó a sequedad en Speed-Vac a temperatura baja. Se reservó el tubo con la silicagel para realizar una segunda extracción de los esteroides que pudieron quedar retenidos. La segunda fase hexánica extraída, se añadió al tubo conteniendo el primer extracto y se evaporó a sequedad.

Las fracciones de polvo de silicagel conteniendo los SG y ASG se trataron con 1,5 mL de una solución metanólica de HCl 2N para hidrolizar los esteroides glucosilados. Después, se agitaron en vortex y se incubaron en baño de agua a 85°C durante 2 h. Luego se añadieron 1,5 mL de solución de NaCl 0,9% (p/v) y en ambas fracciones se realizó la doble extracción con n-hexano. Los extractos se filtraron través de una pipeta Pasteur con algodón previamente lavado con n-hexano y se evaporaron a sequedad en Speed-Vac. Los esteroides en el extracto seco fueron silanizados añadiendo 50 µL de BSTFA (N, O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida, BSTFA-Regisil® Regis Technologies Inc.) y 50 µL de tetrahidrofurano (CHROMASOLV Plus, Honeywell), seguido de incubación a 65°C durante 30 min y secado por evaporación en Speed-Vac. Los esteroides silanizados fueron resuspendidos en 100 µL de isooctano y se transfirieron a viales de vidrio ámbar de 1,5 mL (VWR) con inserto de vidrio de 0,1 mL (VWR).

### 6.10.2. Cuantificación de esteroides por GC-MS

Las muestras fueron analizadas por cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (Gas chromatography–mass spectrometry, GC-MS) en un equipo Agilent 7890A acoplado a un espectrómetro de masas 5975C (Agilent) con una columna capilar TEKNOKROMA TR-450232 (30 m x 0,25 µm de diámetro interno y 0,25 µm de tamaño de partícula). El horno se programó de la siguiente forma: temperatura de inyección de 70°C con un incremento de temperatura de 70°C hasta 255°C a 20°C/min durante 40 min, de 255°C hasta 300°C a 3°C/min durante 5 min. El tiempo total del programa fue de 69,75 min. Se utilizó helio como acarreador a una presión de 8,8085 psi. Con una jeringa de 10 µL, se realizaron inyecciones de 1 µL en modo “Split” (5:1) para las fracciones de FS y SE, y “Splitless” para SG y ASG a una temperatura de 270°C. El espectrómetro de masas se operó en modo “scan” con una fuente de impacto de electrones operada a 70 eV. La temperatura de la fuente de iones fue de 230°C y 280°C en la interfase.

La identificación de los picos obtenidos en los perfiles cromatográficos se realizó en base a los tiempos de retención relativos y la comparación de los espectros de masas de los distintos picos con los de estándares conocidos y/o los disponibles en la base de datos incorporada en el propio software del equipo. El cálculo del contenido de cada esteroide se realizó integrando el área de los picos de interés mediante el programa MSD Productivity ChemStation (Agilent), que se normalizó con respecto al área del pico correspondiente al patrón interno de 5α-colesterol. La concentración de los distintos esteroides se expresó en µg de esteroide por mg de peso seco de tejido, de acuerdo con la fórmula:

$$\frac{\mu\text{g esteroide}}{\text{mg peso seco}} = \frac{\text{área pico esteroide}}{\text{área pico colesterol}} \times \frac{\text{concentración estándar } \mu\text{g}}{\text{peso muestra mg}}$$



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, J. M., & Ecker, J. R. (2006). Moving forward in reverse: Genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in *Arabidopsis*. *Nature Reviews Genetics*, 7(7), 524. <https://doi.org/10.1038/nrg1893>
- Alvarez-Pizarro, J. C., Gomes-Filho, E., de Lacerda, C. F., Alencar, N. L. M., & Prisco, J. T. (2009). Salt-induced changes on H<sup>+</sup>-ATPase activity, sterol and phospholipid content and lipid peroxidation of root plasma membrane from dwarf-cashew (*Anacardium occidentale* L.) seedlings. *Plant Growth Regulation*, 59(2), 125–135. <https://doi.org/10.1007/s10725-009-9395-7>
- Ashraf, M., & Ali, Q. (2008). Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 63(1–3), 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.11.008>
- Athenstaedt, K., & Daum, G. (2006). The life cycle of neutral lipids: Synthesis, storage and degradation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(12), 1355–1369. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6016-8>
- Atkinson, N. J., & Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, 63(10), 3523–3543. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers100>
- Babiychuk, E., Bouvier-Nave, P., Compagnon, V., Suzuki, M., Muranaka, T., Van Montagu, M., ... Schaller, H. (2008). Allelic mutant series reveal distinct functions for *Arabidopsis* cycloartenol synthase 1 in cell viability and plastid biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 3163–3168. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712190105>
- Banaś, A., Carlsson, A. S., Huang, B., Lenman, M., Banaś, W., Lee, M., ... Stymne, S. (2005). Cellular sterol ester synthesis in plants is performed by an enzyme (phospholipid:sterol acyltransferase) different from the yeast and mammalian acyl-CoA:sterol acyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*, 280(41), 34626–34634. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504459200>
- Barry, C. S., & Giovannoni, J. J. (2007). Ethylene and Fruit Ripening. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(2), 143–159. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-9002-y>
- Basyuni, M., Baba, S., Inafuku, M., Iwasaki, H., Kinjo, K., & Oku, H. (2009). Expression of terpenoid synthase mRNA and terpenoid content in salt stressed mangrove. *Journal of Plant Physiology*, 166(16), 1786–1800. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.05.008>
- Beck, J. G., Mathieu, D., Loudet, C., Buchoux, S., & Dufourc, E. J. (2007). Plant sterols in “rafts”: A better way to regulate membrane thermal shocks. *FASEB Journal*, 21(8), 1714–1723. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7809com>
- Behmer, S. T., Olszewski, N., Sebastiani, J., Palka, S., Sparacino, G., Sciarnno, E., & Grebenok, R. J. (2013). Plant phloem sterol content: Forms, putative functions, and implications for phloem-feeding insects. *Frontiers in Plant Science*, 4, 370. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00370>

- Benveniste, P. (2002). Sterol Metabolism. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 1. <https://doi.org/10.1199/tab.0004>
- Benveniste, P. (2004). Biosynthesis and Accumulation of Sterols. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 429–457. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141616>
- Bergensträhle, A., Borgå, P., & Jonsson, L. M. V. (1996). Sterol composition and synthesis in potato tuber discs in relation to glycoalkaloid synthesis. *Phytochemistry*, 41(1), 155–161. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00554-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00554-4)
- Bewley, J. D., Black, M., Bewley, J. D., & Black, M. (1994). Cellular Events during Germination and Seedling Growth. *Seeds*, 147–197. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1002-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1002-8_4)
- Blankemeyer, J. T., White, J. B., Stringer, B. K., & Friedman, M. (1997). Effect of  $\alpha$ -tomatine and tomatidine on membrane potential of frog embryos and active transport of ions in frog skin. *Food and Chemical Toxicology*, 35(7), 639–646. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)00038-0](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00038-0)
- Boronat, A. (2010). The Methylerythritol 4-Phosphate Pathway: Regulatory Role in Plastid Isoprenoid Biosynthesis. In C. A. Rebeiz, C. Benning, H. J. Bohnert, H. Daniell, J. K. Hooper, H. K. Lichtenthaler, ... B. C. Tripathy (Eds.), *The Chloroplast: Basics and Applications* (pp. 119–126). [https://doi.org/10.1007/978-90-481-8531-3\\_8](https://doi.org/10.1007/978-90-481-8531-3_8)
- Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 33(1), 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>
- Boutté, Y., & Grebe, M. (2009). Cellular processes relying on sterol function in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(6), 705–713. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.09.013>
- Bouvier-Navé, P., & Benveniste, P. (1995). Sterol acyl transferase and steryl ester hydrolase activities in a tobacco mutant which overproduces sterols. *Plant Science*, 110(1), 11–19. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(95\)04181-5](https://doi.org/10.1016/0168-9452(95)04181-5)
- Bouvier-Navé, P., Berna, A., Noiriél, A., Compagnon, V., Carlsson, A. S., Banas, A., ... Schaller, H. (2010). Involvement of the Phospholipid Sterol Acyltransferase1 in Plant Sterol Homeostasis and Leaf Senescence. *Plant Physiology*, 152(1), 107–119. <https://doi.org/10.1104/pp.109.145672>
- Bradford, P. G., & Awad, A. B. (2007). Phytosterols as anticancer compounds. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(2), 161–170. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600164>
- Bretscher, M. S., & Munro, S. (1993). Cholesterol and the golgi apparatus. *Science*, 261(5126), 1280–1281. <https://doi.org/10.1126/science.8362242>
- Brinkman, E. K., Chen, T., Amendola, M., & Van Steensel, B. (2014). Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Research*, 42(22), e168–e168. <https://doi.org/10.1093/nar/gku936>
- Brocard, L., Immel, F., Coulon, D., Esnay, N., Tuphile, K., Pascal, S., ... Bréhélin, C. (2017). Proteomic analysis of lipid droplets from Arabidopsis aging leaves brings new insight into their biogenesis and functions. *Frontiers in Plant Science*, 8, 894. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00894>

- Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z. B., & Van Eck, J. (2014). Efficient Gene Editing in Tomato in the First Generation Using the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated9 System. *Plant Physiology*, 166(3), 1292–1297. <https://doi.org/10.1104/pp.114.247577>
- Buhman, K. F., Accad, M., & Farese, R. V. (2000). Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1529(1–3), 142–154. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00144-X](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00144-X)
- Cacas, J. L., Furt, F., Le Guédard, M., Schmitter, J. M., Buré, C., Gerbeau-Pissot, P., ... Mongrand, S. (2012). Lipids of plant membrane rafts. *Progress in Lipid Research*, 51(3), 272–299. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.04.001>
- Cárdenas, P. D., Sonawane, P. D., Pollier, J., Vanden Bossche, R., Dewangan, V., Weithorn, E., ... Aharoni, A. (2016). GAME9 regulates the biosynthesis of steroidal alkaloids and upstream isoprenoids in the plant mevalonate pathway. *Nature Communications*, 7, 10654. <https://doi.org/10.1038/ncomms10654>
- Carland, F. M., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., & Nelson, T. (2002). The identification of CVP1 reveals a role for sterols in vascular patterning. *The Plant Cell*, 14(9), 2045–2058. <https://doi.org/10.1105/tpc.003939>
- Carvalho, R. F., Campos, M. L., Pino, L. E., Crestana, S. L., Zsögön, A., Lima, J. E., ... Peres, L. E. P. (2011). Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: “Micro-Tom” as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-18>
- Castillo, N., Pastor, V., Chávez, Á., Arró, M., Boronat, A., Flors, V., ... Altabella, T. (2019). Inactivation of UDP-Glucose Sterol Glucosyltransferases Enhances Arabidopsis Resistance to Botrytis cinerea. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1162. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01162>
- Catz, D. S., Tandecarz, J. S., & Cardini, C. E. (1985). UDP-glucose: Sterol glucosyltransferase and a steryl glucoside acyltransferase activity in amyloplast membranes from potato tubers. *Journal of Experimental Botany*, 36(4), 602–609. <https://doi.org/10.1093/jxb/36.4.602>
- Chang, C. C. Y., Sun, J., & Chang, T.-Y. (2011). Membrane-bound O-acyltransferases (MBOATs). *Frontiers in Biology*. <https://doi.org/10.1007/s11515-011-1149-z>
- Chapman, K. D., Dyer, J. M., & Mullen, R. T. (2012). Biogenesis and functions of lipid droplets in plants in Thematic review series: Lipid droplet synthesis and metabolism: From yeast to man. *Journal of Lipid Research*, 53(2), 215–226. <https://doi.org/10.1194/jlr.R021436>
- Chaturvedi, P., Mishra, M., Akhtar, N., Gupta, P., Mishra, P., & Tuli, R. (2012). Sterol glucosyltransferases-identification of members of gene family and their role in stress in *Withania somnifera*. *Molecular Biology Reports*, 39(10), 9755–9764. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1841-3>
- Chaturvedi, P., Misra, P., & Tuli, R. (2011). Sterol glucosyltransferases-The enzymes that modify sterols. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(1), 47–68. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9232-0>

- Chen, L. Q., Hou, B. H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X. Q., ... Frommer, W. B. (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, 468(7323), 527–532. <https://doi.org/10.1038/nature09606>
- Chen, Q., Steinhauer, L., Hammerlindl, J., Keller, W., & Zou, J. (2007). Biosynthesis of Phytosterol Esters: Identification of a Sterol O -Acyltransferase in Arabidopsis . *Plant Physiology*, 145(3), 974–984. <https://doi.org/10.1104/pp.107.106278>
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 16(6), 735–743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x>
- Clouse, S. D. (2002). Arabidopsis mutants reveal multiple roles for sterols in plant development. *Plant Cell*, Vol. 14, pp. 1995–2000. <https://doi.org/10.1105/tpc.140930>
- Cosentino, C., Fischer-Schliebs, E., Bertl, A., Thiel, G., & Homann, U. (2010). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters are differentially regulated in response to NaCl stress in leaves and roots of Mesembryanthemum crystallinum. *New Phytologist*, 186(3), 669–680. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03208.x>
- Cuppels, D. A. (1986). Generation and characterization of Tn5 insertion mutations in Pseudomonas syringae pv. tomato. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(2), 323–327.
- D'Andrea, S. (2016). Lipid droplet mobilization: The different ways to loosen the purse strings. *Biochimie*, 120, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.07.010>
- Dahan-Meir, T., Filler-Hayut, S., Melamed-Bessudo, C., Bocobza, S., Czosnek, H., Aharoni, A., & Levy, A. A. (2018). Efficient in planta gene targeting in tomato using geminiviral replicons and the CRISPR/Cas9 system. *Plant Journal*, 95(1), 5–16. <https://doi.org/10.1111/tpj.13932>
- Davis, D. L., & Poneleit, C. G. (1974). Sterol Accumulation and Composition in Developing Zea mays L. Kernels. *Plant Physiology*, 54(5), 794–796. <https://doi.org/10.1104/pp.54.5.794>
- Debolt, S., Scheible, W. R., Schrick, K., Auer, M., Beisson, F., Bischoff, V., ... Somerville, C. (2009). Mutations in UDP-glucose:sterol glucosyltransferase in Arabidopsis cause transparent testa phenotype and suberization defect in seeds. *Plant Physiology*, 151(1), 78–87. <https://doi.org/10.1104/pp.109.140582>
- Dinan, L. (2001). Phytoecdysteroids: Biological aspects. *Phytochemistry*, 57(3), 325–339. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00078-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00078-4)
- Duperon, R., Thiersault, M., & Duperon, P. (1984). High level of glycosylated sterols in species of solanum and sterol changes during the development of the tomato. *Phytochemistry*, 23(4), 743–746. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85016-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85016-5)
- Dyas, L., & Goad, L. J. (1993). Steryl fatty acyl esters in plants. *Phytochemistry*, 34(1), 17–29. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90777-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90777-5)
- Earley, K. W., Haag, J. R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., & Pikaard, C. S. (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant Journal*, 45(4), 616–629. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02617.x>

- Eichenberger, W., & Siegrist, H. P. (1975). Steryl glycoside acyltransferase from carrots. *FEBS Letters*, 52(1), 153–156. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(75\)80660-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(75)80660-0)
- Emmanuel, E., & Levy, A. A. (2002). Tomato mutants as tools for functional genomics. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(2), 112–117. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00237-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00237-6)
- Ferrer, A., Altabella, T., Arró, M., & Boronat, A. (2017). Emerging roles for conjugated sterols in plants. *Progress in Lipid Research*, 67, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.06.002>
- Flowers, T. J., Galal, H. K., & Bromham, L. (2010). Evolution of halophytes: Multiple origins of salt tolerance in land plants. *Functional Plant Biology*, 37(7), 604–612. <https://doi.org/10.1071/FP09269>
- Frasch, W., & Grunwald, C. (1976). Acylated Steryl Glycoside Synthesis in Seedlings of *Nicotiana tabacum* L. . *Plant Physiology*, 58(6), 744–748. <https://doi.org/10.1104/pp.58.6.744>
- Friedman, M. (2002). Tomato glycoalkaloids: Role in the plant and in the diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5751–5780. <https://doi.org/10.1021/jf020560c>
- Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M., & Joung, J. K. (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature Biotechnology*, 32(3), 279–284. <https://doi.org/10.1038/nbt.2808>
- Fujioka, S., & Yokota, T. (2003). Biosynthesis and Metabolism of Brassinosteroids. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 137–164. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134921>
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(4), 436–442. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.014>
- Furt, F., Simon-Plas, F., & Mongrand, S. (2011). Lipids of the Plant Plasma Membrane. In M. A., S. B., & P. W. (Eds.), *The plant plasma membrane* (pp. 3–30). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-13431-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-13431-9_1)
- Gamir, J., Darwiche, R., van't Hof, P., Choudhary, V., Stumpe, M., Schneiter, R., & Mauch, F. (2017). The sterol-binding activity of PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. *Plant Journal*, 89(3), 502–509. <https://doi.org/10.1111/tpj.13398>
- Gatta, A. T., Wong, L. H., Sere, Y. Y., Calderón-Noreña, D. M., Cockcroft, S., Menon, A. K., & Levine, T. P. (2015). A new family of StART domain proteins at membrane contact sites has a role in ER-PM sterol transport. *ELife*, 4, e07253. <https://doi.org/10.7554/eLife.07253>
- Gidda, S. K., Park, S., Pyc, M., Yurchenko, O., Cai, Y., Wu, P., ... Mullen, R. T. (2016). Lipid droplet-associated proteins (LDAPs) are required for the dynamic regulation of neutral lipid compartmentation in plant cells. *Plant Physiology*, 170(4), 2052–2071. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01977>
- Gilchrist, E., & Haughn, G. (2010). Reverse genetics techniques: Engineering loss and gain of gene function in plants. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 9(2), 103–110. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elp059>

- Golldack, D., Li, C., Mohan, H., & Probst, N. (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Frontiers in Plant Science*, 5(APR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00151>
- Gondet, L., Bronner, R., & Benveniste, P. (1994). Regulation of sterol content in membranes by subcellular compartmentation of steryl-esters accumulating in a sterol-overproducing tobacco mutant. *Plant Physiology*, 105(2), 509–518. <https://doi.org/10.1104/pp.105.2.509>
- Grennan, A. K. (2007). Lipid Rafts in Plants. *Plant Physiology*, 143(3), 1083–1085. <https://doi.org/10.1104/pp.104.900218>
- Griebel, T., & Zeier, J. (2010). A role for  $\beta$ -sitosterol to stigmasterol conversion in plant-pathogen interactions. *Plant Journal*, 63(2), 254–268. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04235.x>
- Grille, S., Zaslowski, A., Thiele, S., Plat, J., & Warnecke, D. (2010). The functions of steryl glycosides come to those who wait: Recent advances in plants, fungi, bacteria and animals. *Progress in Lipid Research*, 49(3), 262–288. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.02.001>
- Grison, M. S., Brocard, L., Fouillen, L., Nicolas, W., Wewer, V., Dörmann, P., ... Bayer, E. M. (2015). Specific membrane lipid composition is important for plasmodesmata function in arabidopsis. *Plant Cell*, 27(4), 1228–1250. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.135731>
- Grosjean, K., Mongrand, S., Beney, L., Simon-Plas, F., & Gerbeau-Pissot, P. (2015). Differential effect of plant lipids on membrane organization specificities of phytosphingolipids and phytosterols. *Journal of Biological Chemistry*, 290(9), 5810–5825. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.598805>
- Gutensohn, M., & Dudareva, N. (2016). Tomato Fruits—A Platform for Metabolic Engineering of Terpenes. In *Methods in Enzymology* (Vol. 576, pp. 333–359). <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.03.012>
- Haj, F. G., Sabet, O., Kinkhabwala, A., Wimmer-Kleikamp, S., Roukos, V., Han, H.-M., ... Bastiaens, P. I. (2012). Regulation of Signaling at Regions of Cell-Cell Contact by Endoplasmic Reticulum-Bound Protein-Tyrosine Phosphatase 1B. *PLoS ONE*, 7(5), e36633. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036633>
- Harder, T., & Engelhardt, K. R. (2004). Membrane domains in lymphocytes - From lipid rafts to protein scaffolds. *Traffic*, 5(4), 265–275. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2003.00163.x>
- Harker, M., Hellyer, A., Clayton, J. C., Duvoix, A., Lanot, A., & Safford, R. (2003). Co-ordinate regulation of sterol biosynthesis enzyme activity during accumulation of sterols in developing rape and tobacco seed. *Planta*, 216(4), 707–715. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0913-3>
- Harrison, S. J., Mott, E. K., Parsley, K., Aspinall, S., Gray, J. C., & Cottage, A. (2006). A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/1746-4811-2-19>
- Hartley, J. L., Temple, G. F., & Brasch, M. A. (2000). DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination. *Genome Research*, 10(11), 1788–1795. <https://doi.org/10.1101/gr.143000>

- Hartmann, M. A. (2004). Sterol metabolism and functions in higher plants. In G. Daum (Ed.), *Lipid metabolism and membrane biogenesis* (pp. 183–211). [https://doi.org/10.1007/978-3-540-40999-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-540-40999-1_6)
- He, J. X., Fujioka, S., Li, T. C., Kang, S. G., Seto, H., Takatsuto, S., ... Jang, J. C. (2003). Sterols regulate development and gene expression in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *131*(3), 1258–1269. <https://doi.org/10.1104/pp.014605>
- He, W. Sen, Zhu, H., & Chen, Z. Y. (2018). Plant Sterols: Chemical and Enzymatic Structural Modifications and Effects on Their Cholesterol-Lowering Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(12), 3047–3062. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00059>
- Heath, M. C. (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, *3*(4), 315–319. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00087-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00087-X)
- Hernández-Pinzón, I., Ross, J. H. E., Barnes, K. A., Damant, A. P., & Murphy, D. J. (1999). Composition and role of tapetal lipid bodies in the biogenesis of the pollen coat of Brassica napus. *Planta*, *208*(4), 588–598. <https://doi.org/10.1007/s004250050597>
- Hodzic, A., Rappolt, M., Amenitsch, H., Laggner, P., & Pabst, G. (2008). Differential modulation of membrane structure and fluctuations by plant sterols and cholesterol. *Biophysical Journal*, *94*(10), 3935–3944. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.123224>
- Hoefle, C., & Hüchelhoven, R. (2008). Enemy at the gates: Traffic at the plant cell pathogen interface. *Cellular Microbiology*, *10*(12), 2400–2407. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01238.x>
- Hölttä-Vuori, M., Uronen, R. L., Repakova, J., Salonen, E., Vattulainen, I., Panula, P., ... Ikonen, E. (2008). BODIPY-cholesterol: A new tool to visualize sterol trafficking in living cells and organisms. *Traffic*, *9*(11), 1839–1849. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00801.x>
- Horn, P. J., James, C. N., Gidda, S. K., Kilaru, A., Dyer, J. M., Mullen, R. T., ... Chapman, K. D. (2013). Identification of a new class of lipid droplet-associated proteins in plants. *Plant Physiology*, *162*(4), 1926–1936. <https://doi.org/10.1104/pp.113.222455>
- Huang, A. H. C. (2018). Plant lipid droplets and their associated proteins: Potential for rapid advances. *Plant Physiology*, *176*(3), 1894–1918. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01677>
- Huang, L. H., Nishi, K., Li, S., Ho, T., Dong, R., Chang, C. C. Y., & Chang, T. Y. (2014). Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 1 - Significance of single-nucleotide polymorphism at residue 526 and the role of Pro347 near the fifth transmembrane domain. *FEBS Journal*, *281*(7), 1773–1783. <https://doi.org/10.1111/febs.12739>
- Hugly, S., McCourt, P., Browse, J., Patterson, G. W., & Somerville, C. (1990). A chilling sensitive mutant of Arabidopsis with altered sterol-ester metabolism. *Plant Physiology*, *93*(3), 1053–1062. <https://doi.org/10.1104/pp.93.3.1053>
- Iijima, Y., Watanabe, B., Sasaki, R., Takenaka, M., Ono, H., Sakurai, N., ... Aoki, K. (2013). Steroidal glycoalkaloid profiling and structures of glycoalkaloids in wild tomato fruit. *Phytochemistry*, *95*, 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.07.016>

- Ischebeck, T. (2016). Lipids in pollen — They are different. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(9), 1315–1328. <https://doi.org/10.1016/j.BBALIP.2016.03.023>
- Jang, J. C., Fujioka, S., Tasaka, M., Seto, H., Takatsuto, S., Ishii, A., ... Sheen, J. (2000). A critical role of sterols in embryonic patterning and meristem programming revealed by the fackel mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development*, 14(12), 1485–1497. <https://doi.org/10.1101/gad.14.12.1485>
- Jonas, A. (2000). Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1529(1–3), 245–256. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00153-0](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00153-0)
- Jones, P. J. H., Shamloo, M., MacKay, D. S., Rideout, T. C., Myrie, S. B., Plat, J., ... Weingärtner, O. (2018). Progress and perspectives in plant sterol and plant stanol research. *Nutrition Reviews*, 76(10), 725–746. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy032>
- Kalinowska, M., & Wojciechowski, Z. A. (1983). The occurrence of sterol-ester hydrolase activity in roots of white mustard seedlings. *Phytochemistry*, 22(1), 59–63. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80058-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80058-8)
- Kalinowska, M., & Wojciechowski, Z. A. (1985). Modulation of activities of steryl glucoside hydrolase and UDPG: Sterol glucosyltransferase from *Sinapis alba* by detergents and lipids. *Phytochemistry*, 25(1), 45–49. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94498-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94498-4)
- Katagiri, F., Thilmony, R., & He, S. Y. (2002). The *Arabidopsis Thaliana*-*Pseudomonas Syringae* Interaction. In C. R. Meyerowitz, E.M. and Somerville (Ed.), *The Arabidopsis Book* (Vol. 1, p. e0039). <https://doi.org/10.1199/tab.0039>
- Katayama, M., & Minoru, K. (1973). Soybean sterols during maturation of seeds I. Accumulation of sterols in the free form, fatty acid esters, acylated glucosides and non-acylated glucosides. *Plant and Cell Physiology*, 14(4), 681–688. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a074903>
- Kerkeb, L., Donaire, J. P., Venema, K., & Rodríguez-Rosales, M. P. (2001). Tolerance to NaCl induces changes in plasma membrane lipid composition, fluidity and H<sup>+</sup>-ATPase activity of tomato calli. *Physiologia Plantarum*, 113(2), 217–224. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1130209.x>
- Keukens, E. A. J., de Vrije, T., van den Boom, C., de Waard, P., Plasman, H. H., Thiel, F., ... de Kruijff, B. (1995). Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *BBA - Biomembranes*, 1240(2), 216–228. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(95\)00186-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(95)00186-7)
- Kim, H. B., Lee, H., Oh, C. J., Lee, H. Y., Eum, H. L., Kim, H. S., ... Choi, S. B. (2010). Postembryonic seedling lethality in the sterol-deficient *Arabidopsis cyp51A2* mutant is partially mediated by the composite action of ethylene and reactive oxygen species. *Plant Physiology*, 152(1), 192–205. <https://doi.org/10.1104/pp.109.149088>
- Kimura, S., & Sinha, N. (2008). Tomato (*Solanum lycopersicum*): A model fruit-bearing crop. *Cold Spring Harbor Protocols*, 3(11). <https://doi.org/10.1101/pdb.emo105>

- Klee, H. J., & Giovannoni, J. J. (2011). Genetics and Control of Tomato Fruit Ripening and Quality Attributes. *Annual Review of Genetics*, 45(1), 41–59. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132507>
- Kopischke, M., Westphal, L., Schneeberger, K., Clark, R., Ossowski, S., Wewer, V., ... Rosahl, S. (2013). Impaired sterol ester synthesis alters the response of *Arabidopsis thaliana* to *Phytophthora infestans*. *Plant Journal*, 73(3), 456–468. <https://doi.org/10.1111/tpj.12046>
- Korber, M., Klein, I., & Daum, G. (2017). Steryl ester synthesis, storage and hydrolysis: A contribution to sterol homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(12), 1534–1545. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.09.002>
- Kumar, M. S. S., Ali, K., Dahuja, A., & Tyagi, A. (2015). Role of phytosterols in drought stress tolerance in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 96, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.07.014>
- Laibach, N., Post, J., Twyman, R. M., Gronover, C. S., & Prüfer, D. (2015). The characteristics and potential applications of structural lipid droplet proteins in plants. *Journal of Biotechnology*, 201, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.08.020>
- Laloi, M., Perret, A. M., Chatre, L., Melsner, S., Cantrel, C., Vaultier, M. N., ... Moreau, P. (2007). Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. *Plant Physiology*, 143(1), 461–472. <https://doi.org/10.1104/pp.106.091496>
- Lara, J. A. (2017). *Caracterización de esteroles aciltransferasas en tomate*. Universidad de Barcelona.
- Lara, J. A., Burciaga-Monge, A., Chávez, A., Revés, M., Lavilla, R., Arró, M., ... Ferrer, A. (2018). Identification and Characterization of Sterol Acyltransferases Responsible for Steryl Ester Biosynthesis in Tomato. *Frontiers in Plant Science*, 9, 588. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00588>
- LeBlanc, C., Zhang, F., Mendez, J., Lozano, Y., Chatpar, K., Irish, V. F., & Jacob, Y. (2018). Increased efficiency of targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 in plants using heat stress. *Plant Journal*, 93(2), 377–386. <https://doi.org/10.1111/tpj.13782>
- Lefebvre, B., Furt, F., Hartmann, M. A., Michaelson, L. V., Carde, J. P., Sargueil-Boiron, F., ... Mongrand, S. (2007). Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: A proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiology*, 144(1), 402–418. <https://doi.org/10.1104/pp.106.094102>
- Li, Ran, Fu, D., Zhu, B., Luo, Y., & Zhu, H. (2018). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of lncRNA1459 alters tomato fruit ripening. *Plant Journal*, 94(3), 513–524. <https://doi.org/10.1111/tpj.13872>
- Li, Rui, Liu, C., Zhao, R., Wang, L., Chen, L., Yu, W., ... Shen, L. (2019). CRISPR/Cas9-Mediated SINPR1 mutagenesis reduces tomato plant drought tolerance. *BMC Plant Biology*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1627-4>
- Li, Ruixi, Sun, R., Hicks, G. R., & Raikhel, N. V. (2015). *Arabidopsis* ribosomal proteins control vacuole trafficking and developmental programs through the regulation of lipid metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(1), E89–E98. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422656112>

- Li, X., Xia, T., Huang, J., Guo, K., Liu, X., Chen, T., ... Peng, L. (2014). Distinct biochemical activities and heat shock responses of two UDP-glucose sterol glucosyltransferases in cotton. *Plant Science*, 219, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.12.013>
- Lichtenthaler, H. K., Rohmer, M., & Schwender, J. (1997). Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 101(3), 643–652. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1997.1010327.x>
- Lin, S., Lu, X., Chang, C. C. Y., & Chang, T.-Y. (2003). Human Acyl-Coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells: Membrane Topology and Active Site Location. *Molecular Biology of the Cell*, 14(6), 2447–2460. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-11-0725>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- London, E., & Brown, D. A. (2000). Insolubility of lipids in Triton X-100: Physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1508(1–2), 182–195. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00007-1)
- Lux, A., Luxová, M., Abe, J., & Morita, S. (2004). Root cortex: structural and functional variability and responses to environmental stress. *Root Research*, 13(3), 117–131. <https://doi.org/10.3117/rootres.13.117>
- Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Y., Qiu, R., ... Liu, Y. G. (2015). A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Molecular Plant*, 8(8), 1274–1284. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.04.007>
- Madina, B. R., Sharma, L. K., Chaturvedi, P., Sangwan, R. S., & Tuli, R. (2007). Purification and physico-kinetic characterization of  $3\beta$ -hydroxy specific sterol glucosyltransferase from *Withania somnifera* (L) and its stress response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1774(3), 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.12.009>
- Malinsky, J., Opekarová, M., Grossmann, G., & Tanner, W. (2013). Membrane Microdomains, Rafts, and Detergent-Resistant Membranes in Plants and Fungi. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 501–529. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120103>
- Mansour, M. M. F., Hasselt, P. R., & Kuiper, P. J. C. (1994). Plasma membrane lipid alterations induced by NaCl in winter wheat roots. *Physiologia Plantarum*, 92(3), 473–478. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb08838.x>
- Mansour, M. M. F., & Stadelmann, E. J. (1994). NaCl-induced changes in protoplasmic characteristics of *Hordeum vulgare* cultivars differing in salt tolerance. *Physiologia Plantarum*, 91(3), 389–394. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb02965.x>
- Mansour, M. M.F., Salama, K. H. A., & Al-Mutawa, M. M. (2003). Transport proteins and salt tolerance in plants. *Plant Science*. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00109-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00109-2)

- Mansour, M M F, Lee-Stadelmann, O. Y., & Stadelmann, E. J. (1993). Salinity stress and cytoplasmic factors. A comparison of cell permeability and lipid partiality in salt sensitive and salt resistant cultivars and lines of *Triticum aestivum* and *Hordeum vulgare*. *Physiologia Plantarum*, 88(1), 141–148. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01771.x>
- Mansour, Mohamed Magdy F. (2013). Plasma membrane permeability as an indicator of salt tolerance in plants. *Biologia Plantarum*, 57(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0144>
- Manzano, D., Andrade, P., Caudepón, D., Altabella, T., Arró, M., & Ferrer, A. (2016). Suppressing farnesyl diphosphate synthase alters chloroplast development and triggers sterol-dependent induction of jasmonate- and Fe-related responses. *Plant Physiology*, 172(1), 93–117. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00431>
- Martí, E., Gisbert, C., Bishop, G. J., Dixon, M. S., & García-Martínez, J. L. (2006). Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *Journal of Experimental Botany*, 57(9), 2037–2047. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj154>
- Mayor, S., & Rao, M. (2004). Rafts: Scale-dependent, active lipid organization at the cell surface. *Traffic*, 5(4), 231–240. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.00172.x>
- McCaskill, D., & Croteau, R. (1998). Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. *Trends in Biotechnology*, 16(8), 349–355. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01231-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01231-1)
- McKegney, G., Yao, K., Ghosh, S., Huff, A., Mayak, S., & Thompson, J. E. (1995). The lipid composition of cytosolic particles isolated from senescing bean cotyledons. *Phytochemistry*, 39(6), 1335–1345. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00111-J](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00111-J)
- McMurchie, E. J., McGlasson, W. B., & Eaks, I. L. (1972). Treatment of Fruit with Propylene gives Information about the Biogenesis of Ethylene. *Nature*, 237(5352), 235–236. <https://doi.org/10.1038/237235a0>
- Mehrshahi, P., Stefano, G., Andaloro, J. M., Brandizzi, F., Froehlich, J. E., & DellaPenna, D. (2013). Transorganellar complementation redefines the biochemical continuity of endoplasmic reticulum and chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(29), 12126–12131. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306331110>
- Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., ... Levy, A. (1997). A new model system for tomato genetics. *The Plant Journal*, 12(6), 1465–1472. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.12061465.x>
- Men, S., Boutté, Y., Ikeda, Y., Li, X., Palme, K., Stierhof, Y.-D., ... Grebe, M. (2008). Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nature Cell Biology*, 10(2), 237–244. <https://doi.org/10.1038/ncb1686>
- Milner, S. E., Brunton, N. P., Jones, P. W., O'Brien, N. M., Collins, S. G., & Maguire, A. R. (2011). Bioactivities of glycoalkaloids and their aglycones from solanum species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3454–3484. <https://doi.org/10.1021/jf200439q>
- Mishra, M. K., Chaturvedi, P., Singh, R., Singh, G., Sharma, L. K., Pandey, V., ... Misra, P. (2013). Overexpression of WsSGTL1 Gene of *Withania somnifera* Enhances Salt Tolerance, Heat Tolerance and Cold Acclimation Ability in Transgenic Arabidopsis Plants. *PLoS ONE*, 8(4), e63064. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063064>

- Mishra, M. K., Singh, G., Tiwari, S., Singh, R., Kumari, N., & Misra, P. (2015). Characterization of Arabidopsis sterol glycosyltransferase TTG15/UGT80B1 role during freeze and heat stress. *Plant Signaling and Behavior*. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1075682>
- Miziorko, H. M. (2011). Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 505(2), 131–143. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.09.028>
- Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, J.-P., Hartmann, M.-A., ... Bessoule, J.-J. (2004). Lipid Rafts in Higher Plant Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 36277–36286. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403440200>
- Mongrand, S., Stanislas, T., Bayer, E. M. F., Lherminier, J., & Simon-Plas, F. (2010). Membrane rafts in plant cells. *Trends in Plant Science*, 15(12), 656–663. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.09.003>
- Moreau, R. A., Nyström, L., Whitaker, B. D., Winkler-Moser, J. K., Baer, D. J., Gebauer, S. K., & Hicks, K. B. (2018). Phytosterols and their derivatives: Structural diversity, distribution, metabolism, analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 70, 35–61. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.001>
- Moreau, R. A., Whitaker, B. D., & Hicks, K. B. (2002). Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: Structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 41(6), 457–500. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(02\)00006-1](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(02)00006-1)
- Murphy, D. J. (2012). The dynamic roles of intracellular lipid droplets: From archaea to mammals. *Protoplasma*, 249(3), 541–585. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0329-7>
- Nawrath, C., & Métraux, J.-P. (1999). Salicylic Acid Induction–Deficient Mutants of Arabidopsis Express PR-2 and PR-5 and Accumulate High Levels of Camalexin after Pathogen Inoculation. *The Plant Cell*, 11(8), 1393–1404. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.8.1393>
- Nes, W. D. (2011). Biosynthesis of cholesterol and other sterols. *Chemical Reviews*, 111(10), 6423–6451. <https://doi.org/10.1021/cr200021m>
- Nyström, L., Schär, A., & Lampi, A. M. (2012). Steryl glycosides and acylated steryl glycosides in plant foods reflect unique sterol patterns. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(6), 656–669. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200033>
- OECD. (2017). Tomato (*Solanum lycopersicum*). In *Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment* (Vol. 7). <https://doi.org/10.1787/9789264279728-6-en>
- Oliveros, J. C., Franch, M., Tabas-Madrid, D., San-León, D., Montoliu, L., Cubas, P., & Pazos, F. (2016). Breaking-Cas—interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W267–W271. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw407>
- Omasits, U., Ahrens, C. H., Müller, S., & Wollscheid, B. (2014). Protter: Interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics*, 30(6), 884–886. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt607>

- Oms-Oliu, G., Hertog, M. L. A. T. M., Van de Poel, B., Ampofo-Asiama, J., Geeraerd, A. H., & Nicolai, B. M. (2011). Metabolic characterization of tomato fruit during preharvest development, ripening, and postharvest shelf-life. *Postharvest Biology and Technology*, 62(1), 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.04.010>
- Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., ... Peek, A. S. (2008). IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server), W163–W169. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn198>
- Palta, J. P., Whitaker, B. D., & Weiss, L. S. (1993). Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of Solanum species. *Plant Physiology*, 103(3), 793–803. <https://doi.org/10.1104/pp.103.3.793>
- Pan, C., Ye, L., Qin, L., Liu, X., He, Y., Wang, J., ... Lu, G. (2016). CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. *Scientific Reports*, 6(1), 24765. <https://doi.org/10.1038/srep24765>
- Pandey, V., Niranjana, A., Atri, N., Chandrashekhar, K., Mishra, M. K., Trivedi, P. K., & Misra, P. (2014). WsSGTL1 gene from *Withania somnifera*, modulates glycosylation profile, antioxidant system and confers biotic and salt stress tolerance in transgenic tobacco. *Planta*, 239(6), 1217–1231. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2046-x>
- Paul, K., Sorrentino, M., Lucini, L., Roupahel, Y., Cardarelli, M., Bonini, P., ... Colla, G. (2019). A Combined Phenotypic and Metabolomic Approach for Elucidating the Biostimulant Action of a Plant-Derived Protein Hydrolysate on Tomato Grown Under Limited Water Availability. *Frontiers in Plant Science*, 10, 493. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00493>
- Peng, L. (2002). Sitosterol- $\beta$ -glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. *Science*, 295(5552), 147–150. <https://doi.org/10.1126/science.1064281>
- Pérez-Sancho, J., Tilsner, J., Samuels, A. L., Botella, M. A., Bayer, E. M., & Rosado, A. (2016). Stitching Organelles: Organization and Function of Specialized Membrane Contact Sites in Plants. *Trends in Cell Biology*, 26(9), 705–717. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.007>
- Pérez-Sancho, J., Vanneste, S., Lee, E., McFarlane, H. E., del Valle, A. E., Valpuesta, V., ... Rosado, A. (2015). The arabidopsis synaptotagmin1 is enriched in endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites and confers cellular resistance to mechanical stresses. *Plant Physiology*, 168(1), 132–143. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00260>
- Perez, F. (2004). *Serial Cloner v. 2.6. 0. Software SerialBasics*.
- Peskan, T., Westermann, M., & Oelmüller, R. (2000). Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. *European Journal of Biochemistry*, 267(24), 6989–6995. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01776.x>
- Peters, J. (Ed.). (2000). *Tetrazolium testing handbook: Contribution No. 29 to the handbook on seed testing*. Retrieved from [www.aosaseed.com](http://www.aosaseed.com).
- Pichler, H., Gaigg, B., Hrastnik, C., Achleitner, G., Kohlwein, S. D., Zellnig, G., ... Daum, G. (2001). A subfraction of the yeast endoplasmic reticulum associates with the plasma membrane and has a high capacity to synthesize lipids. *European Journal of Biochemistry*, 268(8), 2351–2361. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02116.x>

- Piironen, V., Lindsay, D. G., Miettinen, T. A., Toivo, J., & Lampi, A. M. (2000). Plant sterols: Biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 939–966. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<939::AID-JSFA644>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<939::AID-JSFA644>3.0.CO;2-C)
- Ploier, B., Korber, M., Schmidt, C., Koch, B., Leitner, E., & Daum, G. (2015). Regulatory link between sterol ester formation and hydrolysis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(7), 977–986. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.02.011>
- Posé, D., Castanedo, I., Borsani, O., Nieto, B., Rosado, A., Tacconnat, L., ... Botella, M. A. (2009). Identification of the *Arabidopsis* dry2/sqe1-5 mutant reveals a central role for sterols in drought tolerance and regulation of reactive oxygen species. *Plant Journal*, 59(1), 63–76. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03849.x>
- Potocka, A., & Zimowski, J. (2008). Metabolism of conjugated sterols in eggplant. Part 1. UDP-glucose : sterol glucosyltransferase. *Acta Biochimica Polonica*, 55(1), 127–134.
- Puchta, H. (2005). The repair of double-strand breaks in plants: Mechanisms and consequences for genome evolution. *Journal of Experimental Botany*, 56(409), 1–14. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri025>
- Qadir, M., Tubeileh, A., Akhtar, J., Larbi, A., Minhas, P. S., & Khan, M. A. (2008). Productivity enhancement of salt-affected environments through crop diversification. *Land Degradation & Development*, 19(4), 429–453. <https://doi.org/10.1002/ldr.853>
- Qian, P., Han, B., Forestier, E., Hu, Z., Gao, N., Lu, W., ... Hou, S. (2013). Sterols are required for cell-fate commitment and maintenance of the stomatal lineage in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 74(6), 1029–1044. <https://doi.org/10.1111/tpj.12190>
- Qiu, N., Chen, M., Guo, J., Bao, H., Ma, X., & Wang, B. (2007). Coordinate up-regulation of V-H<sup>+</sup>-ATPase and vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter as a response to NaCl treatment in a C3 halophyte *Suaeda salsa*. *Plant Science*, 172(6), 1218–1225. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.02.013>
- Ramirez-Estrada, K., Castillo, N., Lara, J. A., Arró, M., Boronat, A., Ferrer, A., & Altabella, T. (2017). Tomato UDP-glucose sterol glucosyltransferases: A family of developmental and stress regulated genes that encode cytosolic and membrane-associated forms of the enzyme. *Frontiers in Plant Science*, 8, 984. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00984>
- Rasband, W. (2012). *ImageJ*. Bethesda, Maryland, USA.: National Institutes of Health.
- Rich, P. R., Mischis, L. A., Purton, S., & Wiskich, J. T. (2001). The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains. *FEMS Microbiology Letters*, 202(2), 181–187. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00317-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00317-2)
- Rico, A., & Preston, G. M. (2008). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 uses constitutive and apoplast-induced nutrient assimilation pathways to catabolize nutrients that are abundant in the tomato apoplast. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(2), 269–282. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-2-0269>

- Roche, Y., Gerbeau-Pissot, P., Buhot, B., Thomas, D., Bonneau, L., Gresti, J., ... Simon-Plas, F. (2008). Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts. *FASEB Journal*, 22(11), 3980–3991. <https://doi.org/10.1096/fj.08-111070>
- Saema, S., Rahman, L. ur, Singh, R., Niranjana, A., Ahmad, I. Z., & Misra, P. (2016). Ectopic overexpression of WsSGTL1, a sterol glucosyltransferase gene in *Withania somnifera*, promotes growth, enhances glycowithanolide and provides tolerance to abiotic and biotic stresses. *Plant Cell Reports*, 35(1), 195–211. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1879-5>
- Saheki, Y., & De Camilli, P. (2017). Endoplasmic Reticulum–Plasma Membrane Contact Sites. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 659–684. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044932>
- Salama, K. H. A., Mansour, M. M. F., Ali, F. Z. M., & Abou-Hadid, A. F. (2007). NaCl-induced changes in plasma membrane lipids and proteins of *Zea mays* L. cultivars differing in their response to salinity. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(4), 351–359. <https://doi.org/10.1007/s11738-007-0044-3>
- Santos, M. A. O., Novembre, A. D. L. C., & Marcos-Filho, J. (2007). Tetrazolium test to assess viability and vigour of tomato seeds. *Seed Science and Technology*, 35(1), 213–223. <https://doi.org/10.15258/sst.2007.35.1.19>
- Sawai, S., Ohyama, K., Yasumoto, S., Seki, H., Sakuma, T., Yamamoto, T., ... Umemoto, N. (2014). Sterol Side Chain Reductase 2 Is a Key Enzyme in the Biosynthesis of Cholesterol, the Common Precursor of Toxic Steroidal Glycoalkaloids in Potato. *The Plant Cell*, 26(9), 3763–3774. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.130096>
- Schaeffer, A., Bouvier-Navé, P., Benveniste, P., & Schaller, H. (2000). Plant sterol-C24-methyl transferases: Different profiles of tobacco transformed with SMT1 or SMT2. *Lipids*, 35(3), 263–269. <https://doi.org/10.1007/s11745-000-0522-1>
- Schaller, H. (2003). The role of sterols in plant growth and development. *Progress in Lipid Research*, 42(3), 163–175. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(02\)00047-4](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(02)00047-4)
- Schaller, H. (2004). New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(6), 465–476. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.05.012>
- Schaller, H., Bouvier-Navé, P., & Benveniste, P. (1998). Overexpression of an arabidopsis cDNA encoding a sterol-C24-methyltransferase in tobacco modifies the ratio of 24-methyl cholesterol to sitosterol and is associated with growth reduction. *Plant Physiology*, 118(2), 461–469. <https://doi.org/10.1104/pp.118.2.461>
- Schaller, H., Gondet, L., Maillot-Vernier, P., & Benveniste, P. (1994). Sterol overproduction is the biochemical basis of resistance to a triazole in calli from a tobacco mutant. *Planta*, 194(3), 295–305. <https://doi.org/10.1007/BF00197528>
- Schiml, S., Fauser, F., & Puchta, H. (2016). CRISPR/Cas-mediated site-specific mutagenesis in arabidopsis thaliana using Cas9 nucleases and paired nickases. In M. Murata (Ed.), *Chromosome and Genomic Engineering in Plants* (pp. 111–122). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-4931-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-4931-1_8)

- Schmidt, C., Ploier, B., Koch, B., & Daum, G. (2013). Analysis of yeast lipid droplet proteome and lipidome. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 116, pp. 15–37). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408051-5.00002-4>
- Schrack, K., Cordova, C., Li, G., Murray, L., & Fujioka, S. (2011). A dynamic role for sterols in embryogenesis of *Pisum sativum*. *Phytochemistry*, 72(6), 465–475. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.009>
- Schrack, K., Fujioka, S., Takatsuto, S., Stierhof, Y.-D., Stransky, H., Yoshida, S., & Jürgens, G. (2004). A link between sterol biosynthesis, the cell wall, and cellulose in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 38(2), 227–243. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02039.x>
- Schrack, K., Mayer, U., Martin, G., Bellini, C., Kuhnt, C., Schmidt, J., & Jürgens, G. (2002). Interactions between sterol biosynthesis genes in embryonic development of *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 31(1), 61–73. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01333.x>
- Schrack, K., Shiva, S., Arpin, J. C., Delimont, N., Isaac, G., Tamura, P., & Welti, R. (2012). Steryl glucoside and acyl steryl glucoside analysis of *Arabidopsis* seeds by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Lipids*, 47(2), 185–193. <https://doi.org/10.1007/s11745-011-3602-9>
- Schuler, I., Milon, A., Nakatani, Y., Ourisson, G., Albrecht, A. M., Benveniste, P., & Hartman, M. A. (1991). Differential effects of plant sterols on water permeability and on acyl chain ordering of soybean phosphatidylcholine bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(16), 6926–6930. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.6926>
- Scott, J. W., & Harbaugh, B. K. (1989). MICRO-TOM—a miniature dwarf tomato. In *Agricultural Experiment Station, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida Circular* (Vol. 370). Retrieved from <http://ci.nii.ac.jp/naid/10027351557/en/>
- Senadheera, P., Singh, R. K., & Maathuis, F. J. M. (2009). Differentially expressed membrane transporters in rice roots may contribute to cultivar dependent salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 60(9), 2553–2563. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp099>
- Serrano, R., Mulet, J. M., Rios, G., Marquez, J. A., Larrinoa, I. Igo F. de, Leube, M. P., ... Montesinos, C. (1999). A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *Journal of Experimental Botany*, 50, 1023–1036. [https://doi.org/10.1093/jxb/50.Special\\_Issue.1023](https://doi.org/10.1093/jxb/50.Special_Issue.1023)
- Sharma, L. K., Madina, B. R., Chaturvedi, P., Sangwan, R. S., & Tuli, R. (2007). Molecular cloning and characterization of one member of 3 $\beta$ -hydroxy sterol glucosyltransferase gene family in *Withania somnifera*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 460(1), 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.01.024>
- Shimada, T. L., Shimada, T., Okazaki, Y., Higashi, Y., Saito, K., Kuwata, K., ... Hara-Nishimura, I. (2019). HIGH STEROL ESTER 1 is a key factor in plant sterol homeostasis. *Nature Plants*, 5(11), 1154–1166. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0537-2>
- Silvestro, D., Andersen, T. G., Schaller, H., & Jensen, P. E. (2013). Plant Sterol Metabolism.  $\Delta$ 7-Sterol-C5-Desaturase (STE1/DWARF7),  $\Delta$ 5,7-Sterol- $\Delta$ 7-Reductase (DWARF5) and  $\Delta$ 24-Sterol- $\Delta$ 24-Reductase (DIMINUTO/DWARF1) Show Multiple Subcellular Localizations in *Arabidopsis thaliana* (Heynh) L. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056429>

- Simon-Plas, F., Perraki, A., Bayer, E., Gerbeau-Pissot, P., & Mongrand, S. (2011). An update on plant membrane rafts. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(6), 642–649. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.08.003>
- Simons, K., & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), 31–39. <https://doi.org/10.1038/35036052>
- Sonawane, P. D., Pollier, J., Panda, S., Szymanski, J., Massalha, H., Yona, M., ... Aharoni, A. (2016). Plant cholesterol biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism. *Nature Plants*, 3(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.205>
- Souter, M., Topping, J., Pullen, M., Friml, J., Palme, K., Hackett, R., ... Lindsey, K. (2002). hydra mutants of Arabidopsis are defective in sterol profiles and auxin and ethylene signaling. *Plant Cell*, 14(5), 1017–1031. <https://doi.org/10.1105/tpc.001248>
- Ståhl, U., Carlsson, A. S., Lenman, M., Dahlqvist, A., Huang, B., Banaś, W., ... Stymne, S. (2004). Cloning and functional characterization of a phospholipid:diacylglycerol acyltransferase from Arabidopsis. *Plant Physiology*, 135(3), 1324–1335. <https://doi.org/10.1104/pp.104.044354>
- Steel, C. C., & Drysdale, R. B. (1988). Electrolyte leakage from plant and fungal tissues and disruption of liposome membranes by  $\alpha$ -tomatine. *Phytochemistry*, 27(4), 1025–1030. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80266-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80266-8)
- Stefan, C. J., Manford, A. G., Baird, D., Yamada-Hanff, J., Mao, Y., & Emr, S. D. (2011). Osh Proteins Regulate Phosphoinositide Metabolism at ER-Plasma Membrane Contact Sites. *Cell*, 144(3), 389–401. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.034>
- Stefan, C. J., Manford, A. G., & Emr, S. D. (2013). ER–PM connections: sites of information transfer and inter-organelle communication. *Current Opinion in Cell Biology*, 25(4), 434–442. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.02.020>
- Stucky, D. F., Arpin, J. C., & Schrick, K. (2015). Functional diversification of two UGT80 enzymes required for steryl glucoside synthesis in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 66(1), 189–201. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru410>
- Suzuki, M., & Muranaka, T. (2007). Molecular genetics of plant sterol backbone synthesis. *Lipids*, 42(1), 47–54. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-1000-5>
- Takahashi, D., Kawamura, Y., & Uemura, M. (2013). Detergent-resistant plasma membrane proteome to elucidate microdomain functions in plant cells. *Frontiers in Plant Science*, 4, 27. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00027>
- Tapken, W., & Murphy, A. S. (2015). Membrane nanodomains in plants: Capturing form, function, and movement. *Journal of Experimental Botany*, 66(6), 1573–1586. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv054>
- Tarazona, P., Feussner, K., & Feussner, I. (2015). An enhanced plant lipidomics method based on multiplexed liquid chromatography-mass spectrometry reveals additional insights into cold- and drought-induced membrane remodeling. *The Plant Journal*, 84(3), 621–633. <https://doi.org/10.1111/tpj.13013>

- Tavassoli, S., Chao, J. T., Young, B. P., Cox, R. C., Prinz, W. A., de Kroon, A. I. P. M., & Loewen, C. J. R. (2013). Plasma membrane—endoplasmic reticulum contact sites regulate phosphatidylcholine synthesis. *EMBO Reports*, 14(5), 434–440. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.36>
- Thiam, A. R., Farese, R. V., & Walther, T. C. (2013). The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(12), 775–786. <https://doi.org/10.1038/nrm3699>
- Ting, J. T. L., Wu, S. S. H., Ratnayake, C., & Huang, A. H. C. (1998). Constituents of the tapetosomes and elaioplasts in *Brassica campestris* tapetum and their degradation and retention during microsporogenesis. *Plant Journal*, 16(5), 541–551. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00325.x>
- Tiwari, P., Sangwan, R. S., Asha, Mishra, B. N., Sabir, F., & Sangwan, N. S. (2014). Molecular Cloning and Biochemical Characterization of a Recombinant Sterol 3-O-Glucosyltransferase from *Gymnema sylvestre* R.Br. Catalyzing Biosynthesis of Steryl Glucosides. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/934351>
- Traw, M. B., Kim, J., Enright, S., Cipollini, D. F., & Bergelson, J. (2003). Negative cross-talk between salicylate- and jasmonate-mediated pathways in the Wassilewskija ecotype of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Ecology*, 12(5), 1125–1135. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01815.x>
- Trivedi, M., Singh, R., Shukla, M., & Tiwari, R. K. (2016). GMO and Food Security. In *Ecofriendly Pest Management for Food Security* (pp. 703–726). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803265-7.00023-3>
- Tuna, A. L., Kaya, C., Ashraf, M., Altunlu, H., Yokas, I., & Yagmur, B. (2007). The effects of calcium sulphate on growth, membrane stability and nutrient uptake of tomato plants grown under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.007>
- Ueta, R., Abe, C., Watanabe, T., Sugano, S. S., Ishihara, R., Ezura, H., ... Osakabe, K. (2017). Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9. *Scientific Reports*, 7(1), 507. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00501-4>
- Urbany, C., Benke, A., Marsian, J., Huettel, B., Reinhardt, R., & Stich, B. (2013). Ups and downs of a transcriptional landscape shape iron deficiency associated chlorosis of the maize inbreds B73 and Mo17. *BMC Plant Biology*, 13(1), 213. <https://doi.org/10.1177/156482651203300203>
- Ursem, R., Tikunov, Y., Bovy, A., Van Berloo, R., & Van Eeuwijk, F. (2008). A correlation network approach to metabolic data analysis for tomato fruits. *Euphytica*, 161(1–2), 181–193. <https://doi.org/10.1007/s10681-008-9672-y>
- Valitova, J. N., Sulkarnayeva, A. G., & Minibayeva, F. V. (2016). Plant sterols: Diversity, biosynthesis, and physiological functions. *Biochemistry (Moscow)*, 81(8), 819–834. <https://doi.org/10.1134/S0006297916080046>

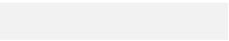
- Valitova, Y. N., Kotlova, E. R., Novikov, A. V., Shavarda, A. L., Artemenko, K. A., Zubarev, R. A., & Minibayeva, F. V. (2010). Binding of sterols affects membrane functioning and sphingolipid composition in wheat roots. *Biochemistry (Moscow)*, *75*(5), 554–561. <https://doi.org/10.1134/S0006297910050032>
- van der Schoot, C., Paul, L. K., Paul, S. B., & Rinne, P. L. H. (2011). Plant lipid bodies and cell-cell signaling a new role for an old organelle? *Plant Signaling and Behavior*, *6*(11), 1732–1738. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17639>
- Vicient, C. M., & Delseny, M. (1999). Isolation of Total RNA from *Arabidopsis thaliana* Seeds. *Analytical Biochemistry*, *268*(2), 412–413. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.3045>
- Villette, C., Berna, A., Compagnon, V., & Schaller, H. (2015). Plant Sterol Diversity in Pollen from Angiosperms. *Lipids*, *50*(8), 749–760. <https://doi.org/10.1007/s11745-015-4008-x>
- Vranová, E., Coman, D., & Gruissem, W. (2013). Network Analysis of the MVA and MEP Pathways for Isoprenoid Synthesis. *Annual Review of Plant Biology*, *64*(1), 665–700. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120116>
- Vriet, C., Hennig, L., & Laloi, C. (2015). Stress-induced chromatin changes in plants: Of memories, metabolites and crop improvement. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(7), 1261–1273. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1792-z>
- Wagatsuma, T., Khan, M. S. H., Watanabe, T., Maejima, E., Sekimoto, H., Yokota, T., ... Kannari, T. (2015). Higher sterol content regulated by CYP51 with concomitant lower phospholipid content in membranes is a common strategy for aluminium tolerance in several plant species. *Journal of Experimental Botany*, *66*(3), 907–918. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru455>
- Walther, T. C., & Farese, R. V. (2012). Lipid Droplets and Cellular Lipid Metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, *81*(1), 687–714. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061009-102430>
- Wang, H., Nagegowda, D. A., Rawat, R., Bouvier-Navé, P., Guo, D., Bach, T. J., & Chye, M.-L. (2012). Overexpression of *Brassica juncea* wild-type and mutant HMG-CoA synthase 1 in *Arabidopsis* up-regulates genes in sterol biosynthesis and enhances sterol production and stress tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, *10*(1), 31–42. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00631.x>
- Wang, K., Senthil-Kumar, M., Ryu, C.-M., Kang, L., & Mysore, K. S. (2012). Phytosterols Play a Key Role in Plant Innate Immunity against Bacterial Pathogens by Regulating Nutrient Efflux into the Apoplast. *Plant Physiology*, *158*(4), 1789–1802. <https://doi.org/10.1104/pp.111.189217>
- Wang, P., Hawkins, T. J., Richardson, C., Cummins, I., Deeks, M. J., Sparkes, I., ... Hussey, P. J. (2014). The plant cytoskeleton, NET3C, and VAP27 mediate the link between the plasma membrane and endoplasmic reticulum. *Current Biology*, *24*(12), 1397–1405. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.003>
- Wang, Y., Zhang, Y., Wang, Z., Zhang, X., & Yang, S. (2013). A missense mutation in CHS1, a TIR-NB protein, induces chilling sensitivity in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *75*(4), 553–565. <https://doi.org/10.1111/tpj.12232>

- Warnecke, D. C., Baltrusch, M., Buck, F., Wolter, F. P., & Heinz, E. (1997). UDP-glucose:sterol glucosyltransferase: Cloning and functional expression in *Escherichia coli*. *Plant Molecular Biology*, 35(5), 597–603. <https://doi.org/10.1023/A:1005806119807>
- Watanabe, T., Ito, T., Goda, H. M., Ishibashi, Y., Miyamoto, T., Ikeda, K., ... Ito, M. (2015). Sterylglucoside Catabolism in *Cryptococcus neoformans* with Endoglycoceramidase-related Protein 2 (EGCrP2), the First Steryl- $\beta$ -glucosidase Identified in Fungi. *Journal of Biological Chemistry*, 290(2), 1005–1019. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.616300>
- Watanabe, T., Tani, M., Ishibashi, Y., Endo, I., Okino, N., & Ito, M. (2015). Ergosteryl- $\beta$ -glucosidase (Egh1) involved in sterylglucoside catabolism and vacuole formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology*, 25(10), 1079–1089. <https://doi.org/10.1111/tpj.12659>
- Whalen, M. C., Innes, R. W., Bent, A. F., & Staskawicz, B. J. (1991). Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. *Plant Cell*, 3(1), 49–59. <https://doi.org/10.2307/3869199>
- Whitaker, B. D. (1988). Changes in the steryl lipid content and composition of tomato fruit during ripening. *Phytochemistry*, 27(11), 3411–3416. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80740-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80740-4)
- Wilfling, F., Haas, J. T., Walther, T. C., & Jr, R. V. F. (2014). Lipid droplet biogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, 29, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.03.008>
- Wojciechowski, Z. A., & Zimowski, J. (1975). Acyl composition and biosynthesis of acylated steryl glucosides in *Calendula officinalis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, 398(1), 111–117. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(75\)90174-5](https://doi.org/10.1016/0005-2760(75)90174-5)
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1), 75–85. <https://doi.org/10.2144/05391RV01>
- Wu, J., Seliskar, D. M., & Gallagher, J. L. (1998). Stress tolerance in the marsh plant *Spartina patens*: Impact of NaCl on growth and root plasma membrane lipid composition. *Physiologia Plantarum*, 102(2), 307–317. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1020219.x>
- Xin, X.-F., & He, S. Y. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: A Model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), 473–498. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102321>
- Yamaguchi, S., Kamiya, Y., & Sun, T. P. (2001). Distinct cell-specific expression patterns of early and late gibberellin biosynthetic genes during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Journal*, 28(4), 443–453. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01168.x>
- Yang, F., Xiao, X., Zhang, S., Korpelainen, H., & Li, C. (2009). Salt stress responses in *Populus cathayana* Rehder. *Plant Science*, 176(5), 669–677. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.02.008>
- Yang, H., Bard, M., Bruner, D. A., Gleeson, A., Deckelbaum, R. J., Aljinovic, G., ... Sturley, S. L. (1996). Sterol Esterification in Yeast: A Two-Gene Process. *Science*, 272(5266), 1353–1356. <https://doi.org/10.1126/science.272.5266.1353>

- Yin, X., Biswal, A. K., Dionora, J., Perdigon, K. M., Balahadia, C. P., Mazumdar, S., ... Bandyopadhyay, A. (2017). CRISPR-Cas9 and CRISPR-Cpf1 mediated targeting of a stomatal developmental gene EPFL9 in rice. *Plant Cell Reports*, 36(5), 745–757. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2118-z>
- Yurukova-Grancharova, P., Yankova-Tsvetkova, E., Baldjiev, G., & Cantos Barragan, M. (2011). Reproductive biology of *Atropa belladonna*: embryological features, pollen and seed viability. *Phytologia Balcanica*, 17(1), 101–112. Retrieved from [http://digital.csic.es/bitstream/10261/62012/4/Reproductive\\_biology\\_of\\_Atropa\\_belladonna.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/62012/4/Reproductive_biology_of_Atropa_belladonna.pdf)
- Zauber, H., Burgos, A., Garapati, P., & Schulze, W. X. (2014). Plasma membrane lipid–protein interactions affect signaling processes in sterol-biosynthesis mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 5, 78. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00078>
- Zehmer, J. K., Huang, Y., Peng, G., Pu, J., Anderson, R. G. W., & Liu, P. (2009). A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic. *PROTEOMICS*, 9(4), 914–921. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800584>
- Zhang, H.-X., & Blumwald, E. (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology*, 19(8), 765–768.
- Zhang, H., Zhang, J., Wei, P., Zhang, B., Gou, F., Feng, Z., ... Zhu, J. K. (2014). The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnology Journal*, 12(6), 797–807. <https://doi.org/10.1111/pbi.12200>
- Zhou, X., Chen, X., Du, Z., Zhang, Y., Zhang, W., Kong, X., ... Chen, M. (2019). Terpenoid Esters Are the Major Constituents From Leaf Lipid Droplets of *Camellia sinensis*. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00179>



## **8. ANEXO**



**>AtASAT1**

MASFIKAWGLVIISLCYFFIAKLVPKGIKRLILFFPVFLIFFIVPFLIYSLHLLGITAFFIAWLANFKLLLFALG  
 RGPLSSNHKPLSLPIFLAVSCLPIKIQLSKPKTKTHSHEGSTEGPLIYTIKAVFVVLIIKAYEYSTKLPEKVVLT  
 LYAIHIYFALEIILAATAAAVRAMSDLELEPQFNKPYLATSLODFWGRRWNLMTGILRPTVYEPSLQLFS  
 VLGPNSQILAAFGTFVVSIMHELIFFYMGRLRPDWKMMWFFLINGFCTTVEIAIKKTINGRWRFPKAIS  
 QVLTTLTFVMVTALWLFLPEFNRCNIVEKALDEYAAIGAFAVEVRRKLTAYLF\*

En amarillo, el motivo de unión a los acil-CoAs y en azul los aminoácidos catalíticos.

**>SIASAT1**

MEGNIKDVIIYWIEGEIENFIKVVLLIYVSLCYCYLSSKILPKGLFRLSSFLPVILFFLYVPLKINSVHLCGNT  
 GFFISWLCNFKLILLAFDQGPLSDSSLSIIFVFLACLPIKIQKQSQIYVENRDKFHQNNHFQETPSNEKKDF  
 AKNDHFQETQFPSSIDKIENPFQDGYFYETPSKKLVENGSSVQNGKDFAKSGYFKESSVPSFAKSNKGG  
 KLNYGIKTLIFALIIRVYDYSYIHPYIIMVIYCFHIYLSLDIILAIVSGLARGLLGLQLEPQFNPEYLSLQDF  
 WGRRWNLIVTRILRPTIYKPVLSLSANILGRKWAPAVMATFVVSGLMHELIFYLGRVKPTWEITWFFL  
 LHGVCLNLEIYAKKVINGRFLPRIIGTILTVGFVMITGLWLFPPQLLRCSNDRALAEYEIGAFFKDFTR  
 AVKSTFSR\*

En amarillo, el motivo de unión a los acil-CoAs y en azul los aminoácidos catalíticos.

**>SIASAT1 proteína inactiva CR-asat1 34-2**

MEGNIKDVIIYWIEGEIENFIKVVLLIYVSLCYCYLSSKILPKGLFRLSSFLPVILFFLYVPLKINSVHLCGNT  
 GFFISWLCNFKLILLAFDQGPLSDSSLSIIFVFLACLPIKIQKQSQIYVENRDKFHQNNHFQETPSNEKKDF  
 AKNDHFQETQFPSSIDKIENPFQDGYFYETPSKKLVENGSSVQNGKDFAKSGYFKESSVPSFAKSNKGG  
 KLNYGIKTLIFALIIRVYDYSYIHPYIIMVIYCFHIYLSLDIILAIVSVSGFS\*

**> SIASAT1 proteína inactiva CR-asat1 líneas 35-2, 35-3, 35-5**

MEGNIKDVIIYWIEGEIENFIKVVLLIYVSLCYCYLSSKILPKGLFRLSSFLPVILFFLYVPLKINSVHLCGNT  
 GFFISWLCNFKLILLAFDQGPLSDSSLSIIFVFLACLPIKIQKQSQIYVENRDKFHQNNHFQETPSNEKKDF  
 AKNDHFQETQFPSSIDKIENPFQDGYFYETPSKKLVENGSSVQNGKDFAKSGYFKESSVPSFAKSNKGG  
 KLNYGIKTLIFALIIRVYDYSYIHPYIIMVIYCFHIYLSLDIILAIVSGLRSLRASARATVQ\*

**>SIPSAT1**

MRGGHVGFFVIFILLATAGNLGGEFAGDYSKLSGIIIPGFASTQLRAWSILDPCYSPDLDFNPLDLVWLDTT  
 KLLSAVNCWLKCMMLDPYNQTDHNECKSRPDSGLSAITELDPGYITGPLSSVWKEWIKWCIEFGIEANA  
 IIAVPYDWRLSPSKLEERDLYFHKLKLTFETALKLRGGPSIVFAHSLGNNVFRYFLEWLKLEIAPKEYGRW  
 LDDHIHAYFAVGAPLLGAIETVKATLSGSTFGLPVSSEGTVRLMNFNTFGSSIWMLPFSKYCTTDNVYRRHFS  
 GGNRKYHHAHYHCDEHELKSKYSWPTNIINIEVPSNRGNEVYPSVVETPQTNLSGKECGFPTQLSFSARE  
 VSDGTFKAIKNYDPDSERLFHLLKKSYPHDDPILNPLTPWERPPLKNIFCIYGVDSKTEVGYFAPSGKPY  
 DNWIITDVIYEIEGLSRSRGNLVEGNPGATSGDETVPYHSLSWCKNLWLGPKVNITRTPQSEHDGSDVQV  
 HLNIEHQHGEDIIPNMTKLPTMKYITYYEDSESPGTRTAVWELDKANHRNIVRSPALMRELWLEMWH  
 DIHPDKSKFVTKAKRGLRDEDCYWDYGKARCAWAHECEYRYVFGDVHLGQSCRLKSSTSHILSHY\*

En amarillo las regiones conservadas en las proteínas tipo LCAT. En verde, los aminoácidos de la triada catalítica (Ser-Asp-His).

**> SIPSAT1 proteína inactiva CR-psat1 31-19**

MRGGHVGFFVIFILLATAGNLGGEFAGDYSSPELLSQDSRLHN\*

**> SIPSAT1 proteína inactiva CR-psat1 28-3-2**

MRGGHVGFFVIFILLATAGNLGGEFAGDYSKLVRNYYPRIRVYTTESMVNIRLPLFSSRFQSSRFLARHY\*

**>Quimera ATA**

MASFIKAWGLVIISLCYFFIAKLVPKGIKRLILFFPVFLIFFIVPFLIYSLHLLGITAFFIAWLANFKLLLALG  
 RGPLSSNHKPLSLPIFLAVSCLPIKIQKSQIYVENRDKFHQNNHFQETPSNEKKDFAKNDHFQETQFPSS  
 IDKIENNPFDQGYFYETPSKKLVENGSSVQNGKDFAKSGYFKESSVPSFAKSNKGQKLIYTIKAVFVVLIIK  
 AYEYSTKLPEKVVLTLYAIHIYFALEIILAATAAAVRAMSDLELEPQFNKPYLATSQDFWGRRWNLMVT  
 GILRPTVYEPSLQLFSVLGNYSQILAAFQTFVVSIGMHELIFFYMGRLRPDWKMMWFFLINGFCTTVEIAI  
 KKTINGRWRFPKAIQVLTFTFVMVTALWFLPEFNRCNIVEKALDEYAAIGAFAVEVRRKLTAYLF\*

En verde se indica la secuencia de 101 aminoácidos intercalada en las regiones N y C terminal de AtASAT1 en la quimera ATA.

**>Quimera TAT**

MEGNIKDVIIYWIEGEIENFIKVVLLIYVSLCYCYLSSKILPKGLFRLSSFLPVILFFLYVPLKINSVHLCGNT  
 GFFISWLCNFKLILLAQDQPLSDSSLSIIKFVFLACLPIKIQLSPKPTKTHSHEGSTEGPLNYGIKTLIFALIIR  
 VYDYSYIHPYIIMVIYCFHIYLSLDIILAIVSGLARGLLGLQLEPQFNPEYLSTSLQDFWGRRWNLIVTRILR  
 PTIYKPVLSLSANILGRKWAPIPAVMATFVVSGLMHELIFYYLGRVKPTWEITWFFLLHGVCNLEIYAKK  
 VINGRFKLPRIIGTILTVGFVMITGLWLFPPQLLRNSDVRALAEYEAIGAFAFFKDFTRAVKSTFSR\*

En magenta se muestra la secuencia de 18 aminoácidos intercalada entre las regiones N y C terminal de SIASAT1 en la quimera TAT.

Tabla S1. Perfil de esteroides en extractos de semillas de tomate.

		<b>Wild type</b>			
		$\mu\text{g}$ esteroles/ mg peso seco			
		<b>FS</b>	<b>SE</b>	<b>SG</b>	<b>ASG</b>
	Colesterol	0,075 $\pm$ 0,014	0,345 $\pm$ 0,071	0,019 $\pm$ 0,002	0,019 $\pm$ 0,005
	Latosterol	0,005 $\pm$ 0,003	0,045 $\pm$ 0,006	nd	nd
	24-metilen-colesterol	0,005 $\pm$ 0,002	0,035 $\pm$ 0,007	nd	nd
	Campesterol	0,050 $\pm$ 0,014	0,060 $\pm$ 0,003	0,033 $\pm$ 0,005	0,010 $\pm$ 0,002
	Campestanol	0,005 $\pm$ 0,000	0,007 $\pm$ 0,000	0,002 $\pm$ 0,000	nd
	Estigmasterol	0,091 $\pm$ 0,009	0,048 $\pm$ 0,007	0,015 $\pm$ 0,000	0,007 $\pm$ 0,001
	$\Delta^7$ - Campesterol (Ergost-7-en-3 $\beta$ -ol)	0,010 $\pm$ 0,002	0,132 $\pm$ 0,034	nd	nd
	Clerosterol	0,005 $\pm$ 0,002	0,008 $\pm$ 0,002	nd	nd
	$\beta$ -Sitosterol	0,686 $\pm$ 0,112	0,748 $\pm$ 0,058	0,334 $\pm$ 0,046	0,105 $\pm$ 0,019
	Sitostanol (Estigmastanol)	0,007 $\pm$ 0,003	0,009 $\pm$ 0,002	0,005 $\pm$ 0,001	nd
	$\Delta^5$ - Avenasterol (Isofucosterol)	0,029 $\pm$ 0,006	0,103 $\pm$ 0,012	nd	nd
	Cicloartenol	0,042 $\pm$ 0,010	0,036 $\pm$ 0,007	nd	nd
	Citrostadienol ( $\alpha$ 1-Sitosterol)	0,005 $\pm$ 0,004	0,025 $\pm$ 0,005	nd	nd
	<b>ESTEROLES MAYORITARIOS</b>	0,901 $\pm$ 0,147	1,202 $\pm$ 0,115	0,401 $\pm$ 0,052	0,141 $\pm$ 0,021
	<b>ESTEROLES TOTALES</b>	1,028 $\pm$ 0,161	1,593 $\pm$ 0,158	0,408 $\pm$ 0,052	0,141 $\pm$ 0,021
		<b>CR-<i>asat1</i> 34-2</b>			
		$\mu\text{g}$ esteroles/ mg peso seco			
		<b>FS</b>	<b>SE</b>	<b>SG</b>	<b>ASG</b>
	Colesterol	0,047 $\pm$ 0,005	0,550 $\pm$ 0,149	0,008 $\pm$ 0,003	0,010 $\pm$ 0,002
	Campesterol	0,035 $\pm$ 0,005	0,058 $\pm$ 0,013	0,020 $\pm$ 0,004	0,009 $\pm$ 0,003
	Estigmasterol	0,089 $\pm$ 0,010	0,043 $\pm$ 0,004	0,026 $\pm$ 0,009	0,020 $\pm$ 0,001
	$\beta$ -Sitosterol	0,623 $\pm$ 0,052	0,760 $\pm$ 0,075	0,193 $\pm$ 0,043	0,059 $\pm$ 0,011
	$\Delta^5$ - Avenasterol (Isofucosterol)	0,068 $\pm$ 0,026	0,270 $\pm$ 0,005	nd	nd
	Cicloartenol	0,024 $\pm$ 0,012	0,129 $\pm$ 0,014	nd	nd
	<b>ESTEROLES MAYORITARIOS</b>	0,794 $\pm$ 0,063	1,411 $\pm$ 0,117	0,248 $\pm$ 0,057	0,098 $\pm$ 0,015
	<b>ESTEROLES TOTALES</b>	0,901 $\pm$ 0,104	1,756 $\pm$ 0,087	0,248 $\pm$ 0,057	0,098 $\pm$ 0,015
		<b>CR-<i>asat1</i> 35-3</b>			
		$\mu\text{g}$ esteroles/ mg peso seco			
		<b>FS</b>	<b>SE</b>	<b>SG</b>	<b>ASG</b>
	Colesterol	0,047 $\pm$ 0,003	0,317 $\pm$ 0,018	0,013 $\pm$ 0,004	0,013 $\pm$ 0,001
	Campesterol	0,042 $\pm$ 0,001	0,037 $\pm$ 0,001	0,018 $\pm$ 0,002	0,014 $\pm$ 0,002
	Estigmasterol	0,083 $\pm$ 0,010	0,030 $\pm$ 0,003	0,023 $\pm$ 0,005	0,025 $\pm$ 0,003
	$\beta$ -Sitosterol	0,665 $\pm$ 0,035	0,756 $\pm$ 0,059	0,214 $\pm$ 0,036	0,152 $\pm$ 0,017
	$\Delta^5$ - Avenasterol (Isofucosterol)	0,034 $\pm$ 0,001	nd	nd	nd
	Cicloartenol	0,048 $\pm$ 0,021	0,076 $\pm$ 0,019	nd	nd
	<b>ESTEROLES MAYORITARIOS</b>	0,837 $\pm$ 0,047	1,140 $\pm$ 0,053	0,267 $\pm$ 0,041	0,205 $\pm$ 0,022
	<b>ESTEROLES TOTALES</b>	0,899 $\pm$ 0,013	1,216 $\pm$ 0,053	0,267 $\pm$ 0,041	0,205 $\pm$ 0,022

Tabla S1. Continuación.

	<b>CR-<i>psat1</i> 31-19</b>			
	µg esterol/ mg peso seco			
	<b>FS</b>	<b>SE</b>	<b>SG</b>	<b>ASG</b>
Colesterol	0,033 ± 0,002	nd	0,014 ± 0,001	0,008 ± 0,003
Campesterol	0,048 ± 0,006	nd	0,020 ± 0,007	0,006 ± 0,001
Estigmasterol	0,147 ± 0,010	nd	0,016 ± 0,004	0,010 ± 0,002
β-Sitosterol	1,251 ± 0,150	0,067 ± 0,030	0,224 ± 0,034	0,048 ± 0,017
Sitostanol (Estigmastanol)	0,012 ± 0,003	nd	nd	nd
Δ <sup>5</sup> - Avenasterol (Isofucosterol)	0,094 ± 0,020	nd	nd	nd
Cicloartenol	0,005 ± 0,003	nd	nd	nd
<b>ESTEROLES MAYORITARIOS</b>	1,479 ± 0,166	0,067 ± 0,030	0,271 ± 0,038	0,073 ± 0,016
<b>ESTEROLES TOTALES</b>	1,590 ± 0,180	0,067 ± 0,030	0,271 ± 0,038	0,073 ± 0,016

	<b>CR-<i>psat1</i> 28-3-2</b>			
	µg esterol/ mg peso seco			
	<b>FS</b>	<b>SE</b>	<b>SG</b>	<b>ASG</b>
Colesterol	0,051 ± 0,001	0,083 ± 0,011	0,012 ± 0,001	0,013 ± 0,001
Campesterol	0,073 ± 0,002	0,037 ± 0,010	0,023 ± 0,002	0,013 ± 0,002
Estigmasterol	0,124 ± 0,001	0,008 ± 0,004	0,045 ± 0,004	0,025 ± 0,002
β-Sitosterol	0,858 ± 0,008	0,382 ± 0,088	0,302 ± 0,014	0,157 ± 0,015
Sitostanol (Estigmastanol)	0,013 ± 0,001	nd	nd	nd
Δ <sup>5</sup> - Avenasterol (Isofucosterol)	0,047 ± 0,006	nd	nd	nd
<b>ESTEROLES MAYORITARIOS</b>	1,107 ± 0,007	0,509 ± 0,112	0,381 ± 0,019	0,207 ± 0,016
<b>ESTEROLES TOTALES</b>	1,167 ± 0,012	0,509 ± 0,112	0,381 ± 0,019	0,207 ± 0,016

La extracción de las 4 fracciones de esteroides se realizó a partir de material vegetal liofilizado de un pool de semillas de tomate. Los resultados se expresan como el promedio con desviación estándar (n=4). nd, no detectado.

ESTEROLES MAYORITARIOS: suma del contenido de colesterol, campesterol, estigmasterol y sitosterol.

ESTEROLES TOTALES: suma de esteroides mayoritarios y minoritarios detectados.

Tabla S2. Perfil de esteroides en extractos de hojas de plantas de tomate.

<b>Wild type</b>				
$\mu\text{g}$ esteroles/mg tejido seco				
	<b>FS</b>	<b>SE</b>	<b>SG</b>	<b>ASG</b>
Colesterol	0,026 $\pm$ 0,003	0,018 $\pm$ 0,004	0,037 $\pm$ 0,002	0,076 $\pm$ 0,010
Campesterol	0,011 $\pm$ 0,002	0,010 $\pm$ 0,002	0,031 $\pm$ 0,005	0,051 $\pm$ 0,016
Estigmasterol	0,104 $\pm$ 0,011	0,008 $\pm$ 0,002	0,077 $\pm$ 0,007	0,239 $\pm$ 0,033
Sitosterol	0,088 $\pm$ 0,010	0,059 $\pm$ 0,020	0,188 $\pm$ 0,025	0,213 $\pm$ 0,033
Colesta-7-en $3\beta$ -ol	nd	0,017 $\pm$ 0,007	nd	nd
4 $\alpha$ -metilergostadienol	nd	0,050 $\pm$ 0,028	nd	nd
24-metilencolesterol	0,003 $\pm$ 0,001	0,035 $\pm$ 0,014	nd	nd
Isofucosterol	0,011 $\pm$ 0,002	0,012 $\pm$ 0,004	nd	nd
Cicloartenol	nd	0,054 $\pm$ 0,025	nd	nd
<b>ESTEROLES MAYORITARIOS</b>	0,228 $\pm$ 0,024	0,097 $\pm$ 0,024	0,333 $\pm$ 0,028	0,578 $\pm$ 0,070
<b>ESTEROLES TOTALES</b>	0,240 $\pm$ 0,028	0,255 $\pm$ 0,089	0,333 $\pm$ 0,028	0,578 $\pm$ 0,070

<b>CR-<i>asat1</i> 34-2</b>				
$\mu\text{g}$ esteroles/mg tejido seco				
	<b>FS</b>	<b>SE</b>	<b>SG</b>	<b>ASG</b>
Colesterol	0,052 $\pm$ 0,009	0,098 $\pm$ 0,011	0,054 $\pm$ 0,014	0,107 $\pm$ 0,021
Campesterol	0,033 $\pm$ 0,008	0,036 $\pm$ 0,009	0,017 $\pm$ 0,007	0,027 $\pm$ 0,003
Estigmasterol	0,105 $\pm$ 0,013	0,038 $\pm$ 0,009	0,080 $\pm$ 0,028	0,187 $\pm$ 0,040
Sitosterol	0,186 $\pm$ 0,032	0,271 $\pm$ 0,047	0,163 $\pm$ 0,047	0,199 $\pm$ 0,026
Colesta-7-en $3\beta$ -ol	0,005 $\pm$ 0,001	0,059 $\pm$ 0,026	nd	nd
4 $\alpha$ -metilergostadienol	nd	0,194 $\pm$ 0,054	nd	nd
24-metilencolesterol	nd	0,051 $\pm$ 0,014	nd	nd
Isofucosterol	nd	0,052 $\pm$ 0,014	nd	nd
Cicloartenol	nd	0,165 $\pm$ 0,044	nd	nd
<b>ESTEROLES MAYORITARIOS</b>	0,377 $\pm$ 0,028	0,443 $\pm$ 0,038	0,314 $\pm$ 0,079	0,520 $\pm$ 0,073
<b>ESTEROLES TOTALES</b>	0,402 $\pm$ 0,039	0,998 $\pm$ 0,136	0,314 $\pm$ 0,079	0,520 $\pm$ 0,073

<b>CR-<i>asat1</i> 35-3</b>				
$\mu\text{g}$ esteroles/mg tejido seco				
	<b>FS</b>	<b>SE</b>	<b>SG</b>	<b>ASG</b>
Colesterol	0,041 $\pm$ 0,007	0,075 $\pm$ 0,004	0,055 $\pm$ 0,012	0,117 $\pm$ 0,021
Campesterol	0,029 $\pm$ 0,010	0,031 $\pm$ 0,004	0,015 $\pm$ 0,002	0,031 $\pm$ 0,007
Estigmasterol	0,085 $\pm$ 0,007	0,025 $\pm$ 0,004	0,092 $\pm$ 0,024	0,268 $\pm$ 0,038
Sitosterol	0,126 $\pm$ 0,019	0,233 $\pm$ 0,027	0,167 $\pm$ 0,009	0,268 $\pm$ 0,064
Colesta-7-en $3\beta$ -ol	0,005 $\pm$ 0,001	0,046 $\pm$ 0,004	nd	nd
4 $\alpha$ -metilergostadienol	nd	0,162 $\pm$ 0,031	nd	nd
24-metilencolesterol	0,002 $\pm$ 0,001	0,057 $\pm$ 0,004	nd	nd
Isofucosterol	0,013 $\pm$ 0,007	0,034 $\pm$ 0,008	nd	nd
Cicloartenol	nd	0,259 $\pm$ 0,044	nd	nd
<b>ESTEROLES MAYORITARIOS</b>	0,281 $\pm$ 0,010	0,365 $\pm$ 0,037	0,329 $\pm$ 0,045	0,684 $\pm$ 0,100
<b>ESTEROLES TOTALES</b>	0,297 $\pm$ 0,019	0,924 $\pm$ 0,098	0,329 $\pm$ 0,045	0,684 $\pm$ 0,100

Tabla S2. Continuación.

<b>CR-<i>psat1</i> 31-19</b>				
$\mu\text{g}$ esterol/mg tejido seco				
	FS	SE	SG	ASG
Colesterol	0,027 $\pm$ 0,002	0,006 $\pm$ 0,003	0,050 $\pm$ 0,008	0,056 $\pm$ 0,011
Campesterol	0,011 $\pm$ 0,001	nd	0,054 $\pm$ 0,012	0,049 $\pm$ 0,010
Estigmasterol	0,154 $\pm$ 0,014	nd	0,135 $\pm$ 0,017	0,258 $\pm$ 0,046
Sitosterol	0,142 $\pm$ 0,021	0,020 $\pm$ 0,008	0,282 $\pm$ 0,032	0,327 $\pm$ 0,079
Colesta-7-en 3 $\beta$ -ol	0,002 $\pm$ 0,001	nd	nd	nd
4 $\alpha$ -metilergostadienol	nd	nd	nd	nd
24-metilencolesterol	0,003 $\pm$ 0,001	nd	nd	nd
Isofucosterol	0,010 $\pm$ 0,003	nd	nd	nd
Cicloartenol	nd	0,023 $\pm$ 0,014	nd	nd
<b>ESTEROLES MAYORITARIOS</b>	0,334 $\pm$ 0,033	0,027 $\pm$ 0,011	0,522 $\pm$ 0,060	0,690 $\pm$ 0,138
<b>ESTEROLES TOTALES</b>	0,347 $\pm$ 0,030	0,049 $\pm$ 0,015	0,522 $\pm$ 0,060	0,690 $\pm$ 0,138

<b>CR-<i>psat1</i> 28-3-2</b>				
$\mu\text{g}$ esterol/mg tejido seco				
	FS	SE	SG	ASG
Colesterol	0,018 $\pm$ 0,001	0,004 $\pm$ 0,001	0,041 $\pm$ 0,005	0,038 $\pm$ 0,008
Campesterol	0,009 $\pm$ 0,001	nd	0,039 $\pm$ 0,003	0,040 $\pm$ 0,013
Estigmasterol	0,114 $\pm$ 0,008	nd	0,094 $\pm$ 0,010	0,141 $\pm$ 0,019
Sitosterol	0,157 $\pm$ 0,019	0,016 $\pm$ 0,006	0,220 $\pm$ 0,036	0,219 $\pm$ 0,045
Colesta-7-en 3 $\beta$ -ol	0,004 $\pm$ 0,002	nd	nd	nd
4 $\alpha$ -metilergostadienol	nd	nd	nd	nd
24-metilencolesterol	0,003 $\pm$ 0,001	nd	nd	nd
Isofucosterol	0,013 $\pm$ 0,006	nd	nd	nd
Cicloartenol	nd	0,027 $\pm$ 0,012	nd	nd
<b>ESTEROLESMAYORITARIOS</b>	0,298 $\pm$ 0,024	0,020 $\pm$ 0,006	0,393 $\pm$ 0,040	0,439 $\pm$ 0,059
<b>ESTEROLES TOTALES</b>	0,316 $\pm$ 0,022	0,047 $\pm$ 0,014	0,393 $\pm$ 0,040	0,439 $\pm$ 0,059

La extracción de las 4 fracciones de esteroides se realizó a partir de material vegetal liofilizado de un pool de hojas de 20 plantas de tomate por línea. Los resultados se expresan como el promedio con desviación estándar (n=7, wild type; n=8, CR-*psat1* 31-19; n=6, CR-*psat1* 28-3-2; n=5, CR-*asat1* 34-2; n=4, CR-*asat1* 35-3). nd, no detectado.

ESTEROLES MAYORITARIOS: suma del contenido de colesterol, campesterol, estigmasterol y sitosterol.  
ESTEROLES TOTALES: suma de esteroides mayoritarios y minoritarios detectados.

