



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS

DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

“Análisis del papel de TCTP en la diferenciación en plantas”

T E S I S

Que presenta

Brenda Beatriz Xoconostle Morán

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de la tesis: Dr. Roberto Ruiz Medrano

Ciudad de México

DICIEMBRE, 2023

Este estudio fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular
del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV
bajo la dirección del Dr. Roberto Ruiz Medrano y la asesoría de
la Dra. María Eugenia Hidalgo Lara, el Dr. Jaime Ortega López y la Dra. Ma. del
Carmen Montes Horcasitas,
de este este Departamento
y la Dra. Rosalía Lira Carmona del Centro Médico Nacional Siglo XX

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Roberto Ruiz Medrano y a la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares por su dirección y dedicación en mi formación científica.

A la Dra. Berenice Calderón Pérez, la Dra. Rosalía Lira Carmona y el Dr. Jaime Ortega López, les agradezco de corazón por su cálida atención, valiosas recomendaciones y disposición a escucharme en los momentos más desafiantes de mi trayectoria. Su apoyo ha sido fundamental para mi crecimiento académico.

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a la Dra. María Eugenia Hidalgo Lara por su invaluable apoyo en mi formación científica y su inmensa humanidad. Es un verdadero privilegio conocer a una científica tan comprometida con el bienestar y desarrollo del alumnado.

Del mismo modo, agradezco a dos científicos excepcionales: la M. en C. Brenda Yazmín Vargas Hernández y el M. en C. Leandro Alberto Núñez Muñoz, auxiliares de investigación en los laboratorios 12 y 24 del Departamento de Biotecnología. A ambos, les agradezco su soporte constante. No solo compartieron su conocimiento y experiencia, sino que también brindaron un apoyo invaluable de científico a científico. Su presencia en mi camino académico ha sido un testimonio de la importancia de trabajar en equipo y de cómo la colaboración puede llevarnos a logros científicos significativos. Gracias por ser una parte fundamental de mi viaje.

A mis compañeros de trabajo y amigos que he conocido a lo largo de mi travesía en el CINVESTAV y en otros lugares que he visitado en la última década, les agradezco por su amistad, colaboración y apoyo mutuo. Han sido un pilar importante en mi camino.

Agradecimientos al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías
(CONAHCYT) por la beca para realizar los estudios de Doctorado.

DEDICATORIA

Expreso mi profundo agradecimiento a mi extensa familia paterna y materna. Cada uno de ustedes ha dejado una huella indeleble en mi alma. Gracias por estar presentes en cada etapa de mi vida, por alentarme a no rendirme y por enseñarme a creer en mí misma.

Uva, tu compañía ha sido un bálsamo en los momentos en los que me he sentido desanimada y triste. Agradezco que hayas sido mi compañera en este viaje.

A mi mamá y mi papá, les agradezco por darme la vida y proporcionarme las herramientas necesarias para navegar por este mundo. Su amor incondicional ha sido mi mayor inspiración. Gracias por todo el amor y el apoyo.

A mi hermano, quiero expresar mi más profundo agradecimiento por ser una luz constante en mi vida. No hay un solo día en el que no piense en ti y en el amor que compartimos.

Dedico este esfuerzo con profundo cariño a mis abuelitos Sofy, Licha, Fede y Polo, así como a mi mamá, mi papá, mi hermano y mis queridas tías Caty, Faby, Ime, Licha, Mary y Luis. Mi camino hacia este logro ha estado moldeado por su inmenso amor, constante apoyo y comprensión. Cada paso en este viaje es un tributo a ustedes.

CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 14 |
| 1.1 Diferenciación celular | 16 |
| 1.1.2 Diferenciación celular en plantas | 16 |
| 1.2 Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente (TCTP) | 19 |
| 1.2.1 Gen | 19 |
| 1.2.2 mRNA | 20 |
| 1.2.3 Proteína | 20 |
| 1.2.4 Función de TCTP | 22 |
| 1.2.5 Regulación transcripcional y traduccional de TCTP | 23 |
| 1.3 <i>Solanum tuberosum</i> L | 24 |
| 1.3.1 Propagación vegetativa de <i>Solanum tuberosum</i> (tuberización) | 24 |
| 1.4 . Antecedentes directos | 26 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 29 |
| 2.1. Hipótesis | 29 |
| 3. OBJETIVOS | 30 |
| 4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL | 31 |
| 5. METODOLOGÍA | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 5.1 Material biológico..... | 32 |
| 5.1.1 Cultivo de tubérculos de papa | 32 |
| 5.1.2 Inducción de callo de papa | 32 |
| 5.2 Diseño de las construcciones genéticas | 33 |
| 5.2.1 Extracción de RNA's totales | 33 |
| 5.2.2 Síntesis del cDNA | 35 |
| 5.2.3 Amplificación por PCR de <i>StTCTP</i> | 36 |
| 5.2.4 Clonación del ORF de <i>StTCTP</i> en el vector pCR8/GW/TOPO..... | 37 |
| 5.2.5 Transformación de las bacterias | 37 |
| 5.2.6 Selección de clona por ensayo de PCR en colonia | 38 |
| 5.2.7 Purificación del DNA plasmídico recombinante de las clonas de interés | 39 |
| 5.2.8 Análisis de la orientación del inserto ORF-<i>StTCTP</i> | 40 |
| 5.2.9 Subclonación en el vector binario de expresión en plantas | 40 |
| 5.2.10 Recombinación específica de sitio Gateway LR Clonase II | 41 |
| 5.2.11 Transformación en <i>Agrobacterium tumefaciens</i> por electroporación | 42 |
| 5.3 Transformación transitoria de <i>S. tuberosum</i> con <i>A. rhizogenes</i> K599 | 43 |
| 5.3.1 Análisis de las plantas transformadas transitoriamente | 43 |

| | |
|--|-----------|
| 5.3.2 Síntesis de cDNA de los tejidos de las plantas transformadas por agroinfiltración | 44 |
| 5.3.3 Detección de GFP y GAPDH por RT-PCR punto final | 44 |
| 5.3.4 Detección de los niveles de expresión de StTCTP por medio de PCR tiempo real | 46 |
| 5.3.5 Detección de StTCTP por western blot | 47 |
| 5.4 Ensayo de inducción de brotes | 49 |
| 5.5 Predicción de las estructuras 3D..... | 50 |
| 5.5.1 Predicción de las estructuras 3D de los mRNA | 50 |
| 5.5.2 Predicción de las estructuras 3D de las proteínas | 51 |
| 5.5.3 Docking molecular proteína-RNA | 52 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 53 |
| 6.1 Amplificación por PCR punto final del gen que codifica a <i>StTCTP</i>..... | 53 |
| 6.1.1 Clonación del gen que codifica a <i>StTCTP</i> en el vector pCR8/GW/TOPO | 54 |
| 6.1.2 Subclonación del gen que codifica a <i>StTCTP</i> en los vectores de expresión en plantas pB7FWG.2 y pB7G2D.1 | 56 |
| 6.2 Transformación transitoria de <i>S. tuberosum</i> mediada por <i>A. rhizogenes</i> K599 transformada con los vectores StTCTP::GFP y | |

| | |
|---|------------|
| GFP::GUS..... | 57 |
| 6.2.1 Análisis por RT-PCR punto final..... | 58 |
| 6.2.2 Análisis por RT-qPCR..... | 62 |
| 6.2.3 Detección de StTCTP por Western blot en el ápice de las plantas agroinfiltradas..... | 66 |
| 6.3 Fenotipo de las plantas agroinfiltradas con el vector StTCTP::GFP y GFP::GUS..... | 70 |
| 6.4 Fenotipo de tubérculos y brotes obtenidos de las plantas agroinfiltradas con el vector StTCTP::GFP y GFP::GUS..... | 80 |
| 6.5 Predicción de las estructuras terciarias hipotéticas de los transcritos y proteínas..... | 84 |
| 6.5.1 Predicción del acoplamiento molecular proteína-RNA..... | 94 |
| 6.6 Modelo del transporte a larga distancia del transcrito de <i>StTCTP</i> y su posible efecto en el fenotipo de los tubérculos y brotes..... | 99 |
| 7. CONCLUSIONES..... | 103 |
| 8. PERSPECTIVAS..... | 104 |
| 8. REFERENCIAS..... | 106 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Estructura de TCTP de levadura..... | 22 |
| Figura 2. Representación de la construcción <i>StTCTP::GFP</i> | 33 |
| Figura 3. Amplificación del gen que codifica al ORF de <i>StTCTP</i> mediante PCR | 54 |
| Figura 4. Representación del vector de entrada pCR®8/GW/TOPO® y doble restricción del vector pCR8/GW/TOPO-ORF <i>StTCTP</i> | 55 |
| Figura 5. Clonación del ORF de <i>StTCTP</i> en el vector de expresión binario en plantas pB7FWG.2 | 56 |
| Figura 6. Agroinfiltración de las hojas de papa con <i>A. rhizogenes</i> K599..... | 57 |
| Figura 7. Detección de <i>GFP</i> mediante RT-PCR de punto final del cDNA sintetizado a partir de los RNA totales purificados de las hojas agroinfiltradas y sistémicas | 59 |
| Figura 8. Detección de <i>GAPDH</i> mediante RT-PCR de punto final del cDNA sintetizado a partir de los RNA totales purificados de las hojas agroinfiltradas y sistémicas | 61 |
| Figura 9. Niveles de acumulación relativa del mRNA de <i>StTCTP</i> , <i>GFP</i> y <i>bar</i> detectados por RT-qPCR en hojas sistémicas, hojas agroinfiltradas y raíz transformadas transitoriamente con los vectores <i>StTCTP::GFP</i> o <i>GFP::GUS</i> | 65 |
| Figura 10. Niveles de expresión relativa del mRNA de <i>StTCTP</i> | 66 |
| Figura 11. Perfil proteico de las proteínas totales de papa utilizando concentraciones crecientes..... | 67 |
| Figura 12. Detección de <i>StTCTP</i> fusionada a <i>GFP</i> y <i>StTCTP</i> nativa por Western blot en plantas agroinfiltradas con <i>StTCTP::GFP</i> y <i>GFP::GUS</i> | 70 |

| | |
|--|------------|
| Figura 13. Fenotipo de los tubérculos y las plantas agroinfiltradas con las construcciones <i>StTCTP::GFP</i> y <i>GFP::GUS</i> | 71 |
| Figura 14. Formación de tubérculos de las plantas agroinfiltradas con el vector <i>StTCTP::GFP</i> | 77 |
| Figura 15. Inducción de plántulas por efecto de la transformación transitoria con <i>StTCTP::GFP</i> | 79 |
| Figura 16. Fenotipo de los brotes emergentes de los tubérculos de las plantas modificadas transitoriamente con los vectores <i>StTCTP::GFP</i> y <i>GFP::GUS</i> | 83 |
| Figura 17. Predicciones del acoplamiento molecular entre los transcritos de <i>StTCTP</i> , <i>AtTCTP1</i> , <i>AtTCTP2</i> , <i>CmTCTP</i> y <i>StBEL5</i> con las proteínas PTB1 y PTB6 | 98 |
| Figura 18. Modelo del transporte a larga distancia del mRNA de <i>StTCTP</i> | 101 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----------|
| Tabla 1. Oligonucleótidos específicos del ORF de StTCTP | 36 |
| Tabla 2. Oligonucleótidos específicos para los ensayos de RT-PCR punto final | 45 |
| Tabla 3. Oligonucleótidos específicos para los ensayos de RT-qPCR | 46 |
| Tabla 4. Tubérculos obtenidos a partir de plantas sometidas a la agroinfiltración con los vectores <i>StTCTP::GFP</i> y <i>GFP::GUS</i> | 74 |
| Tabla 5. Códigos de acceso de secuencias de los mRNA empleados para las predicciones 3D | 85 |
| Tabla 6. Estructura secundaria en formato Vienna de los transcritos <i>StTCTP</i> , <i>AtTCTP1</i> , <i>AtTCTP2</i> , <i>CmTCTP</i> y <i>StBEL5</i> | 85 |
| Tabla 7. Estimación de la puntuación de MolProbity en modelos tridimensionales de mRNA | 88 |
| Tabla 8. Validación de la estructura del mRNA: valores de los gráficos de pseudotorsión..... | 90 |
| Tabla 9. Puntuación MolProbity para los modelos PTB1 y PTB6 | 92 |
| Tabla 10. Evaluación de la validez estructural (SAVES v6.0) de los modelos refinados PTB1 y PTB6..... | 93 |
| Tabla 11. Calidad de las estructuras proteína-mRNA calculadas en HDock | 95 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------------|--|
| cDNA | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| GEF | Factor de intercambio de nucleótidos de guanina |
| GFP | Proteína verde fluorescente |
| HRF | Factor de liberación de histamina |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensajero |
| ORF | Marco de lectura abierto |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa |
| RT-qPCR | Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa |
| TCTP | Proteína tumoral controlada traduccionalmente |
| UTR | Región no traducible |

RESUMEN

En las plantas, las señales a larga distancia, que incluyen diferentes tipos de RNA, desempeñan un papel de suma importancia en el desarrollo de la planta y las respuestas a diferentes condiciones ambientales. Dentro de estas señales móviles, se encuentra el mRNA de la proteína conocida como TCTP (Tumor Protein Translational Controlled) el cual se destaca por su abundancia y diversidad de funciones en los organismos eucariotas. Se determinó que TCTP participa en la regulación del ciclo celular, la apoptosis, estrés biótico y abiótico, nodulación, entre otros. Además, se ha relacionado con procesos de regeneración en plantas como la formación de raíces adventicias, nodulación y aumento en la biomasa, lo que sugiere su implicación en la propagación vegetativa y la reproducción asexual.

Con el fin de comprender mejor la influencia de TCTP en estos procesos, propusimos estudiar a este gen en *Solanum tuberosum*, planta capaz de reproducirse asexualmente a través de estolones y tubérculos. En este proyecto, analizamos la sobreexpresión transitoria de *TCTP* de *S. tuberosum* (*StTCTP*) en el desarrollo del tubérculo y la propagación vegetativa. Observamos que el transcrito de *StTCTP* es capaz de moverse a larga distancia en la planta. Además, la sobreexpresión temporal de *StTCTP* generó brotes con un diámetro mayor en comparación con las plantas de control. También notamos la inducción de las primeras etapas de la tuberización en estas plantas, mientras que en las plantas de control solo se formaban tubérculos maduros. Estos hallazgos sugieren un

papel fundamental de TCTP en la propagación vegetativa y la reproducción asexual de las plantas.

ABSTRACT

In plants, long-distance signals, which include different types of RNA, play a major role in plant development and responses to different environmental conditions. Within these mobile signals, there is the mRNA of the protein known as TCTP (Tumor Protein Translational Controlled) which stands out for its abundance and diversity of functions in eukaryotic organisms. It is determined that TCTP participates in the regulation of the cell cycle, apoptosis, biotic and abiotic stress, nodulation, among others. Furthermore, it has been related to regeneration processes in plants such as the formation of adventitious roots, nodulation and increase in biomass, which suggests its involvement in vegetative propagation and asexual reproduction.

In order to better understand the influence of TCTP on these processes, we proposed to study this gene in *Solanum tuberosum*, a plant capable of reproducing asexually through stolons and tubers. In this project, we analyzed the transient overexpression of *S. tuberosum* TCTP (*StTCTP*) in tuber development and vegetative propagation. We observed that the *StTCTP* transcript is capable of long-distance movement in the plant. Furthermore, transient overexpression of *StTCTP* generated shoots with a larger diameter compared to control plants. We also noted the induction of early stages of tuberization in these plants, while only mature tubers were formed in control plants.

These findings suggest a fundamental role of TCTP in the vegetative propagation and asexual reproduction of plants.

1. INTRODUCCIÓN

La proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP, por sus siglas en inglés), también conocida como p21, p23 y fortilina, es una proteína conservada y multifuncional implicada en numerosos procesos celulares en eucariotas, fue descubierta a mediados de los años 80 por tres grupos de investigación interesados en genes regulados traduccionalmente (Bommer y Thiele, 2004). La estructura primaria de TCTP no revela similitud con alguna otra familia de proteínas (Gross *et al.*, 1989), sin embargo, con el descubrimiento de la estructura terciaria de TCTP de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, se ha podido relacionar con la familia de pequeñas chaperonas Mss4/Dss4 (Thaw *et al.*, 2001).

TCTP está relacionada con diversas actividades fisiológicas como proliferación, progresión del ciclo celular, crecimiento celular, desarrollo embrionario, respuestas a estrés, protección bajo condiciones de estrés, tumorigénesis, integridad del genoma y muerte celular, incluyendo apoptosis (Liu *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005; Rinnerthaler *et al.*, 2006; Brioude *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2016). En mamíferos, TCTP actúa de manera celular no autónoma ya que es secretada por diversos tipos celulares y modula respuestas inmunes; asimismo, actúa como factor de crecimiento para células B y provoca la liberación de histamina en células cebadas y basófilos, por lo que es de gran importancia médica (Bommer y Thiele, 2004; Calderón-Pérez *et al.*, 2014).

Hasta el día de hoy, se ha logrado elucidar la estructura del gen de *TCTP* en múltiples especies, revelando algunas similitudes en la organización genética de organismos filogenéticamente relacionados. Además, la evidencia *in silico* sugiere que a lo largo de la evolución, estos genes han conservado de manera específica las estructuras secundarias de las proteínas, de acuerdo con la historia filogenética del linaje (Gutiérrez-Galeano *et al.*, 2014; Koo *et al.*, 2020; Lagunas-Rangel, 2022). En algunos mamíferos como el humano, ratón y conejo, el gen de *TCTP* está conformada por 6 exones y 5 intrones. En el exón 6 se encuentra la región 3' no traducible (3'-UTR) del mRNA. El promotor del gen de *TCTP* contiene una secuencia TATA consenso (5'-TATAAA-3') y diversos elementos regulatorios altamente conservados en los promotores de mamíferos (Thiele *et al.*, 2000).

En plantas, se ha determinado que la sobreexpresión de TCTP impacta la producción de biomasa y afecta el funcionamiento de la planta bajo estrés osmótico y salino (De Carvalho *et al.*, 2017). En el árbol del caucho, se ha localizado a la proteína TCTP1 en la membrana, citoplasma y núcleo, además, ésta interactúa con el factor de elongación del caucho (REF), una proteína de choque térmico de 17.5 kDa, anexina y una proteína relacionada con el estrés REF-like (Bruckner *et al.*, 2017).

La función de TCTP es conservada, como ejemplo, el gen *AtTCTP* de *Arabidopsis* puede rescatar las mutantes de *Drosophila* y viceversa (Amson *et al.*, 2012, 2013). En el caso de las plantas, el RNA mensajero o la proteína han sido encontrados en la savia de floema de diferentes especies, sugiriendo que tienen una función de señalización a larga distancia (Rodríguez-Medina *et al.*, 2011; Hinojosa-Moya *et al.*, 2013; Toscano-Morales *et al.*, 2014). Se ha encontrado que en plantas TCTP puede

tener funciones adicionales, como en la respuesta de defensa y muerte celular programada (Thébault *et al.*, 2016), puede promover infección viral (Bruckner *et al.*, 2017), nodulación (Chou *et al.*, 2016) y regeneración (Hinojosa-Moya *et al.*, 2013; Toscano-Morales *et al.*, 2015). Sin embargo, se desconocen los mecanismos detallados por los que TCTP media esos procesos.

En este estudio, nuestra meta principal fue profundizar en la comprensión del papel de TCTP en el proceso de regulación de la regeneración, un tipo de diferenciación que tiene lugar en las plantas y que se considera una aproximación a la reproducción vegetativa *in vitro*. Utilizamos como modelo el gen *TCTP* de *Solanum tuberosum* (cuyo nombre común es “papa”), una especie en la que se produce la reproducción vegetativa. Considerando, asimismo, que AtTCTP2, tanto RNA como proteína, se desplaza a larga distancia y es capaz de inducir regeneración (Toscano-Morales *et al.*, 2014, 2015), también usaremos a este gen como modelo.

1.1 Diferenciación celular

La diferenciación celular es el proceso en el cual cambia el destino celular a una etapa más especializadas con el fin de llevar a cabo funciones específicas, este proceso es esencial para el desarrollo, crecimiento, reproducción y longevidad de todos los organismos multicelulares, por ende, su regulación ha sido un foco de estudio para muchos investigadores (Birnbaum y Alvarado, 2008).

1.1.2 Diferenciación celular en plantas

Las plantas, tanto a nivel celular como tisular, experimentan tres etapas de desarrollo: competencia morfogénica, determinación del desarrollo y diferenciación morfológica

(Christianson y Warnick, 1983). La competencia morfogénica se define como la capacidad de la célula para reconocer una señal específica que conduce a un desarrollo particular (Tada, 2021). Las células competentes se determinan por inducción, un proceso mediante el cual una señal morfogénica actúa sobre estas, redirigiendo su desarrollo. Posteriormente, algunas células entran en un estado de diferenciación, asumiendo una nueva organización de tejidos. Estas tres etapas conforman el proceso morfogénico de la planta, el cual es regulado por factores intrínsecos y extrínsecos. Estos factores actuarán modulando la actividad celular a un desarrollo particular en una dirección específica, o mediante la reprogramación celular con la restauración de sus características de totipotencia (Shao y Dong, 2016; Zhang y Dong, 2018).

El proceso de morfogénesis está íntimamente relacionado con la competencia de la célula para responder a los signos de factores extrínsecos e intrínsecos, que comienza por la ruptura de la determinación celular y con las primeras divisiones celulares que originan los centros meristemáticos o meristemoides (Dhaliwal *et al.*, 2003). La adquisición de competencia corresponde particularmente a la capacidad de una célula blanco determinada para responder de forma definida a una señal hormonal específica (Thompson, 2007; Cedzich *et al.*, 2008). En este contexto, la capacidad de los meristemas para desarrollar un nuevo organismo a partir de un explante depende de distintas etapas, incluida la adquisición de la competencia, la inducción o la determinación morfogénica de una ruta específica, la diferenciación y finalmente el desarrollo (Christianson y Warnick, 1983; Fraga *et al.*, 2023). Existe una relación directa entre la capacidad de la célula para originar distintos tipos de células y los

grados de desdiferenciación y competencia morfogénica de la misma. Según el grado de desdiferenciación, las células se pueden caracterizar en multipotentes, totipotentes y pluripotentes (Glover, 2000; Melnyk, 2017; Guo y Dong, 2022).

La multipotencia celular corresponde a la capacidad de una célula única para producir diferentes tipos de células dentro de un linaje celular particular (Hochedlinger y Plath, 2009), mientras que la pluripotencia corresponde a la capacidad de la célula para diferenciarse en la mayoría de los tipos celulares, pero no en la totalidad de los tipos requeridos para la formación del cuerpo de la planta, teniendo como ejemplo la formación de un brote o raíz (Gaillochet y Lohmann, 2015). Las células totipotentes, a su vez, pueden causar que todos los tipos de células constituyan el cuerpo de la planta (Verdeil *et al.*, 2007). Por lo tanto, las células madre o las células diana son ejemplos de células totipotentes, que después de renovarse, pueden activar uno o más programas de diferenciación celular (Vernoux y Benfey, 2005).

La diferenciación celular en plantas se manifiesta muy temprano y más notablemente en una separación local de células (o una célula) que están en proceso de proliferación (células meristemáticas) y otras células que han dejado de hacerlo pero que han asumido otras funciones importantes para el individuo (células permanentes, maduras o especializadas) (Stange, 1964).

Las células meristemáticas apicales y de la raíz tienen competencia para desarrollar células iniciales, manteniendo su condición meristemática. Sin embargo, un cambio en la programación o reprogramación a nivel celular, induce la producción de células derivadas, las cuales son capaces de diferenciarse, resultando en diferentes células

que constituirán a los tejidos meristemáticos primarios de la planta completa (por ejemplo: el protodermo, el tejido meristemático fundamental y el procambium) la especialización celular es conocida como la determinación celular. La determinación celular es el proceso en el cual el desarrollo de competencia de una célula llega a ser limitado a una ruta específica (Christianson y Warnick, 1983).

1.2 Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente (TCTP)

La proteína tumoral controlada traduccionalmente, TCTP o P23, representa una familia grande de proteínas que son ubicuas en los eucariotas. Estas proteínas tienen una amplia gama de funciones y actividades bioquímicas. Aún no se ha esclarecido su papel en el crecimiento y desarrollo, pero las secuencias son conservadas y tienen altos niveles de expresión en diversos organismos, lo cual indica que TCTP es esencial en las rutas de señalización (Chen *et al.*, 2007; Hsu *et al.*, 2007).

1.2.1 Gen

La estructura de los genes de *TCTP* de humanos, ratón y conejo es idéntica en cuanto a la organización de intrones y exones, la cual corresponde a cinco intrones y seis exones. El exón seis comprende la región 3'-UTR del mRNA. El gen *TCTP1* contiene un promotor con una caja TATA canónica y varios elementos promotores. En ensayos con genes reporteros, se terminó que esta región presenta una fuerte actividad promotora comprada con promotores virales (Bommer y Thiele, 2004).

Existe un número variable de genes *TCTP* en diferentes organismos; en mamíferos existe el mayor número de secuencias de *TCTP* y *TCTP*-like por genoma (por ejemplo, en humanos, ratones y ratas, cada una alberga tres genes de TCTP y un gran número

de pseudogenes), las plantas y hongos contienen uno o dos genes de *TCTP*, en general (Hinojosa-Moya *et al.*, 2008). Es posible que en organismos con múltiples genes de *TCTP*, éstos tengan funciones redundantes, sin embargo, en algunos casos es posible que cada uno lleve a cabo las mismas o diferentes funciones (Gutiérrez-Galeano *et al.*, 2014).

1.2.2 mRNA

Los mRNA de *TCTP* tienen las siguientes características de un mRNA controlado traduccionalmente:

- 1) El extremo 5'-UTR comienza con una secuencia de oligopirimidina en el extremo 5' (5'-TOP), característico de ciertos grupos de mRNAs controlados traduccionalmente.
- 2) El extremo 5'-UTR es rico en CG (cerca de 80 %), que es indicativo de un alto grado de estructura secundaria. El mRNA de *TCTP* de ratón ha mostrado tener estructura secundaria, y esto le permite unirse a, y activar, a la proteína cinasa dependiente de RNA de cadena doble (dsRNA o dcRNA) PKR (Bommer *et al.*, 2002).
- 3) El extremo 3'-UTR contiene regiones ricas en AU y elementos AUUUA, sin embargo, estos no coinciden con los elementos de inestabilidad clásicos de mRNA.

1.2.3 Proteína

Los alineamientos de las secuencias de *TCTP* de más de 30 especies diferentes revela un alto grado de conservación a lo largo periodo de la evolución.

Se han observado diversas diferencias estructurales entre las TCTPs de mamíferos y plantas, como algunos sitios putativos de fosforilación que son exclusivos en TCTPs de plantas; estos sitios pueden ser blancos de cinasas tipo C y podrían estar involucrados en funciones específicas de TCTP en plantas (Venugopal, 2005). La expresión de *TCTP* puede estar inducida por distintos tipos de estrés, los cuales incluyen sequía, salinidad, altas temperaturas, heladas y toxicidad a aluminio (Ermolayev, 2003; Lee y Lee, 2003; Fabro *et al.*, 2008; Liao *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2011).

TCTP es una proteína cuyo peso es de 20-25 kDa, y su estructura comprende 4 hojas β plegadas que están designadas de A-D y 3 hélices α designadas como H1-H3 (Figura 1). Las cuatro láminas de la hoja A se acomodan frente a tres láminas de la hoja B y la hélice H1. La hélice H3 se localiza del lado opuesto a la hoja A exponiendo la región hidrofílica de la molécula. La hélice H2 se encuentra frente a la hélice H3, los residuos Ile 8-Asp 11 y Lys 60-Leu 163, así como la región de Ser 135-Val 142. La hoja C, constituida por 2 láminas β , forma una protuberancia que sale de la estructura globular de la molécula y en cuya parte distal se encuentra un asa flexible. El conjunto de elementos estructurales localizados frente a la hoja A genera dos regiones hidrofóbicas denominadas núcleo 1 y 2, respectivamente (Thaw *et al.*, 2001).

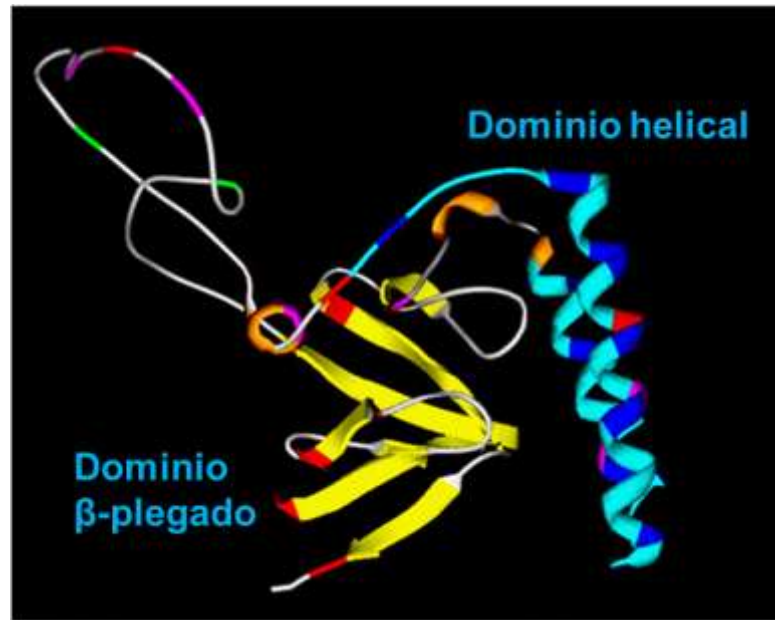


Figura 1. Estructura de TCTP de levadura. TCTP presenta una estructura que contiene por cuatro hojas β plegadas (dominio β plegada) y tres hélices α (dominio helical). (Modificado de Thaw *et al.*, 2001)

1.2.4 Función de TCTP

En general, se ha determinado que TCTP tiene funciones moleculares relacionadas con la unión a tubulina (Gachet *et al.*, 1999) y a calcio (Kim *et al.*, 2000). Ambos coinciden con el dominio helical, el cual presenta la parte más alcalina de la molécula (Thaw *et al.*, 2001). Los aminoácidos conservados en todas las TCTPs se encuentran agrupados rodeando la superficie de interacción con GTPasas. Por lo tanto, tomando en cuenta que TCTP tiene homología estructural con chaperoninas pequeñas Mss4/Dss4, se le ha atribuido la propiedad de unión a GTPasas (Thaw *et al.*, 2001). Se ha encontrado que TCTP puede interactuar también con la subfamilia Rheb de las Ras GTPasas (Chen *et al.*, 2007).

1.2.5 Regulación transcripcional y traduccional de TCTP

En eucariotas, especialmente mamíferos, las regiones promotoras del gen *TCTP* son altamente conservadas, como se mencionó anteriormente e, *in silico*, se predicen sitios de unión a factores de transcripción (Chan *et al.*, 2012). Se ha demostrado que la transcripción de *TCTP* es regulada por la señalización vía cAMP mediante la interacción con CRE/CREB por activación dependiente de la fosforilación. También se ha demostrado que TCTP presenta dos regiones de unión al factor de transcripción CHD1L (C/A-C-A/T-T-T-T) en las posiciones -748 pb y -851 pb de la región promotora. La unión de CHD1L a estas secuencias activa la transcripción del gen *TCTP* (Chan, Chen, Liu, *et al.*, 2012). Otro factor que participa en la regulación de la transcripción de *TCTP* es la proteína supresora de tumores p53 (Amson *et al.*, 2012).

Los mecanismos de regulación traduccional de TCTP incluyen la activación del factor de inicio de la traducción eIF4E y de la cinasa de la proteína ribosomal S6, la cual está implicada en la activación de la traducción de los mRNAs con secuencia oligopirimidina en la región 5' terminal. Debido a la formación de estructuras secundarias, el mRNA de *TCTP* se une y activa a la proteína cinasa R (PKR), la cual es regulada por dsRNA (Bommer *et al.*, 2002). También se ha descrito que el mRNA de *TCTP* se encuentra como partículas ribonucleoproteicas (mRNP) y estos complejos participan en la regulación traduccional del mRNA (Bommer y Thiele, 2004).

1.3 *Solanum tuberosum* L

La papa (*Solanum tuberosum* L.) tiene sus orígenes en los Andes y ha sido un alimento fundamental para la población local durante más de 8000 años (Spooner *et al.*, 2005). En la actualidad, se cultiva extensamente en más de 150 países y regiones de todo el mundo, convirtiéndose en el tercer cultivo alimentario más consumido a nivel global, después del arroz y el trigo (<http://faostar.fao.org>) (Spooner *et al.*, 2007).

La papa es una planta geófito que posee un sistema de reproducción dual. Desarrolla órganos de almacenamiento vegetativo conocidos como tubérculos y, además, lleva a cabo la propagación sexual estrictamente regulada para garantizar su supervivencia en condiciones climáticas adversas (Khosa *et al.*, 2021; Valencia-Lozano *et al.*, 2022).

1.3.1 Propagación vegetativa de *Solanum tuberosum* (tuberización)

Los tubérculos desempeñan una doble función como órganos de almacenamiento y como parte del sistema de propagación vegetativa. La tuberización es un proceso de desarrollo único en el cual el estolón se origina en la base del tallo principal y se extiende horizontalmente. Cuando se expone a suficiente luz, el estolón se vuelve fotosintéticamente activo y emerge del suelo, dando lugar a un nuevo brote que actúa como una planta madura. Bajo condiciones inductivas, el crecimiento longitudinal del estolón se detiene, desencadenando la expansión radial en la región subapical del estolón. Con el tiempo, esto da lugar a la formación de un tubérculo maduro (Xin Xu *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998).

Numerosos análisis transcriptómicos del proceso de tuberización en la papa han revelado la existencia de una maquinaria molecular conservada. Esta incluye

miembros de la familia de proteínas que unen fosfatidiletanolamina (PEBP, por sus siglas en inglés) FLOWERING LOCUS T (FT) y FT-like (codificados por los denominados inicialmente genes florígeno y tuberígeno), que responden a regulación del fotoperiodo, y que causan control transcripcional, síntesis de proteínas, regulación del ciclo celular, vías metabólicas, metabolismo secundario, y procesos relacionados con la síntesis e hidrólisis de almidón y movilización de sacarosa, señalización hormonal, entre otros (Crookshanks *et al.*, 2001; Shan *et al.*, 2013; Gong *et al.*, 2015; Tiwari *et al.*, 2015).

La tuberización en la papa está regulada por señales móviles que se originan en las hojas y circulan a través del floema. De acuerdo con investigaciones previas, las tres señales más significativas que controlan el inicio de la formación de tubérculos en la papa son el *CYCLING DOF FACTOR1* (*StCDF1*), *SELF-PRUNING 6A* (*StSP6A*) y *BEL1-like family 5* (*StBEL5*) (Banerjee *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2011). Se ha identificado la proteína *StSP6A*, un homólogo de FT, que induce floración regulada por fotoperíodo en diversas especies vegetales (Lin *et al.*, 2007) como un tuberógeno que tiene la capacidad de transportarse desde las hojas hasta los estolones, desencadenando así la iniciación de la formación de tubérculos (Navarro *et al.*, 2011). *StCDF1* es otro gen clave dentro de la vía de tuberización CO-FT. Este gen promueve el proceso de tuberización al inhibir la expresión de *StCOL1* y, de esta manera, desbloquear la vía que involucra al gen *StSP6A* (Kloosterman *et al.*, 2013). Además, el factor de transcripción *StBEL5* formando un heterodímero con *POTH1* (*potato homeobox 1*) desempeña un papel crucial en la regulación de la formación de tubérculos, actuando como señal a larga distancia (Sharma *et al.*, 2016). La

sobreexpresión de cada uno de estos genes en líneas de papa transgénica resultó en plantas con un aumento significativo en el rendimiento de tubérculos. Los experimentos de heteroinjerto confirmaron que el mRNA de *StBEL5* es capaz de moverse hacia el ápice y raíces de la planta (Banerjee *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2016).

1.4. Antecedentes directos

En plantas, se ha determinado que existe una ruta que regula la homeostasis metabólica similar a la de TOR (Target of Rapamycin, por sus siglas en Inglés) en animales, lo cual se vio apoyado por el hecho de que encontraron homólogos de proteínas que pertenecen a dicha ruta, como la proteína TOR, la S6 cinasa y la proteína Raptor (Menand *et al.*, 2002). TCTP actúa como factor de intercambio de nucleótidos de guanina de Rheb, una Ras GTPasa que controla la actividad de TOR en *Drosophila melanogaster* (Hsu *et al.*, 2007). En plantas, TCTP es un importante regulador del crecimiento, el cual conserva una función como mediador de la actividad TOR similar a la conocida en sistemas no vegetales (Berkowitz *et al.*, 2009).

En diversos estudios se han identificado variaciones en los niveles de transcripción y proteínas de TCTP en respuesta a diversas condiciones fisiológicas, tales como estrés lumínico, altas concentraciones de metales, exposición a heladas, procesos de transformación mediados por *Agrobacterium*, fertilización de núcleos celulares, entre otros (Ermolayev, 2003; Lee y Lee, 2003; Kikuchi *et al.*, 2005).

Así mismo, se ha demostrado que tanto el ARN como la proteína de AtTCTP2 pueden trasladarse a largas distancias en injertos de tabaco (transgénico/silvestre y

silvestre/transgénico). Estos resultados indican que el mRNA y la proteína de AtTCTP2 tienen la capacidad de moverse en ambas direcciones. Además, se observó la formación de raíces aéreas exclusivamente en aquellas plantas injertadas donde se detectó la presencia de la proteína en ambas partes del injerto (portainjerto e injerto). Esto sugiere una correlación entre la presencia de AtTCTP2 y el desarrollo de raíces aéreas, y es importante señalar que se encontró la presencia del transgen, el mRNA y la proteína en estas raíces aéreas (Toscano-Morales *et al.*, 2014).

Arabidopsis alberga dos genes de TCTP, *AtTCTP1* (número de acceso At3g16640), que es un importante regulador mitótico y *AtTCTP2* (número de acceso At3g05540), que fue considerado inicialmente como un pseudogen. Sin embargo, se ha encontrado que éste es un gen funcional. Por medio de mutantes de inserción de ADN-T, SALK_045146, se observó un fenotipo letal durante la etapa inicial de roseta, además las plantas heterocigóticas mostraron un retraso en el desarrollo. Se evidenció que *AtTCTP1* no puede compensar la pérdida de *AtTCTP2*, ya que los niveles de acumulación del transcrito de *AtTCTP1* son más altos en plantas heterocigóticas que en plantas de tipo silvestre. Así mismo, los explantes de las hojas transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* que contiene a *AtTCTP2*, pero no *AtTCTP1*, condujeron a la regeneración de toda la planta. Además, realizaron la inserción de una secuencia presente en *AtTCTP1* (la codificante para el fragmento WVIVGAVDVNIGA que se encuentra en el N-terminal de *AtTCTP1*) pero ausente en *AtTCTP2*, lo cual suprimió la capacidad de regeneración inducida por dicho gen; por otra parte, la eliminación de la misma secuencia de *AtTCTP1* aumentó la capacidad de regeneración. Todo lo anterior confirmó que *AtTCTP2* no es un pseudogen y sugiere la participación de ciertas

isoformas de *TCTP* en la reproducción vegetativa en algunas especies de plantas, además de que TCTP está involucrada en la regeneración y diferenciación celular (Toscano-Morales *et al.*, 2015).

Un estudio adicional respalda los hallazgos previamente mencionados, el cual se llevó a cabo utilizando calabaza como modelo de estudio, y se descubrió que el mRNA de *CmTCTP* se acumula en diversos tejidos de la planta, como el floema en etapa de desarrollo y maduro, pecíolo y raíces, además de los meristemos apicales, tanto en plantas sanas como en aquellas infectadas con CMV (Hinojosa-Moya *et al.*, 2013). Además, se encontró que *CmTCTP* presente en *A. rhizogenes* es capaz de inducir la regeneración de toda la planta, sugiriendo que *CmTCTP* podría participar en la regulación del crecimiento, posiblemente a través de la señalización a larga distancia.

Mediante análisis *in silico* sobre la predicción de las estructuras terciarias de TCTP, se infirió que este grupo de proteínas se pueden dividir en los grupos AtTCTP1 y CmTCTP. De acuerdo con esta clasificación, es posible determinar la probable función de TCTP en las plantas. En concreto, *Solanum tuberosum* posee exclusivamente un gen codificante para StTCTP. En especies que albergan un solo gen *TCTP*, es plausible que éste desempeñe diversas funciones. (Gutiérrez-Galeano *et al.*, 2014). En función de la estructura 3D hipotética para StTCTP, la cual se encuentra en el grupo de las estructuras similares a CmTCTP, es posible determinar que StTCTP podría jugar un papel en la propagación vegetativa, que es un tipo de diferenciación celular.

2. JUSTIFICACIÓN

TCTP desempeña un papel crucial en la diferenciación y proliferación celular, aunque aún no se comprende completamente el mecanismo que subyace en estos procesos. Explorar el papel de TCTP en un modelo específico como la papa, que presenta un solo gen codificante para esta proteína, podría proporcionar información valiosa sobre su función en procesos de diferenciación, como la tuberización y la regeneración, así como en la señalización a larga distancia.

2.1. Hipótesis

Dada la capacidad demostrada de TCTP para transportarse a larga distancia en diferentes modelos vegetales y su capacidad para inducir la regeneración completa de una planta, se plantea la hipótesis de que TCTP, especialmente la presente en papa (*StTCTP*), juega un papel crucial en los procesos de diferenciación y regeneración en plantas. Se anticipa que la modulación de la expresión de *StTCTP* tendrá un impacto significativo en la capacidad de las plantas para llevar a cabo procesos de reproducción vegetativa y regeneración, proporcionando una nueva comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes.

3. OBJETIVOS

1. Determinar la función de StTCTP en la diferenciación y propagación vegetativa de papa.
2. Analizar la capacidad del RNA de *StTCTP* de transportarse y señalar a larga distancia.

4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental se dividió en dos etapas que se explican a continuación:

1. Diseño de la construcción genética en un vector binario de expresión en plantas que alberga a *StTCTP* fusionada a *GFP* bajo el control de del promotor 35S, así como la transformación transitoria de las plantas con esta construcción. Detección del transgen y la proteína *StTCTP* fusionada a su reportero.
2. Incubación de las plantas transformadas transitoriamente para el análisis del fenotipo, así como el análisis fenotípico de los tubérculos resultantes de las plantas transformadas.

5. METODOLOGÍA

5.1 Material biológico

5.1.1 Cultivo de tubérculos de papa

Los tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L. tipo Cambray) fueron desinfectados con Tween-20 1% (v/v) en agitación constante por 10 min y enjuagados con agua destilada estéril, este procedimiento fue realizado tres veces. En seguida los tubérculos fueron incubados a 4 °C en condiciones de oscuridad hasta la emergencia de los brotes; este proceso tuvo una duración aproximada de 2 semanas. Los tubérculos que presentaron brotes, fueron seleccionados y sembrados en macetas de 40 cm de profundidad conteniendo tierra estéril (tierra:turba:agrolita; en una proporción 2:2:1). Los tubérculos fueron mantenidos en condiciones de invernadero, además, la tierra fue removida con sumo cuidado dos veces a la semana para promover la formación de raíces, tubérculos y la parte aérea de la planta. El riego se realizó tres veces a la semana.

5.1.2 Inducción de callo de papa

Para la detección de los niveles endógenos del transcrito de *StTCTP*, se indujo la formación del callo. Se realizaron cortes del tallo de 1 cm de largo, los cuales fueron desinfectados con cloro 0.5 % (v/v) y agua bidestilada estéril, este proceso fue repetido seis veces. Los explantes fueron colocados en medio MS (sales MS 1.0, sacarosa 2 % (p/v) y agar Gelrite 0.4 % (p/v) suplementado con 2, 4-D 0.5 mg/L y BA 2.0 mg/L, posteriormente, este material biológico fue cultivado en condiciones de oscuridad

hasta la formación de callo, el cual fue obtenido a los 10 días. Los reactivos empleados en esta sección, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).

5.2 Diseño de las construcciones genéticas

Para determinar la función de *StTCTP* se diseñó una construcción genética para sobre-expresar el transcrito, la cual se llevó a cabo con el promotor 35S, el cual es constitutivo e induce altos niveles de expresión génica en plantas. Como terminador, se empleó el T35S que contiene la señal de terminación de la transcripción del gen de agropina de *A. tumefaciens*.



Figura 2. Representación de la construcción *StTCTP::GFP*. El vector binario de expresión en plantas bajo el promotor 35S fue empleado para insertar el ORF de *StTCTP* sin el codón de paro fusionado al gen reportero que es codificante para *GFP*.

5.2.1 Extracción de RNA's totales

El tejido foliar, flores, tallo y callo de papa fueron colectados y desinfectados con cloro 0.2% (v/v) y agua bidestilada estéril, dicho proceso fue repetido cinco veces con excepción del callo, debido a que estas células fueron mantenidas en medio estéril desde su inducción. Posteriormente, 1 g del material biológico fue almacenado en tubos Eppendorf de 1.5 ml a -80 °C. La purificación del RNA, fue llevada a cabo

empleando el método de hidrocloreto de guanidinio, explicado a continuación: El tejido fue congelado con nitrógeno líquido y pulverizado con el uso de morteros y pistilos de cerámica esterilizados en autoclave. Se agregaron 2 volúmenes del amortiguador de guanidinio (hidrocloreto de guanidinio 8 M, ácido morfolino etanosulfónico (MES) 20mM, EDTA 20 mM y mercaptoetanol 50 mM, pH 7.0) al tejido, éste fue mezclado hasta obtener un producto homogéneo que fue incubado a temperatura ambiente por 1 h. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 4 °C , con una velocidad de 10,000 rpm por 10 min, el sobrenadante fue dispuesto en tubos Eppendorf de 2 ml, mientras que el producto de la precipitación fue descartado. Para la remoción de las proteínas, al sobrenadante se agregó 1 volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, v/v), la solución resultante fue mezclada gentilmente mediante inversión de los tubos 25 veces, en seguida, las muestras fueron centrifugadas por 45 min a 10,000 rpm a temperatura ambiente y, la fase acuosa, fue colocada en tubos Eppendorf de 1.5 ml estériles. La precipitación del RNA se llevó a cabo colocando 0.7 volúmenes de etanol concentrado y 0.2 volúmenes de ácido acético 1 M en la fase acuosa, los líquidos fueron mezclados con cuidado mediante inversión e incubados -20 °C por 16 h. En seguida, se realizó una centrifugación por a 4 °C, a una velocidad de 10,000 rpm por 10 min; al finalizar se decantó para obtener el precipitado que contiene al RNA, al cual fue agregado acetato de sodio 3 M pH 5.2 a temperatura ambiente. Posteriormente, se llevó a cabo una centrifugación por 5 min a 10,000 rpm. Finalmente, el precipitado resultante fue lavado con etanol 70 % (v/v) y centrifugado a 4 °C a una velocidad de 10,000 rpm por 10 min, proceso realizado tres veces. El precipitado fue disuelto en 20 µl de agua bidestilada estéril libre de RNAsas.

5.2.2 Síntesis del cDNA

El RNA total extraído de las muestras fue usado como molde para realizar la reacción de retrotranscripción con transcriptasa reversa SuperScript III (Thermo Fisher, Waltham, MA, EE.UU.) siguiendo las especificaciones indicadas en la ficha técnica del reactivo. Brevemente, a 1 μ l de RNA total se agregaron 150 ng de oligonucleótidos SMART, oligo (dT) y 0.5 μ l de una combinación de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP, cada uno a una concentración de 10 mM). Posteriormente, la mezcla fue completada con agua bidestilada estéril libre de nucleasas hasta obtener un volumen total de 6.5 μ l, en seguida, se realizó una incubación por a 65 °C por 5 min y, en seguida, 1 min en hielo. Al finalizar el tiempo ya indicado, se agregaron 2 μ l del amortiguador de síntesis de la primera cadena del cDNA (5X: Tris-HCl 250 mM, pH 8.3; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM), 0.5 μ l de DTT 0.1 M, 0.5 μ l del inhibidor de RNAsas RNaseOUT™ de Invitrogen (40 U/ μ L) y 0.5 μ l de la enzima transcriptasa reversa SuperScript III (200 U/ μ l). Se realizó la mezcla de los reactivos mediante succión y expulsión gentil del líquido con la micropipeta. El contenido de la reacción fue incubado a 50 °C por 60 min, finalmente, la reacción fue inactivada por medio su incubación a 70 °C por 15 min.

5.2.3 Amplificación por PCR de *StTCTP*

La secuencia del ORF que codifica a *StTCTP* fue analizada en la base de datos Phytozome 12 JGI (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) para determinar la secuencia de los oligonucleótidos específicos que fueron empleados en la construcción de sobreexpresión de *StTCTP*. Los oligonucleótidos fueron diseñados sin el codón de paro y se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos del ORF de *StTCTP*

| Gen | Sentido | Secuencia (5' - 3') | Longitud del amplicón (pb) |
|---------------------|---------|------------------------------------|----------------------------|
| <i>StTCTP</i> (ORF) | Directo | ATGGCCCTTTCTTGGTATGGTGCTGTTCTTG | 506 |
| | Reverso | CTAGCACTTGATCTCCTTCAAGCCAGGTGCAAGG | |

La amplificación del ORF de *StTCTP* fue llevada a cabo mediante PCR punto final con la polimerasa Takara ExTaq (Takara Bio USA, San Jose, CA, USA) empleando los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del ORF de *StTCTP*. La PCR fue realizada con 1 µl de cDNA, 2.5 µ del buffer 10x ExTaq Takara, Mg⁺² 20 mM, 2 µl de dNTPs 2.5 mM de ExTakara, 1 µl de los oligonucleótidos específicos (10 µM), 0.2 µl de la polimerasa de DNA TaKaRa Ex Taq (5 U/µL), finalmente, la mezcla se ajustó a un volumen final de 25 µl con agua bidestilada estéril libre de nucleasas. El protocolo de amplificación se ajustó a la TM de los oligonucleótidos y a su tamaño, el cual se describe a continuación: un ciclo de desnaturalización inicial (94 °C, 3 min), 30 ciclos

de desnaturalización (98 °C, 10 s) y alineamiento (60 °C, 30 s), finalizando con un ciclo de extensión (72 °C, 1 min).

El producto de amplificación fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 0.8 % (p/v). Posteriormente se realizó la purificación del producto de PCR con el uso del sistema de purificación de DNA en gel de agarosa QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las indicaciones sugeridas por el proveedor.

5.2.4 Clonación del ORF de *StTCTP* en el vector pCR8/GW/TOPO

El ORF de *StTCTP* amplificado mediante PCR fue clonado en el vector de clonación de recombinación Gateway™ pCR8/GW/TOPO (Invitrogen, Thermo Fisher), con el antibiótico espectinomicina como marcador de selección. El procedimiento se llevó a cabo según las especificaciones del manual de usuario, el cual se describe a continuación: la reacción de clonación fue constituida por 4 µl del producto de PCR, 1 µl de solución salina y 1 µl del vector pCR8/GW/TOPO, posteriormente, se mezcló gentilmente y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Al finalizar, se llevó a cabo la transformación en bacterias competentes *Escherichia coli DH5α* mediante choque térmico.

5.2.5 Transformación de las bacterias

a) Obtención de células competentes *E. coli DH5α*

Las bacterias competentes *E. coli DH5α*, se obtuvieron de la siguiente manera: una colonia de *E. coli DH5α* fue sembrada en 50 ml de medio SOB (Tryptona al 2% (p/v),

extracto de levadura al 0.5 % (p/v), NaCl 8.56 mM y KCl 2.5 mM), se incubó hasta obtener una OD entre 0.4 y 0.6. El cultivo fue centrifugado a una temperatura de 4 °C, con una velocidad de 4000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 8 ml de buffer FSB (Acetato de potasio pH 7.5 10 mM, MnCl₂ 45 mM, CaCl₂ 10 mM, KCl 100 mM, hexaaminocobalto 3 mM y glicerol al 10 %), posteriormente fueron añadidos 70 µl de DMSO y se realizó una incubación a 4 °C por 5 min; finalmente, el producto fue dispensado en tubos Eppendorf de 1.5 ml y almacenado a -80 °C.

b) Transformación con el plásmido

El proceso de transformación se inició agregando 10 µl de la mezcla de ligación a 100 µl del cultivo de *E. coli* DH5α competente, la mezcla fue incubada a 4 °C por 30 min. En seguida, se generó un choque térmico sometiendo la muestra a 42 °C por 90 s, inmediatamente se incubó a 4 °C por 2 min. Posteriormente, se colocaron 925 µl de medio SOC (medio SOB suplementado con MgCl₂ 10 mM y glucosa 20 mM) al vial que contiene el producto del choque térmico y incubó a 37 °C con una agitación de 37 rpm por 1 h. El cultivo ya descrito se sembró en medio sólido LB suplementado con kanamicina (100 µg/ml), el cual fue incubado a 37 °C por 18 h. Las colonias obtenidas del crecimiento fueron sembradas en una caja muestra y cada una de las clonas se etiquetaron para su análisis posterior.

5.2.6 Selección de clona por ensayo de PCR en colonia

Para seleccionar las clonas candidatas que contenían el inserto de interés se realizó una PCR en colonia. En ésta se emplearon los oligonucleótidos diseñados para

amplificar el ORF de *StTCTP*. Como control positivo se usó DNA genómico, el control negativo consistió en la misma mezcla de reacción sin DNA molde. La visualización de los amplicones fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v). Las clonas que fueron positivas mediante esta reacción fueron seleccionadas para los siguientes pasos metodológicos.

5.2.7 Purificación del DNA plasmídico recombinante de las clonas de interés

El método de purificación empleado, fue el de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001) que se describe a continuación:

Una colonia proveniente de las clonas positivas mediante los ensayos de PCR en colonia, fue sembrada en medio LB líquido con el antibiótico de selección kanamicina (100 µg/ml) e incubada a 37 °C toda la noche, posteriormente, el cultivo fue centrifugado a 13,000 rpm por 1 min, removiendo el sobrenadante para obtener el precipitado bacteriano, éste fue resuspendido en 100 µl de solución Alcalina I (glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM; EDTA 10 mM, pH 8.0) previamente fría y se mezcló vigorosamente. La muestra fue incubada en hielo y se agregaron 150 µl de solución Alcalina II (NaOH 0.2 N, SDS 1 %) fría, se realizó una agitación gentil por inversión. La mezcla fue mantenida en hielo (4 °C) y centrifugada a 13, 000 rpm por 5 min. Posteriormente, el sobrenadante fue transferido a un tubo Eppendorf de 1.5 µl, al cual se le añadió un volumen de fenol:cloroformo en una proporción 1:1 (v/v), la muestra fue mezclada vigorosamente y centrifugada a 4 °C, con una velocidad de 13,000 rpm por 2 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo para precipitar el DNA con 2

volúmenes de etanol absoluto y se incubó a 4 °C por 30 min, posteriormente el sobrenadante fue removido por decantación y, el precipitado fue incubado a 50 °C por 1 min, en seguida éste fue resuspendido en 30 µl de agua libre de DNAsas y almacenado a -20 °C. La concentración de DNA fue analizada en un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific).

5.2.8 Análisis de la orientación del inserto ORF-*StTCTP*

El DNA plasmídico de las colonias positivas mediante el protocolo de PCR en colonia, fue sometido a doble restricción enzimática para determinar la orientación del inserto. Los sitios de restricción presentes en el vector de expresión eucariota y ausentes en la secuencia de *StTCTP*, fueron analizados con el fin de definir a las endonucleasas candidatas para llevar a cabo la doble restricción, las cuales fueron *DraI* y *HindIII* (New England Biolabs, Beverly, MA, EE.UU.), la reacción se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del proveedor.

Para detectar los fragmentos resultantes del ensayo de doble restricción con endonucleasas, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8-1.2 % (p/v) a 100 V por 30 minutos, dependiendo del tamaño esperado del fragmento de interés. Como marcador de peso molecular, se empleó Lambda DNA/Pst I.

5.2.9 Subclonación en el vector binario de expresión en plantas

Después de determinar la orientación 5'-3' del ORF de *StTCTP* en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO, se llevó a cabo una reacción de restricción con la endonucleasa *EcoRV* para linearizar el vector de entrada que fue analizado mediante electroforesis

en geles de agarosa. La banda correspondiente al vector, fue purificada como se menciona en los apartados anteriores.

5.2.10 Recombinación específica de sitio Gateway LR Clonase II

Después de obtener el vector de entrada que contiene al ORF de *StTCTP* en sentido 5'-3', linealizado y purificado, se sometió a una reacción con la enzima Gateway™ LR Clonase™ (Invitrogen, Thermo Fisher) para la subclonación del inserto de interés en el vector binario pB7FWG.2 con el fin de obtener un vector recombinante que contiene al ORF *StTCTP* fusionado a *GFP* bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) el cual, a partir de este punto, será denominado como *StTCTP::GFP*. Esta tecnología está basada en la transferencia de fragmentos de DNA entre vectores mediante el uso de enzimas de recombinación del bacteriófago lambda. La reacción consistió en 1 µl del vector de entrada con el fragmento de interés (500 ng/µl), 3 µl del vector binario pB7FWG.2 y 1 µl de LR clonase™ enzyme mix, la cual fue incubada toda la noche a 22-25 °C. El producto total de la subclonación, fue empleado para transformar células *E. coli* como se describió en los apartados anteriores. Las colonias resultantes fueron cultivadas en 5 ml de medio LB a 37 °C con una agitación constante de 180 rpm por 10 h, también fueron sembradas en medio LB sólido en una caja muestra a 37 °C por 10 h, el DNA plasmídico (pDNA) fue purificado mediante la técnica de lisis alcalina, mientras que la presencia del vector *StTCTP::GFP* en las clonas, fue comprobada mediante PCR punto final con los oligonucleótidos específicos para *StTCTP*.

5.2.11 Transformación en *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación

El pDNA de las clonas que contienen al vector *StTCTP::GFP* fue empleado para transformar *A. rhizogenes* (cepa K599); como control negativo, se usó el vector *GFP::GUS*, el cual fue diseñado por el M. C. Leandro Alberto Núñez Muñoz, que consiste en el promotor e35S del vector pBUN4U6SM introducido en el vector binario pBGWFS7 por medio de la tecnología Gateway LR Clonase.

El proceso de transformación por electroporación, se llevó a cabo de la siguiente manera: se emplearon celdas o cubetas para electroporación de 1 mm (Bio-Rad; Hercules, CA, EE.UU.) que fueron incubadas a 4 °C por 15 min; en seguida, se colocaron 2 µl del pDNA purificado (de *StTCTP::GFP* o *GFP::GUS*) a 50 µl de bacterias competentes *A. rhizogenes* (cepa K599); esta mezcla fue homogenizada por medio de la micropipeta. Posteriormente, la celda fue introducida en el electroporador y se generó un choque eléctrico de 1800 V. Una vez ocurrida la descarga, se agregaron 300 µl de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y glucosa 20 mM), la mezcla fue colocada en un tubo Eppendorf de 1.5 ml e incubada a 28 °C con una agitación de 200 rpm por 2 h. Posteriormente, 100 µl de bacterias transformadas fueron cultivadas en medio LB sólido (triptona 10 g/L, extracto de levadura 10g/L g, NaCl 5g/L) suplementado con espectinomicina (100 mg/ml), en seguida, fueron incubadas a 28 °C por tres días hasta la formación de colonias. Después del periodo de incubación, las colonias obtenidas fueron cultivadas en medio LB líquido con los antibióticos ya mencionados con la

finalidad de purificar el DNA plasmídico para analizar la presencia del inserto por medio de PCR punto final con los oligonucleótidos específicos del ORF de *StTCTP*.

5.3 Transformación transitoria de *S. tuberosum* con *A. rhizogenes* K599

A. rhizogenes K599 transformada con el vector de interés, fue sembrada en medio YEB (1 g/L extracto de levadura 1 g/l, peptona, sacarosa 5 g/L y $MgCl_2$ 0.5 g/L) con los antibióticos de selección mencionados, este cultivo fue incubado a 28 °C con una agitación constante de 200 rpm por 2 días. Posteriormente, el cultivo fue colocado en tubos Falcon de 30 ml y centrifugado a 4 °C a una velocidad de centrifugación de 5,000 rpm por 15 min, el sobrenadante fue eliminado por decantación, mientras que la pastilla fue resuspendida en el medio de infiltración ($MgCl_2 \cdot 7H_2O$ 10 mM, 10 mM MES pH 5.6 y acetosiringona 200 μ M) hasta obtener una densidad óptica a 600 nm (OD_{600})= 0.8. La suspensión de *A. rhizogenes* fue utilizada para la agroinfiltración con jeringas de insulina de 30 μ l sin cánula, colocando cuidadosamente el pivote en el envés de las hojas de la papa previamente limpiadas con agua bidestilada estéril para eliminar residuos de tierra. Una semana después de la agroinfiltración, los tejidos fueron colectados para los análisis posteriores.

5.3.1 Análisis de las plantas transformadas transitoriamente

Las plantas transformadas fueron analizadas mediante los siguientes ensayos:

- Detección de *GFP* y *GAPDH* en hojas apicales y agroinoculadas mediante RT-PCR punto final.
- Determinación de los niveles de expresión de *StTCTP*, *bar*, *GFP* y *GAPDH* por medio de RT-qPCR de las hojas agroinoculadas, hojas apicales y raíces.

- Análisis por Western blot de la proteína recombinante StTCTP fusionada a GFP en las hojas agroinoculadas y apicales.

5.3.2 Síntesis de cDNA de los tejidos de las plantas transformadas por agroinfiltración

Se purificó el RNA de las hojas agroinfiltradas, hojas apicales y raíces, con el método de cloruro de guanidinio descrito anteriormente. La síntesis del cDNA a partir del RNA extraído de los tejidos mencionados, fue realizada con el kit WarmStart® RTx Reverse Transcriptase (New England Biolabs) siguiendo las especificaciones descritas en el manual proporcionado por el proveedor, las cuales se explican concisamente a continuación: en un tubo de 50 μ estéril fueron añadidos 0.5 μ l de una mezcla de dNTPs (10 mM), 2 μ l de Isothermal Buffer 10X, 0.25 μ l de la transcriptasa reversa WarmStart® RTx, 1 μ l de RNA (100 ng/ μ l) purificado, 0.5 μ l del oligonucleótido dTGAGA (10 μ M) y 0.5 μ l del oligonucleótido SMAGGG (10 μ M), concretando la mezcla a un volumen final de 20 μ l con agua libre de nucleasas. Posteriormente, el tubo fue incubado a 25 °C por 5 min (alineamiento), 55 °C por 10 min (polimerización) y a 80 °C por 10 min (inactivación de la enzima).

5.3.3 Detección de GFP y GAPDH por RT-PCR punto final

El cDNA sintetizado a partir del RNA extraído de las hojas agroinoculadas y hojas apicales, fue usado como molde para la detección del ORF de *GFP* y un fragmento de 92 pb del ORF de *GAPDH* (control endógeno) por medio de PCR punto final, los oligonucleótidos se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos específicos para los ensayos de RT-PCR punto final

| Gen | Sentido | Secuencia (5'- 3') | Longitud del amplicón |
|------------------------------|---------|-------------------------------|-----------------------|
| <i>GAPDH</i> | Directo | GCTGTTGGAAAGGTGCTACCATCATTG | 92 |
| | Reverso | AGTGAGATCAACCACAGAGACATCGAC | |
| <i>GFP</i> (<i>ORF</i>) | Directo | TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG | 720 |
| | Reverso | TCAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTT | |

Este ensayo se llevó a cabo con el kit Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Thermo Fisher) siguiendo las recomendaciones del proveedor. La reacción se efectuó con 1.25 µl de PCR buffer (sin Mg) 10X, 0.375 µl de MgCl₂ (50 mM), 0.25 µl de mezcla de dNTPs (10 mM), 1 µl de oligonucleótido directo (10 mM), 1 µl de oligonucleótido inverso (10 mM), 2 µl de cDNA y 0.05 µl de DNA polimerasa Platinum™ Taq, el volumen total de reacción fue llevado a 12.5 µl con agua libre de nucleasas. El protocolo de amplificación fue el siguiente: un ciclo de desnaturalización inicial (94 °C, 3 min), 30 ciclos de desnaturalización (98 °C, 10s) y alineamiento (60 °C, 30 s), finalizando con un ciclo de extensión (72 °C, 1 min/Kb). Los oligonucleótidos para la detección de *GFP* y *GAPDH*, presentaron una T_m igual a 60 °C, por lo tanto, no hubo variación en la temperatura del alineamiento; mientras que el tiempo del ciclo de extensión fue ajustado a la longitud del amplicón. Finalmente, el producto de PCR punto final fue analizado por electroforesis en gel de agarosa de 0.8 % (p/v).

5.3.4 Detección de los niveles de expresión de *StTCTP* por medio de PCR tiempo real

Se efectuaron ensayos de RT-qPCR con el objetivo de determinar los niveles del transcrito de *GFP*, *StTCTP*, *bar* y *GAPDH*. Para ello, el RNA de las hojas agroinfiltradas, hojas apicales y raíces, fue diluido con agua bidestilada libre de nucleasas hasta obtener una concentración de 50 ng/μl para ejecutar las reacciones de amplificación por qPCR con el kit KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (Merck; Rahway, NJ, EE.UU.) siguiendo las especificaciones descritas en el manual proporcionado por el fabricante. Los oligonucleótidos relativos a *GFP*, *StTCTP*, *bar* y *GAPDH* tienen una $T_m = 60$ °C se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos específicos para los ensayos de RT-qPCR

| Gen | Sentido | Secuencia (5'-3') | Longitud del amplicón (pb) |
|--------------|---------|---------------------------------|----------------------------|
| <i>Bar</i> | Directo | GTGCTTGTCTCGATGTAG | 100 |
| | Reverso | GAGGGGATCTACCATGAG | |
| <i>GAPDH</i> | Directo | GCTGTTGGAAAGGTGCTACCAT CATTG | 92 |
| | Reverso | AGTGAGATCAACCACAGAGACA TCGAC | |
| <i>GFP</i> | Directo | ACTACAACAGCCACAACGTC | 81 |

| | | | |
|---------------|---------|----------------------|-----|
| | Reverso | TGTTGTGGCGGATCTTGAAG | |
| <i>StTCTP</i> | Directo | TGCTTTGGGAAGTTCAAGGG | 123 |
| | Reverso | ACAACCTTGACAGCTTGGTC | |

La mezcla de la reacción consistió en 3.2 µl de agua libre de nucleasas, 5 µl de KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X), 0.2 µl de Oligonucleótido 5' (10 µM), 0.2 µl de Oligonucleótido 3' (10 µM), 0.2 µl de ROX High (50X), 0.2 µl de KAPA RT Mix (50X), 1 µl de RNA (25 ng/µl), con un volumen final de 10 µl. Este ensayo fue efectuado en el equipo StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: síntesis de cDNA (5 min, 42 °C), inactivación de la RT (5 min, 95 °C), 40 ciclos de desnaturalización (15 s, 95 °C) y alineamiento/extensión (1 min, 60 °C), añadiendo un paso de finalización para evitar productos de amplificación adicionales (15 s, 95 °C). Por cada muestra, se realizaron tres réplicas técnicas para cada uno de los tejidos analizados. El método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ fue usado para calcular la acumulación relativa del transcrito usando la información de *GAPDH* para normalizar la acumulación de los transcritos.

5.3.5 Detección de StTCTP por western blot

Para la extracción de las proteínas totales, se recolectó tejido vegetal de las plantas transformadas. Posteriormente, se les añadieron 15 µl de buffer de proteínas, logrando así la obtención de un extracto de proteínas totales desnaturalizadas. Este proceso se llevó a cabo mediante la exposición de los tejidos a una temperatura de 96 °C en un bloque térmico durante 10 minutos. Posteriormente, las proteínas fueron separadas electroforéticamente en una cámara Bio Rad (Mini PROTEAN Tetra System) por SDS-

PAGE al 15 % (Acrilamida-Bisacrilamida 30 %- 0.8 %, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % SDS, 0.05 % persulfato de amonio y TEMED) con buffer de corrida Tris-Glicina-SDS (25 mM, 190 mM, SDS 0.05 %). A continuación, se realizó la transferencia húmeda a una membrana de PDVF de 0.45 nm (Perkin Elmer) en cámara Bio-Rad. La membrana se bloqueó con una solución al 5 % de leche descremada en TBS (Tris 10 mM pH 7.5, NaCl 100 mM) suplementado con 1 % de Tween-20 por una hora en agitación constante y a temperatura ambiente. Después, se llevó a cabo una incubación 4 °C por 18 h con una agitación constante utilizando el anticuerpo primario correspondiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados durante 10 minutos cada uno con TBS-Tween, seguido de una incubación a temperatura ambiente y con agitación durante 1.5 h con el anticuerpo secundario. Después de otros tres lavados con TBS 1X, la membrana fue revelada mediante quimioluminiscencia (Super Signal West Pico/Femto Chemiluminiscent Substrate de Thermo Scientific; ChemiDoc MP Imaging System).

Las proteínas totales se extrajeron según el método realizado de la siguiente manera: Después de dos semanas de la agroinfiltración, se colectó 1 mg de las hojas agroinoculadas y apicales, las cuales fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 3 %, posteriormente fueron enjuagadas con agua esterilizada y, finalmente, fueron molidas en nitrógeno líquido. A este material vegetal se le añadieron 0.5 ml de la solución de extracción de proteínas (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, glicerol al 10 %, NaCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 5 mM, DTT 5 mM, β-mercaptoetanol 40 mM y PMSF 2 mM). La solución se homogeneizó y centrifugó a 13,000 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos, al finalizar, el sobrenadante fue colectado. La concentración de las proteínas se determinó con el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c.

Posteriormente, se realizó un ensayo de Western blot con las proteínas totales en un gel SDS-PAGE al 10 %, después, se efectuó la transferencia en membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Whatman), proceso que tuvo una duración a 30 V por 12 h. Después del paso de transferencia, las membranas fueron incubadas durante 2 h a 37 °C en la solución de bloqueo (TBS 1X, leche desnatada 5 % (p/v) y de Tween-20 0.1 % (v/v)), al finalizar este tiempo, las membranas fueron lavadas diez veces durante cinco minutos con la solución de lavado (TBS 1X y Tween-20 0.1 % (v/v)). En seguida las membranas fueron incubadas a 4 °C durante 16 h con antisuero policlonal dirigido contra CmTCTP (dilución 1:500 en TBS 1X, leche descremada 5 % (p/v) y Tween-20 1 % (v/v)). Después, las membranas fueron lavadas con el buffer de lavado diez veces durante cinco minutos, posteriormente, fueron incubadas con el anticuerpo IgG anti-conejo sintetizado en cabra conjugado con peroxidasa (Zymax CA) (dilución 1:5000 en TBS 1X y leche descremada 5 % (p/v)) a 37 °C por 2 h. Después de la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas fueron lavadas 10 veces por 5 minutos con el buffer de lavado. La señal de las bandas correspondientes a StTCTP nativa y StTCTP fusionada a GFP, fue detectada en placas fotográficas, colocando las membranas previamente sumergidas en las soluciones del kit HRP color development (Bio Rad) en contacto directo con dichas placas.

5.4 Ensayo de inducción de brotes

Los tubérculos de las plantas agroinfiltradas con los vectores *StTCTP::GFP* y *GFP::GUS*, fueron colectados e incubados por dos meses en condiciones de oscuridad. Posteriormente, se analizaron algunas características fenotípicas como el número de brotes, longitud y tamaño de los brotes. Por otro lado, también fueron

registrados el peso y tamaño, así como el número de tubérculos por planta. Las mediciones fueron realizadas con el programa IC Measure (<https://www.theimagingsource.com>).

5.5 Predicción de las estructuras 3D

5.5.1 Predicción de las estructuras 3D de los mRNA

Se realizó la predicción de las estructuras 3D de los mRNA de *StTCTP*, *AtTCTP1*, *AtTCTP2*, *CmTCTP*, y *StBEL5*, para ello, las secuencias de los transcritos fueron buscadas en las bases de datos de Phytozome (phytozome-next.jgi.doe.gov/) y NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Después de haber obtenido las secuencias, éstas fueron analizadas en el servidor RNAFold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RFold.cgi>) seleccionando el análisis de energía libre mínima (MFE, por sus siglas en inglés) y el algoritmo de función de partición para obtener la estructura secundaria en formato Vienna (Hofacker, 2003; Zhang, *et al.*, 2022).

La estructura terciaria hipotética de los mRNAs fue desarrollada en el programa en línea 3dRNA (<http://biophy.hust.edu.cn/3dRNA>), para ello, la secuencia de la estructura primaria y secundaria en formato Vienna de cada mRNA, fue ingresada al servidor eligiendo la opción de diseño de 5 predicciones 3D optimizadas (Zhang *et al.*, 2022; Zhang, Xiong, *et al.*, 2022). Para determinar la estructura terciaria a emplear en el docking proteína-RNA, se calcularon los siguientes parámetros: criterios de ácido nucleico, geometría, intercambios de lateralidad quiral y valores atípicos de geometría tetraédrica con el programa MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) (Williams *et al.*, 2018). Además, para mejorar los criterios de selección de los modelos de mRNA

generados, se calcularon los ángulos de torsión virtuales mediante gráficos de pseudotorsión para RNA (análogos a los gráficos de Ramachandran para proteínas) con el servidor EMDDataResource Pseudotorsion Plot Beta (<https://ptp.emdataresource.org/index.html>) (Wadley *et al.*, 2007).

5.5.2 Predicción de las estructuras 3D de las proteínas

Las secuencias de las proteínas StPTB1 y StPTB6 fueron adquiridas de la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Luego, estas secuencias fueron introducidas en el servidor AlphaFold Colab Notebook (AlphaFold.ipynb), que es un programa basado en algoritmos de inteligencia artificial para predecir estructuras 3D de proteínas a partir de su secuencia primaria mediante el empleo de arquitecturas de redes neuronales y procedimientos de entrenamiento basados en las limitaciones evolutivas, físicas y geométricas de las proteínas (Jumper *et al.*, 2021; Jumper y Hassabis, 2022). Las predicciones 3D hipotéticas de las proteínas, fueron refinadas en el servidor en línea DeepRefiner (<http://watson.cse.eng.auburn.edu/DeepRefiner/index.php>) que incorpora algoritmos basados en aprendizaje profundo para generar nuevos modelos (Shuvo *et al.*, 2021), los cuales fueron analizados con el programa MolProbity para proteínas con el fin de determinar los valores de las siguientes variables: plegamientos erróneos de las moléculas de azúcar, conformaciones erróneas de las cadenas de carbonos, enlaces y ángulos erróneos, intercambio de la lateralidad quiral y valores atípicos de la geometría tetraédrica. Asimismo, las conformaciones 3D hipotéticas obtenidas del refinamiento fueron analizadas con el programa Saves v60 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>), que es un servidor de validación basado en una red

algorítmica de programas comúnmente utilizados en la validación de la estructura terciaria de proteínas (ERRAT, Verify 3D, PROCHECK y Ramachandran) (Lüthy *et al.*, 1992; Colovos y Yeates, 1993; Laskowski *et al.*, 1993). De esta manera, se analizaron las puntuaciones otorgadas por los programas, lo cual permitió determinar los modelos hipotéticos con mayor estabilidad energética, geométrica, plegamiento, entre otros.

5.5.3 Docking molecular proteína-RNA

El acoplamiento molecular o docking entre proteína-ARN, fue calculado en el programa HDOCK (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>), basado en un algoritmo híbrido de modelado fundamentado en plantillas de acoplamiento libre *ab initio* (Yan *et al.*, 2017, 2020). Para ello, se introdujo la información digital en formato PDB correspondiente a las proteínas PTB1 y PTB6, así como el archivo PDB del mRNA de *StTCTP*, *CmTCTP*, *AtTCTP1*, *AtTCTP2* y *BEL5*. Este programa otorga los valores de las puntuaciones del acoplamiento molecular y confianza, así como la desviación cuadrática media del ligando (RMSD, por sus siglas en inglés). Los modelos que presentaron la puntuación más alta fueron analizados y visualizados en UCSF Chimera 1.16 y UCSF ChimeraX 1.5 (Pettersen *et al.*, 2004, 2021).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existe evidencia que *AtTCTP2* es un gen funcional y cuya proteína y mRNA pueden ser transportados a larga distancia evidenciado por ensayos de unión entre injertos, además de promover la regeneración y el aumento de la biomasa en el tabaco, al igual que *CmTCTP* (Hinojosa-Moya *et al.*, 2008; Toscano-Morales *et al.*, 2014). Dada la similitud estructural predicha entre *StTCTP* y *AtTCTP2* y *CmTCTP*, en este proyecto planteamos la hipótesis de que el gen *StTCTP* puede desempeñar un papel en la regeneración y, por tanto, en la reproducción vegetativa de papa, cultivo que es propagado por la vía sexual y asexual. Para ello, se propuso realizar ensayos de transformación transitoria de plantas de papa con un vector de sobreexpresión de *StTCTP* fusionada a *GFP* bajo el control del promotor 35S. Con este fin, se colectaron diferentes tejidos de las plantas agroinfectadas, las cuales fueron estudiadas mediante técnicas de RT-PCR punto final, RT-qPCR y Western blot, así como el análisis del fenotipo resultante de la estructura aérea y subterránea de las plantas agroinoculadas.

6.1 Amplificación por PCR punto final del gen que codifica a *StTCTP*

Con el propósito de estudiar el rol de *StTCTP* en la diferenciación y su movimiento a larga distancia, se realizó la clonación del ORF de este gen en un vector binario de expresión en plantas bajo el control del promotor 35S.

En una primera etapa, se purificó el RNA total de papa y, a partir de este, se realizó una reacción de transcripción inversa para generar el cDNA correspondiente. Posteriormente, se llevó a cabo una PCR punto final utilizando oligonucleótidos diseñados en base a la secuencia del ORF de *StTCTP* (accesible bajo el código

PGSC0003DMT400063575), que fue investigada en Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) (Figura 3).

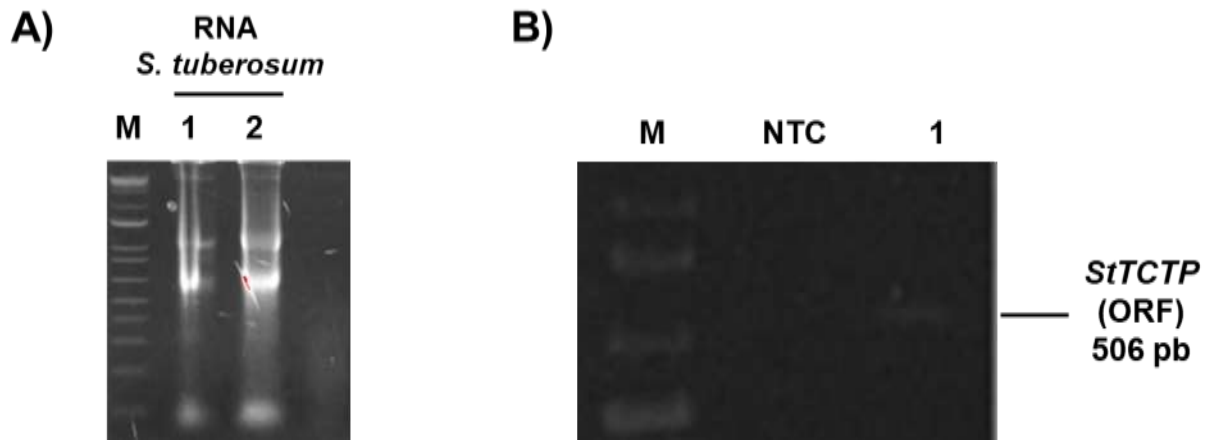


Figura 3. Amplificación del gen que codifica al ORF de *StTCTP* mediante PCR. A) Carril 1 y 2, electroforesis en gel de agarosa del RNA total de *S. tuberosum*. **B)** Perfil electroforético que muestra la amplificación del gen que codifica al ORF de *StTCTP* sin codón de paro, mediante RT-qPCR punto final. El tamaño del producto de la amplificación de este ORF, fue de 506 pb. El carril 1, contiene la reacción de PCR sin cDNA. M, corresponde al marcador de tamaño molecular (1 kb Plus, Invitrogen, Waltham, MA, EE.UU.).

6.1.1 Clonación del gen que codifica a *StTCTP* en el vector pCR8/GW/TOPO

El producto de amplificación fue clonado en el vector pCR8/GW/TOPO, dicha reacción de clonación fue usada para transformar bacterias *E. coli* DH5 α , a las cuales se les extrajo DNA plasmídico que, posteriormente, fue empleado como templado para

realizar las reacciones de PCR punto final y doble restricción con el objetivo de detectar el inserto y la orientación del mismo. La doble restricción se llevó a cabo utilizando las enzimas *DraI* y *HindIII*. Esto se hizo con la expectativa de obtener dos amplicones, uno de 298 pb y otro de 3007 pb, lo que confirma la orientación 5'-3' del inserto para su posterior subclonación en el vector de expresión en plantas (Figura 4), el vector fue analizado por secuenciación.

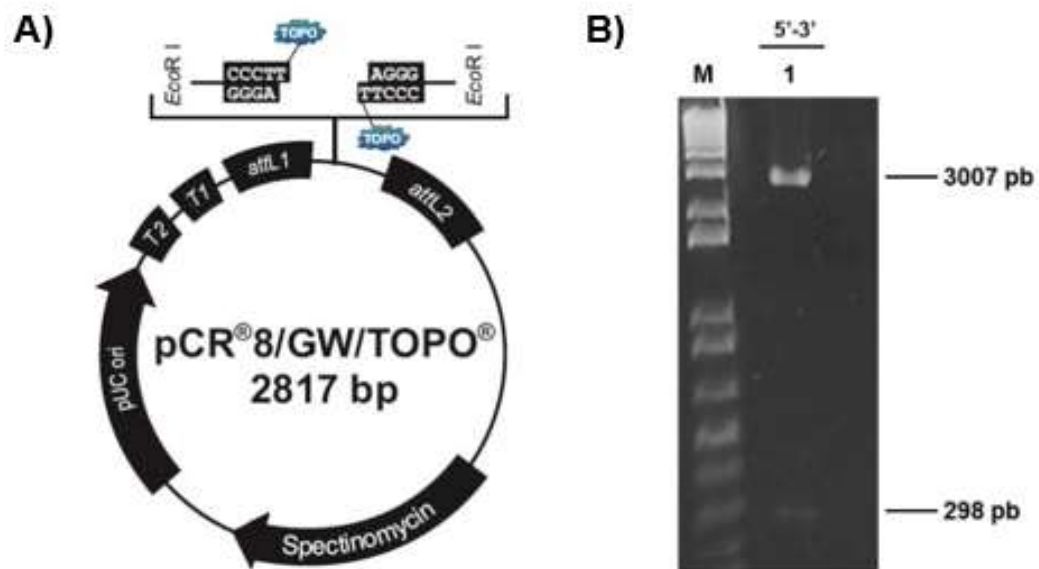


Figura 4. Representación del vector de entrada pCR®8/GW/TOPO® y doble restricción del vector pCR8/GW/TOPO-ORFStTCTP. En **A)** se muestra el vector de entrada en el cual fue clonado el gen que codifica al ORF de *StTCTP* sin codón de paro. En **B)** se expone la electroforesis en gel de agarosa de la doble restricción (endonucleasas *DraI* y *HindIII*) del vector de entrada pCR8/GW/TOPO que alberga el ORF de *StTCTP*. En el carril 1 se señalan los amplicones de 298 pb y 3007 pb que

demuestran la clonación del inserto del ORF de *StTCTP* en la orientación 5'-3'. M: marcador de tamaño molecular (1 kb Plus).

6.1.2 Subclonación del gen que codifica a *StTCTP* en los vectores de expresión en plantas pB7FWG.2 y pB7G2D.1

Para lograr la sobreexpresión de *StTCTP*, el ORF correspondiente fue subclonado en el vector pB7FWG.2. En este proceso, se llevó a cabo una restricción utilizando la enzima *EcoRV* para linearizar el vector de entrada, que ya contenía la secuencia que codifica a *StTCTP* en la orientación 5'-3'. Luego, se realizó la subclonación en el vector pB7FWG.2 mediante la técnica Gateway LR Clonasa mientras que, la presencia del inserto, se confirmó a través de una PCR punto final (Figura 5).

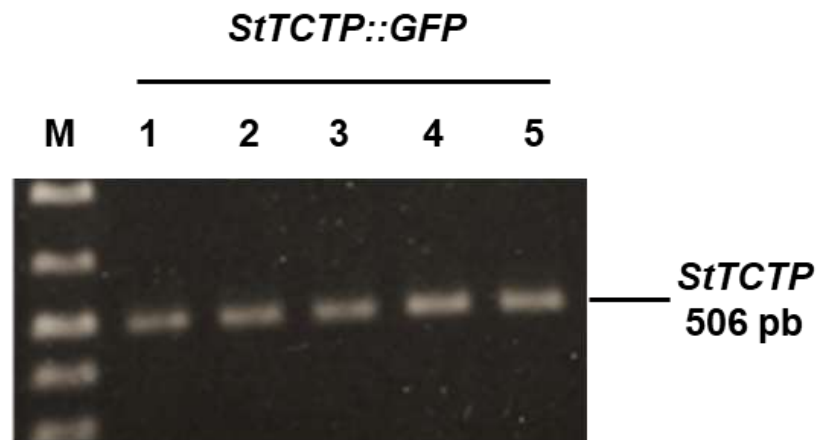


Figura 5. Clonación del ORF de *StTCTP* en el vector de expresión binario en plantas pB7FWG.2. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v) que demuestra la amplificación del ORF de *StTCTP* en el vector pB7FWG.2 (carriles 1-5), con un producto de amplificación de 506 pb. M: marcador de tamaño molecular (1 kb Plus).

6.2 Transformación transitoria de papa mediada por *A. rhizogenes* K599 transformada con los vectores *StTCTP::GFP* y *GFP::GUS*

Una vez obtenido el vector de sobreexpresión que incorpora el ORF de *StTCTP* fusionado con *GFP* y controlado por el promotor 35S, se procedió a realizar la transformación de *A. rhizogenes* K599 con los vectores *StTCTP::GFP* y *GFP::GUS*, de manera independiente. Las cepas bacterianas recombinantes se utilizaron para la transformación transitoria de 30 plantas de papa por cada vector, estas plantas tenían una edad de 3 semanas. La técnica empleada para la transformación transitoria fue la agroinfiltración, realizada en tres hojas distales al meristemo apical y raíces (Figura 6).

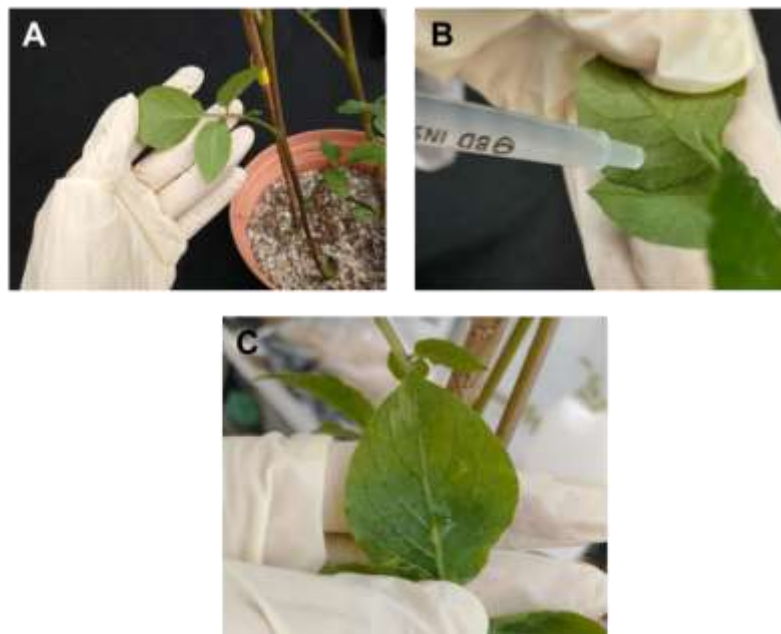


Figura 6. Agroinfiltración de las hojas de papa con *A. rhizogenes* K599. La transformación transitoria con los vectores *StTCTP::GFP* y *GFP::GUS*, fue llevada a cabo con la bacteria *A. rhizogenes* K599 mediante la técnica de agroinfiltración. **A y B)** Se eligieron tres hojas distales al meristemo apical y radicular, las cuales fueron

agroinfiltradas por medio de agujas de insulina sin bisel en el envés de las hojas. **C)** El cultivo fue inyectado cuidadosamente, hasta la infiltración completa de la hoja. Posteriormente, las plantas agroinoculadas fueron incubadas dos semanas en condiciones de invernadero, después de ese tiempo, las hojas del ápice, raíces y hojas agroinfiltradas, fueron colectadas para realizar la purificación de las biomoléculas.

6.2.1 Análisis por RT-PCR punto final

Después de dos semanas desde la agroinfiltración, se recolectaron hojas agroinoculadas, hojas del meristemo apical y raíces con el fin de extraer RNAs totales, sintetizar cDNA y llevar a cabo los ensayos descritos en la sección de materiales y métodos.

Utilizando ensayos de PCR punto final, se logró detectar el amplicón de *GFP* en las hojas agroinfiltradas con los vectores *StTCTP::GFP* y *GUS::GFP*, confirmando así el éxito del proceso de agroinfiltración (Figura 7). Además, se confirmó la presencia de *GFP* en 24 hojas sistémicas de las plantas agroinfiltradas con el vector *StTCTP::GFP*, mientras que no se observó ninguna señal relacionada con *GFP* en las hojas apicales de las plantas agroinfiltradas con el vector *GFP::GUS*. Estos resultados nos indican que el mRNA de *StTCTP* podría ser transportado a largas distancias como se ha observado en estudios previos en los cuales se encontró evidencia de transcritos y proteína de TCTP en plantas como calabaza, *Arabidopsis* y tabaco (Hinojosa-Moya *et al.*, 2013; Toscano-Morales *et al.*, 2014, 2015; Thieme *et al.*, 2015).

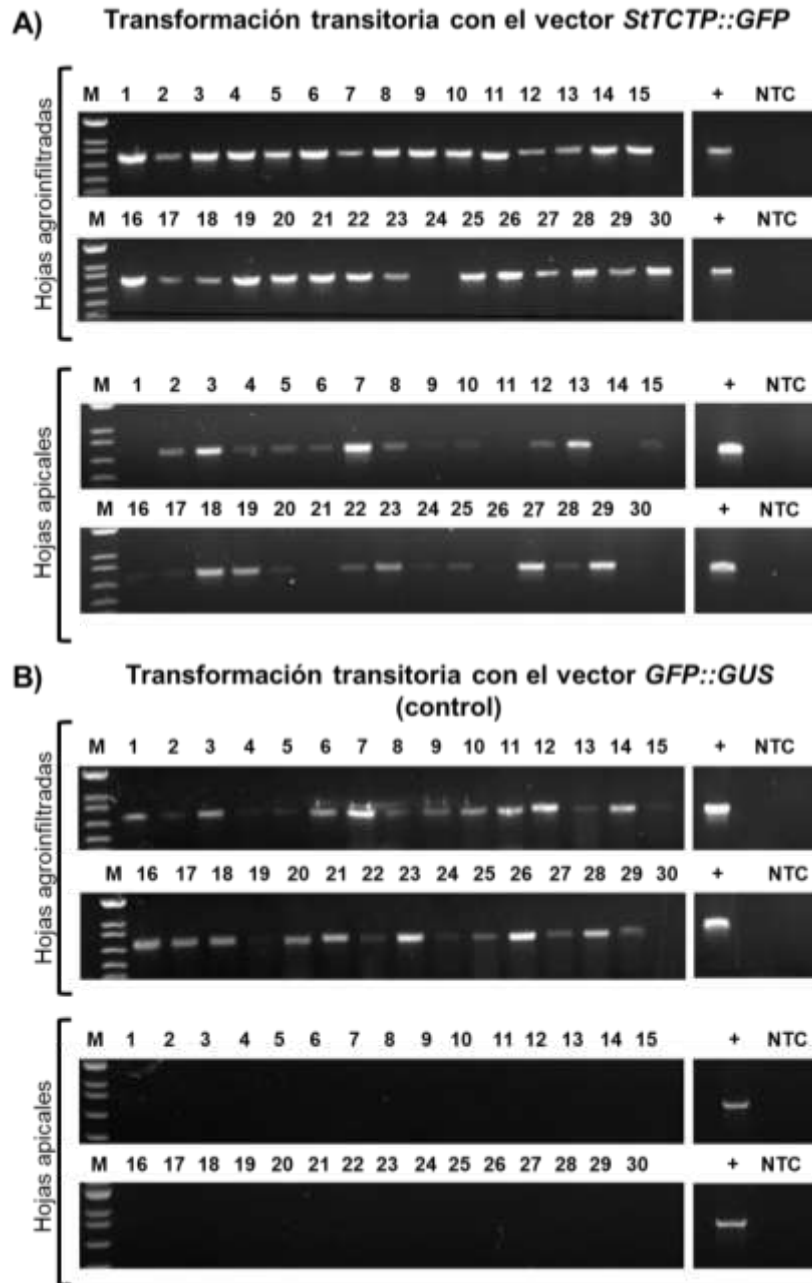


Figura 7. Detección de GFP mediante RT-PCR punto final del cDNA sintetizado a partir de los RNA totales purificados de las hojas agroinfiltradas y sistémicas.

Perfil electroforético de **A)** Hojas apicales y hojas agroinfiltradas con vector *StTCTP::GFP*. **B)** Hojas apicales y hojas agroinfiltradas con vector *GFP::GUS*. El

amplicón correspondiente a GFP es de 720 pb. M: marcador de tamaño molecular (1 kb Plus). +: control positivo. NTC: control sin molde de DNA.

Para verificar la correcta extracción de los ácidos nucleicos, así como de las reacciones de síntesis de cDNA y PCR, se amplificó el gen endógeno *GAPDH*, cuyo amplicón se encontró presente en todas las muestras analizadas (Figura 8).

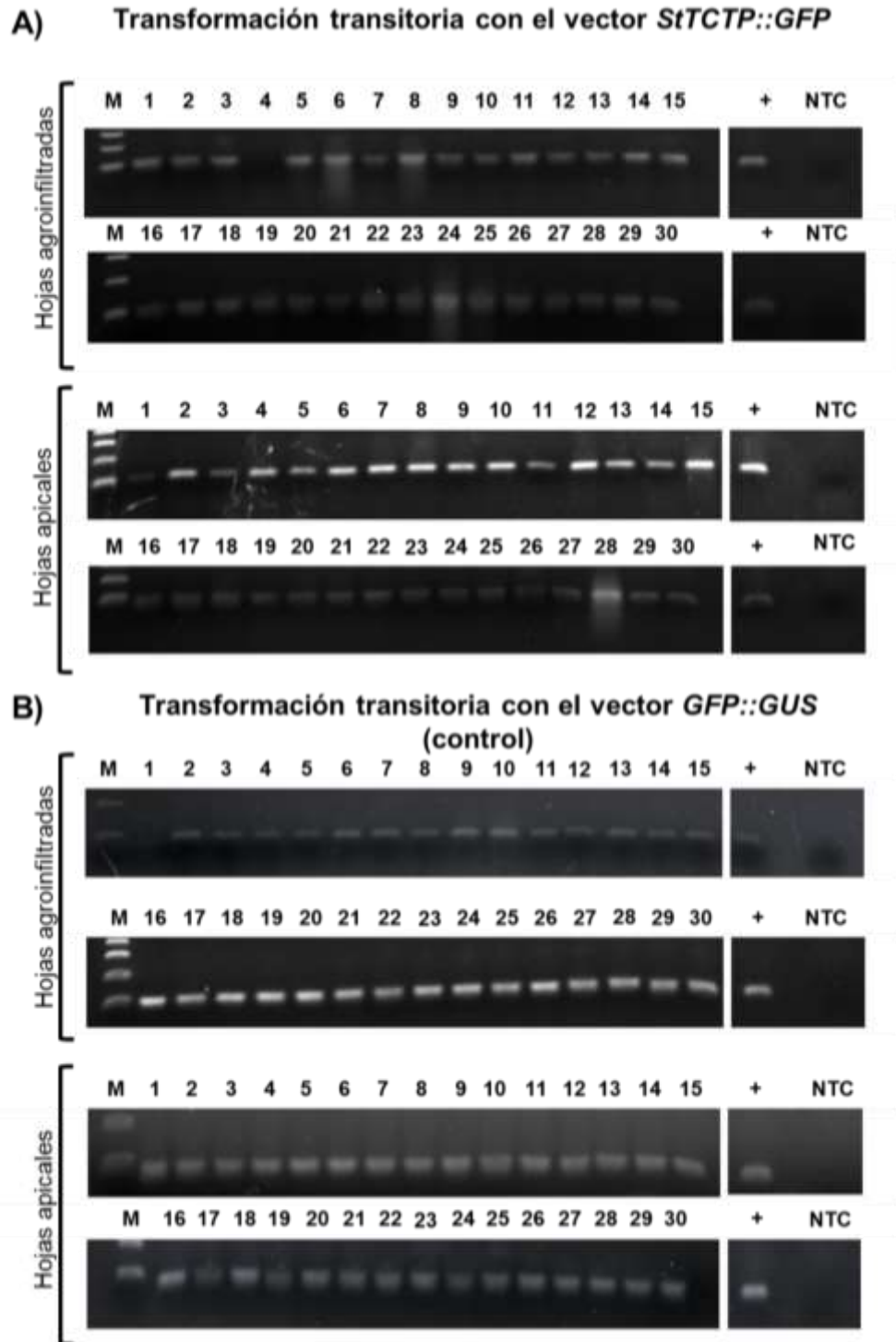


Figura 8. Detección de *GAPDH* mediante RT-PCR de punto final del cDNA sintetizado a partir de los RNA totales purificados de las hojas agroinfiltradas y

sistémicas. Perfil electroforético de **A)** Hojas apicales y hojas agroinfiltradas con vector *StTCTP::GFP*. **B)** Hojas apicales y hojas agroinfiltradas con vector *GFP::GUS*. El amplicón correspondiente a *GAPDH* es de 92 pb. M: marcador de tamaño molecular (1 kb Plus). +: control positivo. NTC: control sin molde de DNA.

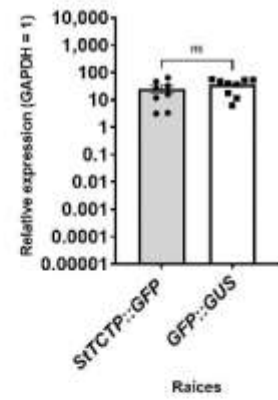
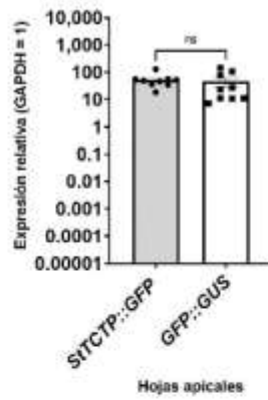
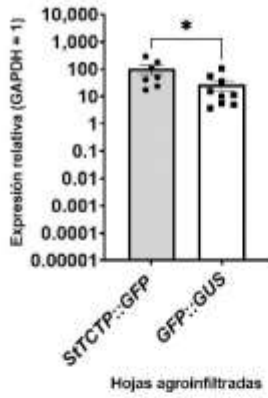
6.2.2 Análisis por RT-qPCR

Los resultados obtenidos a través de la RT-PCR punto final sugieren la posibilidad de que el mRNA de *StTCTP* sea transportado a larga distancia. Esta hipótesis fue confirmada mediante ensayos de RT-qPCR. Para ello se seleccionaron nueve plantas transformadas transitoriamente con los vectores *StTCTP::GFP* y *GFP::GUS* en las que se obtuvo evidencia de la amplificación de *GFP* y *GAPDH* en las hojas apicales y agroinfiltradas. De esta manera, se demostró la presencia del transcrito de *StTCTP* en todos los tejidos analizados (hojas agroinfiltradas, hojas apicales y raíces). Para verificar si el transcrito recombinante de *StTCTP* tiene la capacidad de desplazarse a largas distancias, se realizó una RT-qPCR utilizando oligonucleótidos específicos para un fragmento de *GFP*. Los resultados mostraron que el transcrito de *GFP*, presente en las plantas agroinfiltradas con el vector *StTCTP::GFP* fue detectado tanto en las hojas apicales como en las raíces. En contraste, no se observó una detección significativa de *GFP* en las hojas apicales ni en las raíces de las plantas transformadas con el vector *GFP::GUS*. Los niveles de mRNA de *StTCTP::GFP* son de 1 a 2 órdenes de magnitud más bajos que los del mRNA de *StTCTP* endógeno (según lo determinado por la acumulación del mRNA de *GFP*), si bien esto es de esperarse debido al método de transformación (agroinfiltración). Como control de transporte, también se realizó

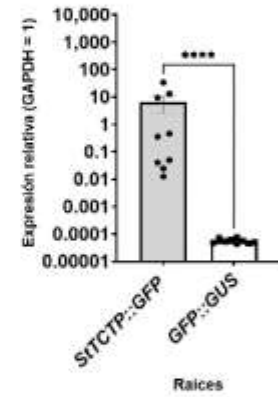
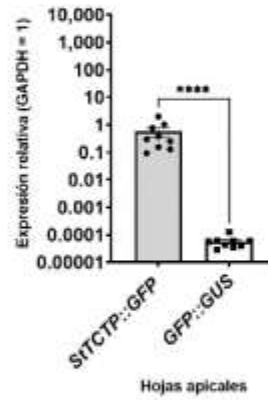
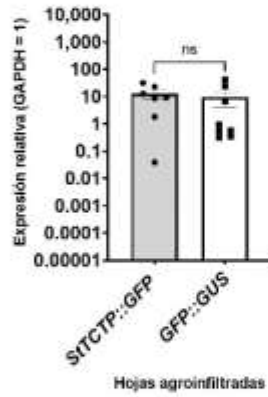
una RT-qPCR empleando los oligonucleótidos para el RNA de *bar*. De esta manera, se detectó señal significativa en las hojas de las plantas agroinfiltradas con *StTCTP::GFP* o *GFP::GUS*, pero no se detectó en las hojas apicales ni en las raíces, lo que corrobora que este transcrito no es transportado a tejidos distantes de la planta (Figura 9). Aunado a esto, existe evidencia de que el transcrito y proteínas de GUS y GFP no pueden trasladarse por sí solas a larga distancia (Notaguchi *et al.*, 2012; Toscano-Morales *et al.*, 2014). Este hallazgo respalda la hipótesis de que el mRNA de *StTCTP* se transporta a larga distancia, tal como se ha demostrado con *CmTCTP* y *AtTCTP2*, y que podría tener un papel como RNA autónomo no celular. (Hinojosa-Moya *et al.*, 2013; Toscano-Morales *et al.*, 2014). Este movimiento posiblemente es llevado a cabo a través del floema, suposición que se respalda con la evidencia de la presencia del mRNA de *CmTCTP* detectado en los exudados de savia del floema y su localización en el floema maduro (Hinojosa-Moya *et al.*, 2013).

En investigaciones anteriores, se ha documentado el desplazamiento del mRNA de *StBEL5* a través del floema, lo que contribuye a la mejora del proceso de tuberización al influir en la expresión de genes relacionados con el crecimiento. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que *StTCTP* también pueda desempeñar un papel en el proceso de la propagación vegetativa (Banerjee *et al.*, 2007).

A)



B)



C)

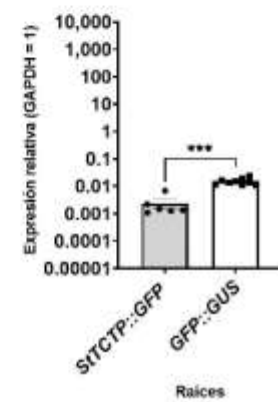
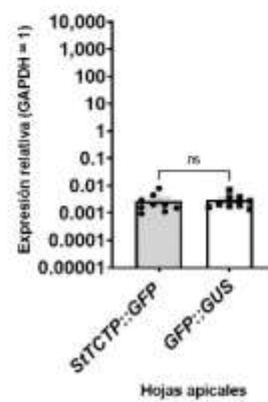
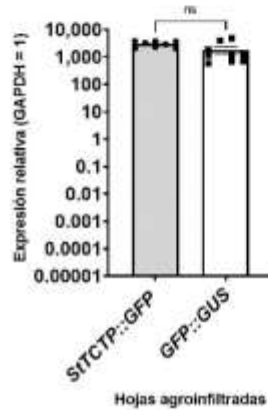


Figura 9. Niveles de acumulación relativa del mRNA de *StTCTP*, *GFP* y *bar* detectados por RT-qPCR en hojas sistémicas, hojas agroinfiltradas y raíz transformadas transitoriamente con los vectores *StTCTP::GFP* o *GFP::GUS*.

Niveles de transcripción de **A)** *StTCTP* endógeno y *StTCTP* recombinante derivado del vector *StTCTP::GFP*. **B)** *GFP* generado por los vectores *StTCTP::GFP* o *GFP::GUS* (control). **C)** Transcrito de *bar*, gen marcador de selección presente en el vector usado como control para la agroinfiltración con las construcciones *StTCTP::GFP* o *GFP::GUS*. La dispersión de los datos está representada con círculos (*StTCTP::GFP*) y cuadrados negros (*GFP::GUS*). $n = 9$ en todos los casos. La expresión relativa se calculó con $GAPDH = 1$. Las barras representan el error estándar de la media. Los asteriscos simbolizan diferencias significativas: * $P < 0,05$, *** $P < 0,005$ y **** $P < 0,0001$; no significativo (ns) (prueba de Mann-Whitney).

También se realizó la cuantificación del mRNA de *StTCTP* endógeno en el ápice, hoja, el tallo, raíz y callo para determinar los sitios de acumulación del transcrito, encontrando una mayor acumulación de mRNA de *StTCTP* en el tallo y la raíz y menor en el ápice, hoja y callo (Figura 10).

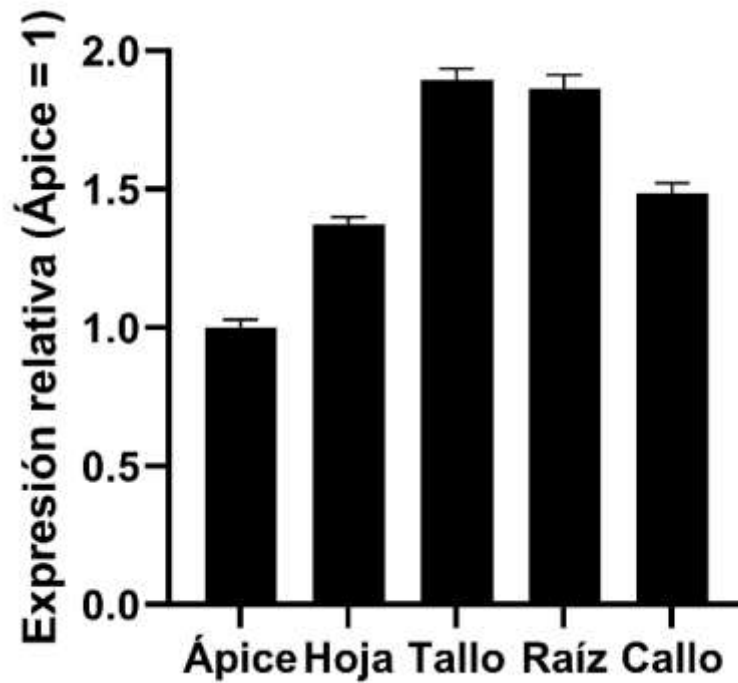


Figura 10. Niveles de expresión relativa del mRNA de StTCTP. El transcrito endógeno de *StTCTP* se detectó mediante RT-qPCR en tejido apical, hoja, tallo y raíz. Se usó *GAPDH* como control endógeno. Se muestra la media de tres muestras biológicas con tres réplicas técnica. La expresión relativa se calculó con ápice=1. Las barras de error representan la media con el error estándar de la media.

6.2.3 Detección de StTCTP por Western blot en el ápice de las plantas agroinfiltradas

En los ensayos anteriores, se detectó el transcrito recombinante de StTCTP en el ápice y raíces, lo cual sugiere su movimiento a largas distancias. Para determinar si la proteína StTCTP fusionada a GFP puede ser localizada el meristemo apical, se

realizaron ensayos de western blot de las hojas apicales correspondientes a las plantas transformadas con los vectores StTCTP::GFP y GFP::GUS, así como de plantas silvestres. Primeramente, se calculó la cantidad idónea de proteínas totales de papa para realizar los ensayos de detección de StTCTP por inmunoblot, determinando que la masa total de proteínas totales a emplear en este ensayo, es de 27 a 37 mg, ya que estas cantidades generaron una detección clara de la proteína de interés (Figura 11).

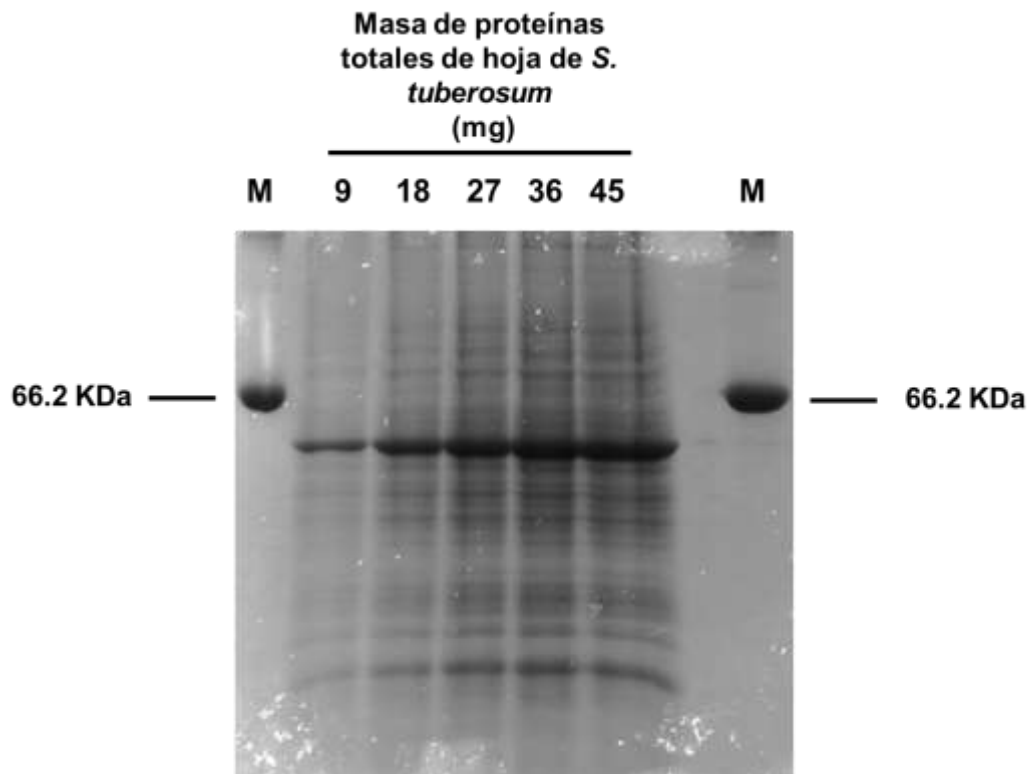
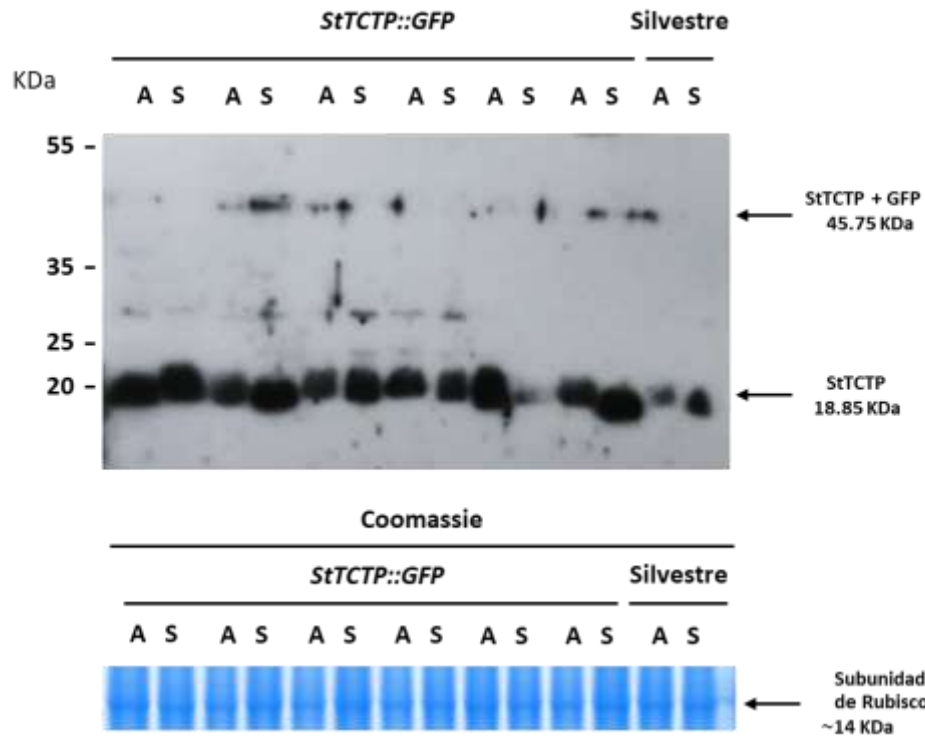


Figura 11. Perfil proteico de las proteínas totales de papa utilizando concentraciones crecientes. SDS-PAGE con tinción de Coomassie que muestra el perfil de proteínas totales de *S. tuberosum* con diferentes concentraciones (9, 18, 27, 36 y 45 mg totales de masa proteica). M: marcador de peso molecular indicador de 66.2 KDa.

Así, se encontró evidencia de la proteína StTCTP recombinante en las hojas apicales de las plantas transformadas transitoriamente con el vector StTCTP::GFP, mientras que la señal correspondiente a StTCTP nativa, sólo se encontró en las hojas sistémicas agroinoculadas con GFP::GUS (Figura 12). Esto sugiere que la proteína, el mRNA de *StTCTP* o ambos, pueden ser transportados a larga distancia según el modelo utilizado en este estudio, lo cual también ha sido comprobado con el ORF de *AtTCTP1*, el cual es capaz de movilizar su transcrito (Branco y Masle, 2019; Yang *et al.*, 2019), mientras que las proteínas CmTCTP y AtTCTP2, también son movilizadas a largas distancias (Hinojosa-Moya *et al.*, 2013; Toscano-Morales *et al.*, 2014).

A)



B)

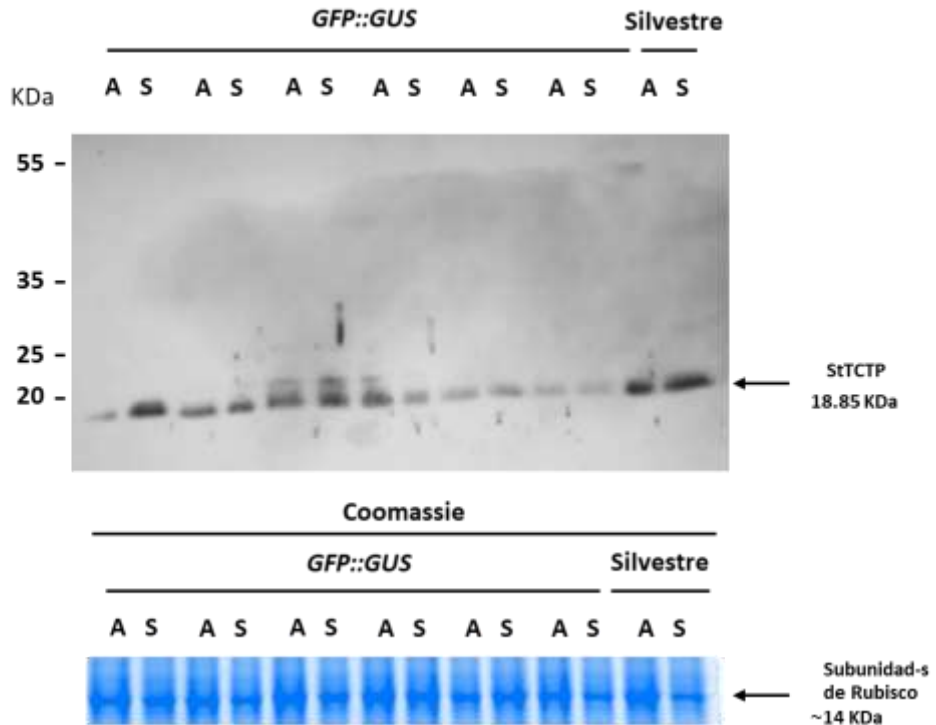


Figura 12. Detección de *StTCTP* fusionada a *GFP* y *StTCTP* nativa por Western blot en plantas agroinfiltradas con *StTCTP::GFP* y *GFP::GUS*. A) Detección de *StTCTP* nativa (18,85 KDa) y *StTCTP* fusionado a *GFP* (45,75 KDa) en plantas agroinfiltradas con *StTCTP::GFP* y B) *GFP::GUS*. La detección fue llevada a cabo en hojas agroinoculadas (A) y apicales (S). En A) y B) se incluye el control de carga correspondiente a la subunidad pequeña de rubisco (~14 KDa) visualizada por SDS-PAGE con tinción de Coomassie.

6.3 Fenotipo de las plantas agroinfiltradas con los vectores *StTCTP::GFP* y *GFP::GUS*

Con el propósito de analizar si *StTCTP* fusionada a *GFP* detectada por RT-PCR punto final y RT-qPCR en las plantas agroinfiltradas con el vector *StTCTP::GFP*, tiene algún efecto sobre el fenotipo de tubérculos maduros, se incubaron las plantas agroinfiltradas hasta la finalización de la tuberización. La parte aérea y radical de la planta, así como los tubérculos, fueron analizados y cuantificados. Se examinaron el peso de la biomasa, el diámetro y el número de tubérculos por planta. En este sentido, no se observaron diferencias significativas en el número de tubérculos por planta, la biomasa y el diámetro de los tubérculos entre las plantas agroinfiltradas con *StTCTP::GFP* y las plantas control (agroinfiltradas con *GFP::GUS*). Además, se detectó una tendencia similar hacia un aumento en la biomasa aérea en las plantas agroinfiltradas con *StTCTP::GFP* en comparación con las plantas tratadas con *GFP::GUS* (Figura 13). Este hallazgo es coherente con investigaciones previas que indican que la sobreexpresión de TCTP de tomate en tabaco conduce a un incremento en la biomasa

(De Carvalho *et al.*, 2017), así como con la evidencia de que AtTCTP2 está asociada con la regeneración completa de una planta y el incremento en la biomasa (Toscano-Morales *et al.*, 2015).

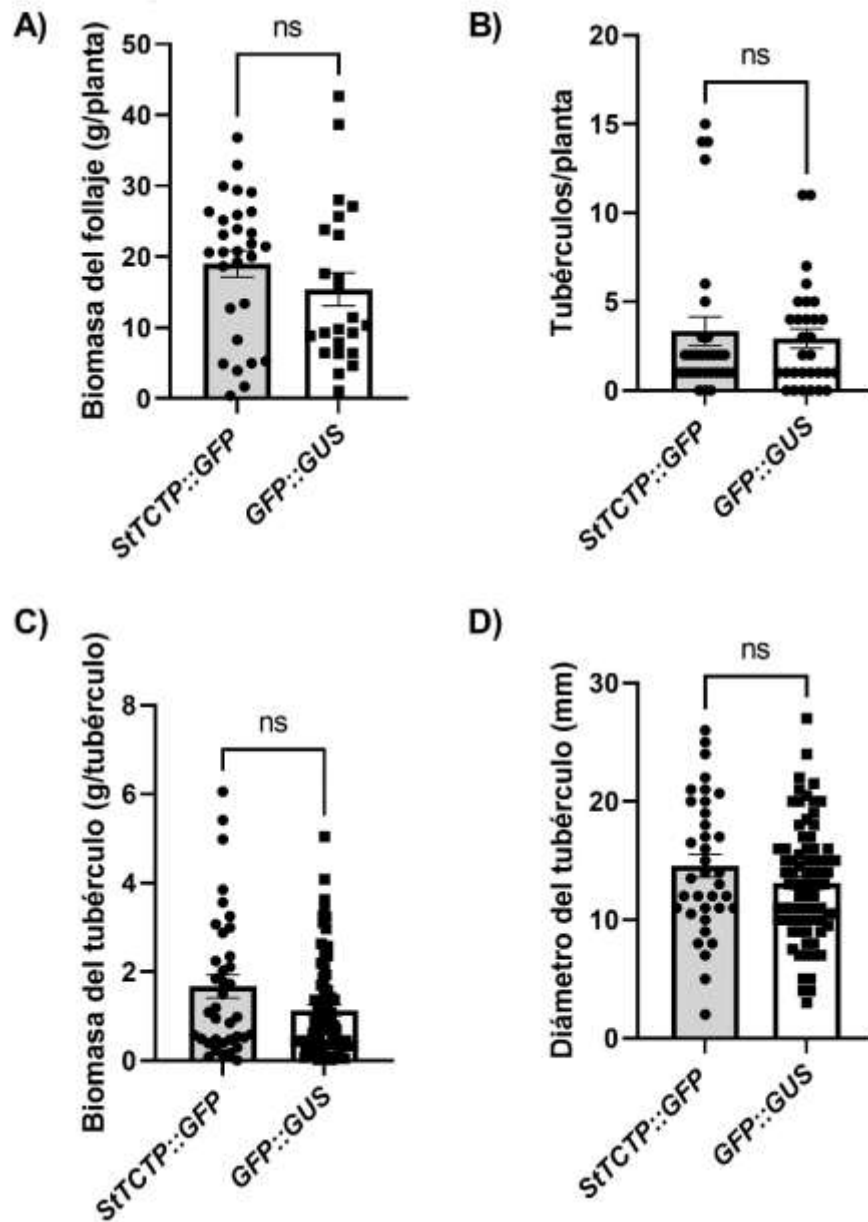


Figura 13. Fenotipo de los tubérculos y las plantas agroinfiltradas con las construcciones *StTCTP::GFP* y *GFP::GUS*. La biomasa del follaje (A), número de

tubérculos por planta (**B**), biomasa de los tubérculos (**C**) y diámetro de los tubérculos (**D**) fueron analizados 40 días después de la agroinfiltración con los vectores *StTCTP::GFP* (n=30) o *GFP::GUS* (n=30), la dispersión correspondiente a las plantas agroinfiltradas con estos vectores, está representada con círculos y cuadrados negros, respectivamente). Las barras indican el error estándar de la media. Los asteriscos simbolizan las diferencias significativas no significativas (ns) (prueba de Mann-Whitney).

Por otro lado, se sugiere una tendencia en la inducción de la formación de tubérculos en plantas que expresaron transitoriamente a *StTCTP* fusionado a *GFP*, ya que se observaron ocho ejemplares que mostraron evidencia de formación de tubérculos en los estados iniciales de maduración (79 tubérculos inmaduros en total, etapas I a VII (Weeda *et al.*, 2009)) en comparación con las plantas agroinfiltradas con el vector control, en las cuales solo se observaron tubérculos maduros (etapa VIII). Es importante señalar que el número de tubérculos maduros en las plantas tratadas con el vector *StTCTP::GFP* (100 tubérculos maduros en total) fue similar al número de tubérculos en plantas tratadas con *GFP::GUS* (88 tubérculos) pero no hubo presencia de tubérculos inmaduros en estas plantas (Figura 14, Tabla 4). Esto apoya la hipótesis de que el gen *StTCTP* está implicado en el proceso de tuberización, el cual es una forma de diferenciación celular que comienza a partir de un estolón (Jackson, 1999). La estructura terciaria hipotética de *StTCTP* se asemeja a las proteínas *AtTCTP2* y *CmTCTP*, que han demostrado desempeñar un papel en la regeneración y el aumento de la biomasa, los resultados obtenidos en este proyecto respaldan la premisa de que

TCTP está implicada en la diferenciación celular, particularmente, sugieren que StTCTP desempeña un papel importante en la tuberización. Esto es consistente con los experimentos llevados a cabo en *Dictyostelium discoideum*, los cuales demostraron que DdTCTP regula la proporción pretallo/prespora, la diferenciación y patrón celular (Kumar *et al.*, 2020).

Es probable que el mRNA de *StTCTP* podría ser traducido en las raíces, por lo tanto, los efectos observados podrían ser el resultado de la acción de la proteína, no del mRNA en sí mismo, esto podría estar respaldado por la evidencia de la detección de la proteína StTCTP recombinante en el ápice de las plantas tratadas con *StTCTP::GFP*; no obstante, es crucial realizar análisis de detección de la proteína StTCTP en la zona radicular de las plantas agroinfiltradas.

Es importante considerar un escenario en el que StTCTP podría estar ejerciendo una inhibición en el desarrollo de los tubérculos, ya que se observó la presencia de tubérculos inmaduros en las plantas tratadas, por lo tanto, se requieren realizar más ensayos para poder asegurar las diversas hipótesis que pueden emerger de este estudio.

La evidencia presentada en el análisis de RT-qPCR es reveladora. A pesar de que el transcrito de *StTCTP* recombinante es menos abundante que el mRNA de *StTCTP* endógeno, es destacable que incluso un pequeño aumento en la transcripción de *StTCTP* fue suficiente para inducir un fenotipo en las raíces. En particular, se logró activar las etapas iniciales (I-VII) del proceso de tuberización. Es probable que StTCTP podría tener una señal promotora o inductora de la tuberización, tal como ocurre con

las moléculas móviles: mRNA de StBEL5, miR156 y miRNA172 (Banerjee *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2009; Bhogale *et al.*, 2014).

Tabla 4. Tubérculos obtenidos a partir de plantas sometidas a la agroinfiltración con los vectores StTCTP::GFP y GFP::GUS.

| Vector | Etapas de tuberización (Número de tubérculos/etapa) | | | | | | | | Total |
|-------------|--|----|-----|----|---|----|-----|------|-------|
| | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | |
| StTCTP::GFP | 0 | 2 | 5 | 4 | 1 | 1 | 2 | 3 | 18 |
| | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 16 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 15 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 14 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 14 |
| | 2 | 0 | 0 | 2 | 4 | 2 | 2 | 1 | 13 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 | 13 |
| | 1 | 2 | 0 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 11 |
| | 2 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 2 | 3 | 11 |
| | 1 | 0 | 2 | 0 | 3 | 1 | 0 | 2 | 9 |
| | 0 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 9 |
| | 0 | 0 | 1 | 0 | 6 | 0 | 0 | 2 | 9 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | GFP:: GUS | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 |
| 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 | 11 |
| 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 7 |
| 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

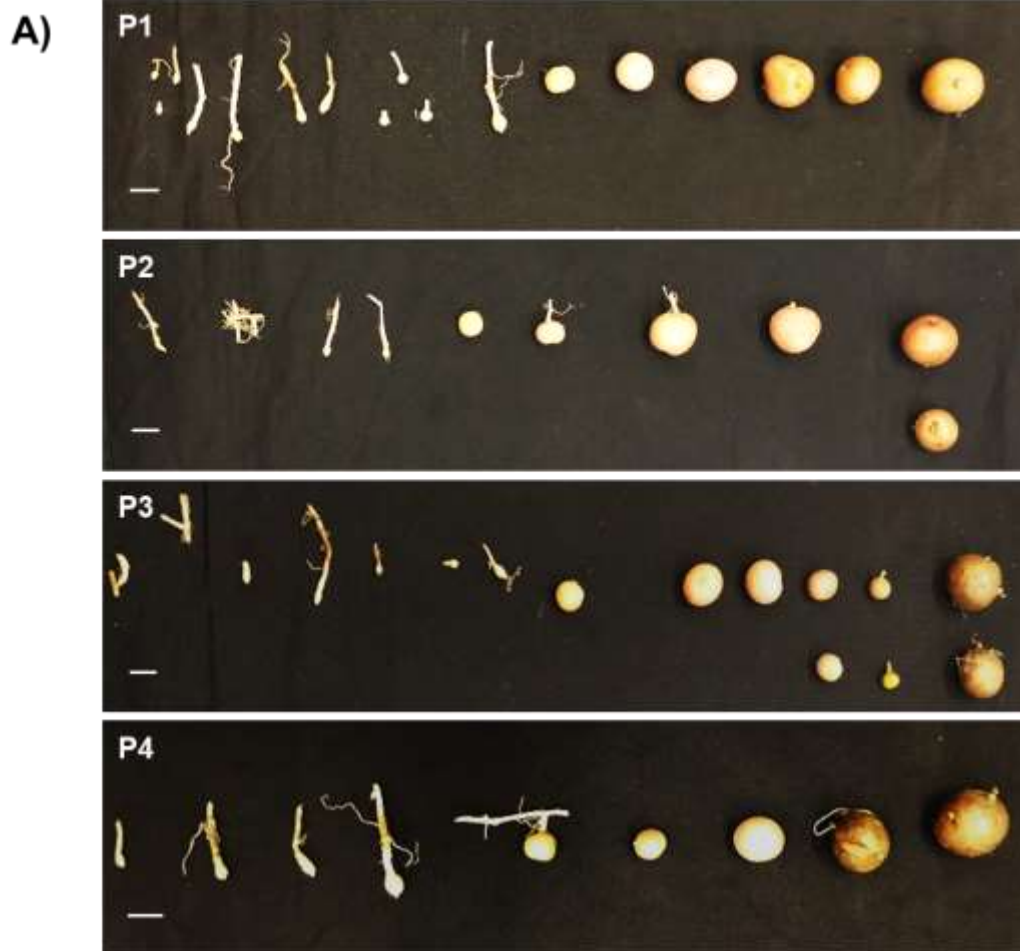


Figura 14. Formación de tubérculos de las plantas agroinfiltradas con el vector *StTCTP::GFP*. La recolección de los tubérculos se realizó dos meses después de la agroinfiltración. **A)** Las plantas agroinfiltradas con el vector *StTCTP::GFP* presentaron estadios de estolón hasta tubérculo maduro. **B)** Tubérculos emergentes de plantas agroinfiltradas con el vector *GFP::GUS*, los cuales son tubérculos maduros y no se encontró presencia de estolones. La línea inferior izquierda representa 1 cm.

Durante el análisis del fenotipo, se detectó la formación de plántulas y un estolón en las plantas agroinfiltradas con el vector *StTCTP::GUS* (3 plantas de 30) en comparación con las plantas agroinfiltradas con el vector control en el cual no se encontró presencia de plántulas, ni estolones (Figura 15). Se realizó una RT-PCR punto final a las plántulas y estolón con el fin de detectar el amplicón del gen reportero *GFP* y *GAPDH* (como control endógeno), obteniendo evidencia de *GFP* en las tres estructuras analizadas. La formación de plántulas y estolones, es un mecanismo común de reproducción asexual en las plantas. Esto podría estar relacionado con la capacidad de *CmTCTP*, *AtTCTP2* y posiblemente *StTCTP* para inducir la regeneración completa de la planta. Los estolones son brotes subterráneos que surgen de las yemas auxiliares del tallo de la papa. El proceso de tuberización comienza con la regulación de la división celular, la proliferación y el tamaño de las células en estos estolones. (Roumeliotis, 2012), dichos procesos están asociados con las funciones de TCTP. Asimismo, en estudios transcriptómicos realizados en microtubérculos de papa, se identificaron dos ciclinas sobreexpresadas: CDC2-CDKA (PGSC0003DMT400075349) y CDC20-CDKA (PGSC0003DMT400071215). Estas

proteínas son reguladoras en los puntos de control G1/S y G2/M, desempeñando un papel fundamental como factores promotores de la mitosis (Valencia-Lozano *et al.*, 2022). A este respecto, TCTP regula positivamente la transición entre las fases G1 y S durante la progresión del ciclo celular y la proliferación celular en la organogénesis (Betsch *et al.*, 2019). Esta premisa respalda los datos recopilados en este estudio, que sugieren que StTCTP desempeña un papel crucial en la diferenciación celular, incluyendo la formación de estructuras como los estolones y las plántulas, así como el progreso de la tuberización que involucra cambios morfofisiológicos en las células del estolón.

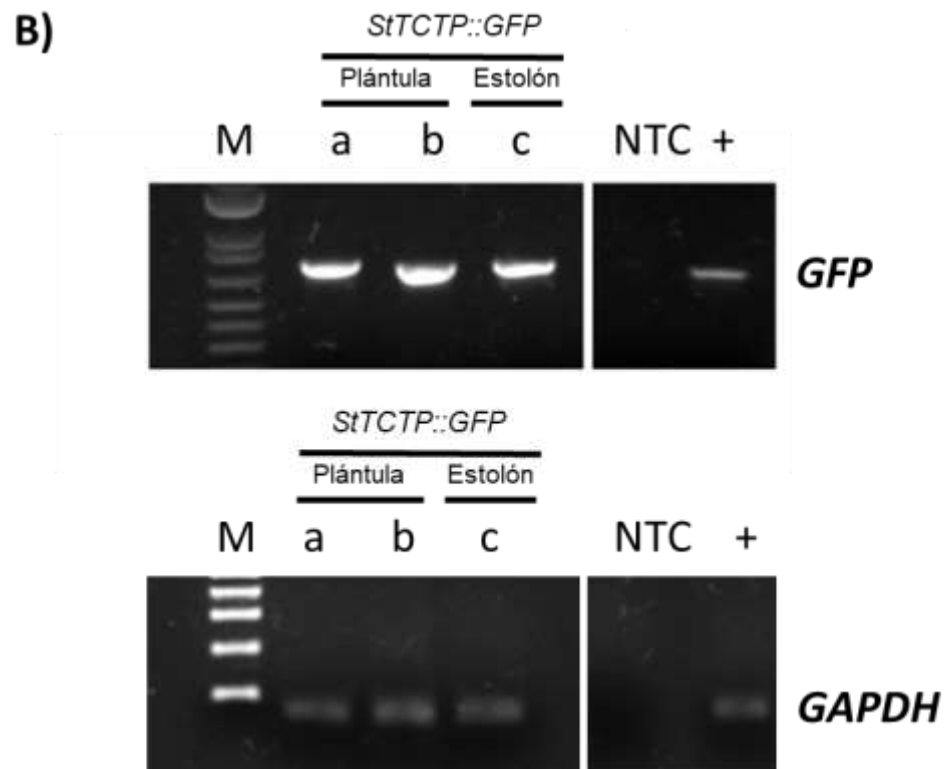
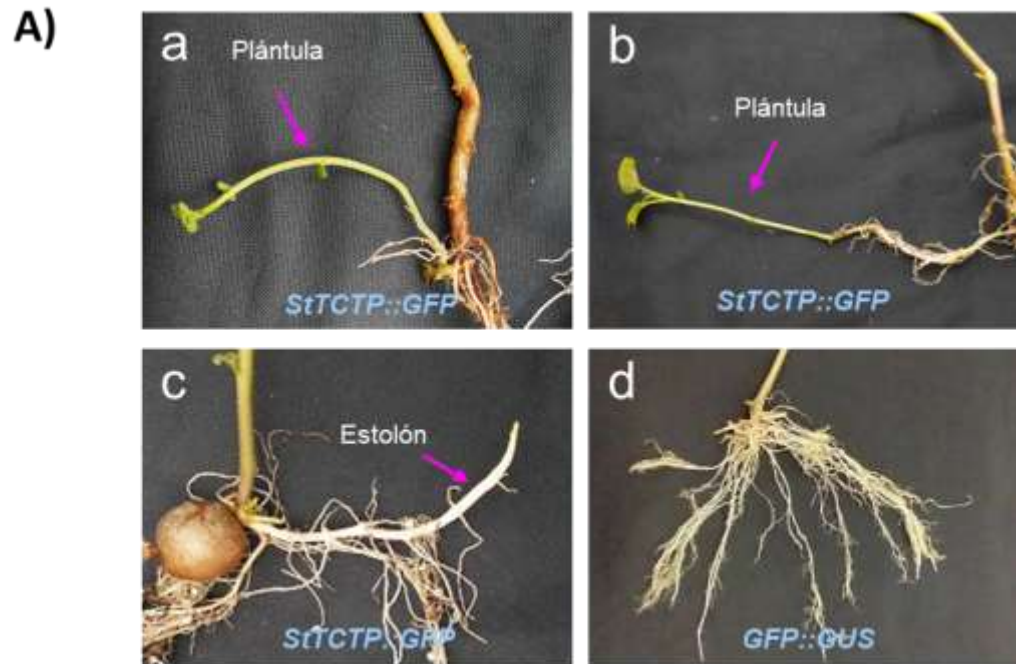


Figura 15. Inducción de plántulas por efecto de la transformación transitoria con StTCTP::GFP. A) Plántulas emergentes (a y b) y estolón (c) dos semanas después de

la agroinfiltración con *StTCTP::GFP*. Las plantas agroinfiltradas con el vector *GFP::GUS* no mostraron evidencia de formación de plántulas y estolones dos semanas después de la agroinoculación (d). **B)** Detección de *GFP* (720 pb) y *GAPDH* (92 pb) mediante RT-PCR de punto final de las plántulas (a y b) y estolón (c). M: marcador de tamaño molecular (1 kb Plus). +: control positivo. NTC: control sin molde de DNA.

6.4 Fenotipo de tubérculos y brotes obtenidos de las plantas agroinfiltradas con el vector *StTCTP::GFP* y *GFP::GUS*

Con el propósito de evaluar si *StTCTP* ejerce algún efecto en el fenotipo de los tubérculos maduros, se llevó a cabo un ensayo de brotación. En este experimento, los tubérculos recolectados de las plantas que fueron transformadas transitoriamente con el vector *StTCTP::GFP* y del grupo de control, fueron sometidos a una incubación a 4 °C en condiciones de oscuridad. Después de dicha incubación, se cuantificó el diámetro y longitud de los brotes, además del número de brotes por tubérculo. Los resultados mostraron un mayor diámetro en los brotes emergentes de las plantas agroinfiltradas con *StTCTP::GFP* en comparación con los agroinfiltrados con *GFP::GUS* (Figura 16). Este proceso es consistente con la evidencia de que TCTP es un importante regulador del crecimiento en plantas (Berkowitz *et al.*, 2009) y, dado que *S. tuberosum* posee un gen que codifica para TCTP, es probable que esta proteína desempeñe funciones similares a las observadas en los grupos estructurales AtTCTP1 y CmTCTP (Gutiérrez-Galeano *et al.*, 2014).

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas con respecto a la longitud de los brotes, así como el número de brotes por tubérculo entre las plantas agroinfiltradas

con el vector *StTCTP::GFP* y *GFP::GUS*. Es esencial destacar que los brotes de las plantas que fueron sometidas a la técnica de agroinfiltración con el vector que induce la sobreexpresión de *StTCTP* fusionado a *GFP*, exhibieron una tonalidad violeta, indicativa de la presencia de antocianinas. Por otro lado, los brotes provenientes de las plantas agroinfiltradas con el vector de control no mostraron ningún cambio en su pigmentación (Figura 6). Este cambio de color podría ser un resultado directo de la sobreexpresión de *StTCTP*, ya que las antocianinas, que son compuestos antioxidantes, son conocidas por favorecer la resistencia a diversos tipos de estrés, tanto biótico como abiótico (Naing y Kim, 2021); por lo tanto, este fenómeno podría estar relacionado con la capacidad de *TCTP* de conferir tolerancia a estrés biótico y abiótico, tales como tolerancia al estrés salino (Mostek *et al.*, 2015), hídrico (Ghabooli *et al.*, 2013) y otras diferentes formas de estrés en las plantas.

Es plausible proponer que la sobreexpresión de *StTCTP* podría llevar a un fenotipo atípico debido a la posibilidad de un transporte no regulado del mRNA. Otra evidencia que podría explicar el fenotipo de las plantas agroinfiltradas con el vector *StTCTP::GFP*, es la encontrada por Liu y colaboradores en el 2020 (Liu *et al.*, 2020), quienes demostraron en un modelo de hepatocarcinoma, que los niveles de mRNA de *TCTP* cumplen una función crucial como factores reguladores. Estos niveles de mRNA operan como controladores que influyen en la eficiencia de la traducción del propio mRNA de *TCTP*, estableciendo un mecanismo de retroalimentación negativa. El mRNA y la proteína *TCTP* funcionan como un sistema tampón para mantener la homeostasis del nivel de proteína *TCTP in vivo*, por lo tanto, la alteración del equilibrio de este sistema podría dar lugar a una expresión anormal de *TCTP*. El número de

copias del transcrito de *StTCTP* recombinante pudo haber sido variable debido a la técnica de transformación transitoria empleada en este proyecto, ya que solo algunas hojas de la planta completa fueron agroinoculadas, esta variación pudo haber desequilibrado el sistema de autorregulación propuesto por Liu (Liu *et al.*, 2020) generando fenotipos atípicos. La posibilidad de realizar una comparación hipotética entre modelos biológicos de distintos reinos, como el animal (*Drosophila*) y el vegetal (*Arabidopsis*), resulta viable para TCTP. Esto se fundamenta en la evidencia proporcionada por los experimentos de rescate de fenotipos utilizando TCTP de dichos organismos (Hsu *et al.*, 2007).

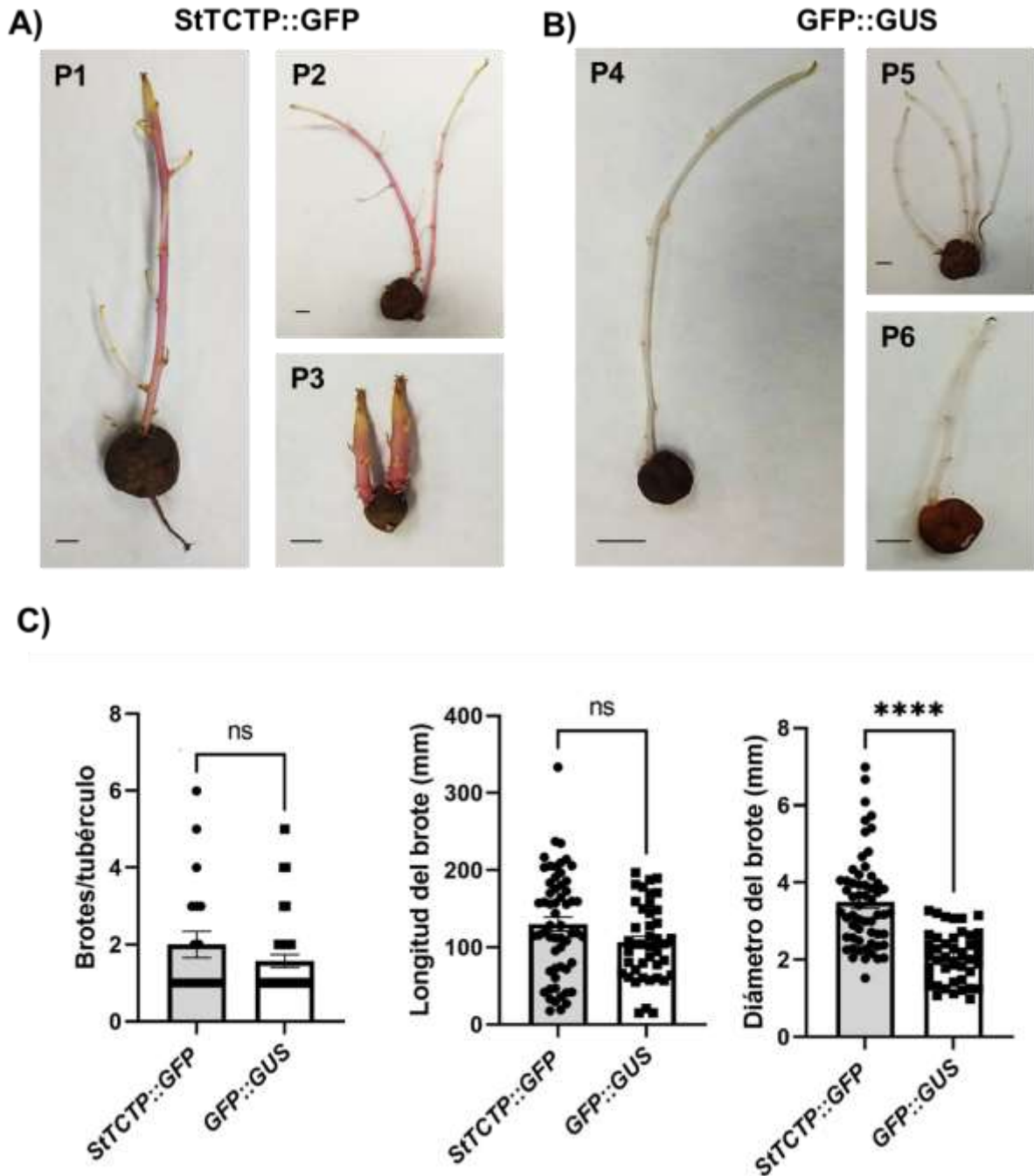


Figura 16. Fenotipo de los brotes emergentes de los tubérculos de las plantas modificadas transitoriamente con los vectores *StTCTP::GFP* y *GFP::GUS*. La recolección de tubérculos se realizó dos meses después de la agroinfiltración, estos se incubaron a 4 °C en condiciones de oscuridad para generar la inducción de brotes.

A) Brotes surgidos de los tubérculos que se formaron a partir de las plantas agroinfiltradas con el vector *StTCTP::GFP* (P1, P2 y P3) y *GFP::GUS* (P4, P5 y P6).

B) Cuantificación del número de brotes por tubérculo, longitud y diámetro de los brotes de los tubérculos obtenidos de las plantas agroinfiltradas con vectores *StTCTP::GFP* y *GFP::GUS*. La dispersión de los datos está representada con círculos (*StTCTP::GFP*) y cuadrados negros (*GFP::GUS*). La línea inferior izquierda representa la escala igual a 1 cm. Brote/tubérculo (*StTCTP::GFP* n= 20; *GFP::GUS* n= 37); longitud y diámetro de los brotes (*StTCTP::GFP* n= 58; *GFP::GUS* n= 42). Las barras de error representan el error estándar de la media. Los asteriscos simbolizan diferencias significativas: ****P<0,0001; no significativo (ns) (prueba de Mann-Whitney).

6.5 Predicción de las estructuras terciarias hipotéticas de los transcritos y proteínas

Dado que contamos con evidencia experimental sobre el transporte del transcrito de *StTCTP* hacia los tejidos meristemáticos apicales y las raíces, procedimos a realizar un acoplamiento molecular hipotético entre el mRNA de *StTCTP* y las proteínas StPTB1 y 6. Estas proteínas han demostrado ser capaces de acoplar molecularmente a los mRNA *StBEL5* y *POTH1* (reguladores de la tuberización), los cuales son transportados a través del floema. Para ello, se realizó la predicción *in silico* de las estructuras terciarias de los mRNAs de *StTCTP*, *AtTCTP1*, *AtTCTP2*, *CmTCTP* y *StBEL5*. La secuencia primaria fue obtenida de bases de datos Phytozome y NCBI (Tabla 5).

En función de los valores obtenidos en MolProbity y los diagramas de pseudotorsión, se eligieron los modelos 2, 1, 2, 4 y 3 para *StBEL5*, *StTCTP*, *AtTCTP1*, *AtTCTP2* y *CmTCTP*, respectivamente (Tablas 7 y 8).

Tabla 7. Estimación de la puntuación de MolProbity en modelos tridimensionales de mRNA

| mRNA | Parámetros de MolProbity | Modelo 1 | Modelo 2 | Modelo 3 | Modelo 4 | Modelo 5 |
|---------------|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>StBEL5</i> | Plegamientos erróneos de las azúcares | 752 | 754 | 749 | 722 | 729 |
| | Conformaciones erróneas de la cadena de C | 1245 | 1229 | 1213 | 1203 | 1199 |
| | Enlaces erróneos | 391 / 48892 | 413 / 48892 | 482 / 48892 | 488 / 48890 | 559 / 48891 |
| | Ángulos erróneos | 3170 / 76148 | 3423 / 76148 | 3612 / 76148 | 3537 / 76140 | 3816 / 76144 |
| | Intercambio de la lateralidad quiral | 1321/8212 | 1242/8212 | 1272/8212 | 1124/8212 | 1156/8212 |
| | Valores atípicos de la geometría tetraédrica | 25 | 32 | 43 | 31 | 56 |
| <i>StTCTP</i> | Plegamientos erróneos de las azúcares | 149 | 175 | 172 | 171 | 184 |
| | Conformaciones erróneas de la cadena de C | 253 | 305 | 286 | 295 | 293 |
| | Enlaces erróneos | 0 / 12895 | 41 / 12895 | 22 / 12895 | 1 / 12895 | 31 / 12894 |
| | Ángulos erróneos | 376 / 20090 | 608 / 20090 | 493 / 20090 | 385 / 20090 | 567 / 20086 |
| | Intercambio de la lateralidad quiral | 265/2164 | 336/2164 | 302/2164 | 352/2164 | 360/2164 |
| | Valores atípicos de la geometría tetraédrica | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |

| | | | | | | |
|---------|--|--------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| AtTCTP1 | Plegamientos erróneos de las azúcares | 258 | 239 | 263 | 254 | 256 |
| | Conformaciones erróneas de la cadena de C | 258 | 414 | 432 | 441 | 438 |
| | Enlaces erróneos | 32 / 19026 | 12 / 19026 | 53 / 19026 | 14 / 19026 | 41 / 19026 |
| | Ángulos erróneos | 916 / 29626 | 619 / 29626 | 939 / 29626 | 659 / 29626 | 861 / 29626 |
| | Intercambio de la lateralidad quiral | 515/3216 | 467/3216 | 492/3216 | 517/3216 | 517/3216 |
| | Valores atípicos de la geometría tetraédrica | 7 | 0 | 5 | 2 | 2 |
| AtTCTP2 | Plegamientos erróneos de las azúcares | 158 | 176 | 168 | 163 | 168 |
| | Conformaciones erróneas de la cadena de C | 272 | 280 | 280 | 271 | 263 |
| | Enlaces erróneos | 27 / 12112 | 27 / 12112 | 21 / 12112 | 1 / 12112 | 21 / 12112 |
| | Ángulos erróneos | 587 / 18883 | 515 / 18883 | 562 / 18883 | 389 / 18883 | 541 / 18883 |
| | Intercambio de la lateralidad quiral | 286/2020 | 316/2020 | 328/2020 | 308/2020 | 280/2020 |
| | Valores atípicos de la geometría tetraédrica | 2 | 2 | 1 | 2 | 5 |
| CmTCTP | Plegamientos erróneos de las azúcares | 261 | 263 | 235 | 269 | 275 |
| | Conformaciones erróneas de la cadena de C | 448 | 453 | 407 | 448 | 454 |
| | Enlaces erróneos | 118 / 19045 | 75 / 19045 | 15 / 19045 | 95 / 19045 | 82 / 19045 |
| | Ángulos erróneos | 1139 / 29673 | 989 / 29673 | 646 / 29673 | 1037 / 29673 | 1014 / 29673 |
| | Intercambio de la lateralidad quiral | 424/3200 | 482/3200 | 412/3200 | 482/3200 | 465/3200 |

| | | | | | |
|--|---|---|---|---|---|
| Valores atípicos de la geometría tetraédrica | 5 | 3 | 0 | 1 | 4 |
|--|---|---|---|---|---|

Tabla 8. Validación de la estructura del mRNA: valores de los gráficos de pseudotorsión

| mRNA | Ángulos de torsión | Modelo 1 (%) | Modelo 2 (%) | Modelo 3 (%) | Modelo 4 (%) | Modelo 5 (%) |
|----------------|--------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>StBEL5</i> | C3' Eta-Theta | 5.31 | 5.38 | 5.95 | 5.87 | 5.33 |
| | C2' Eta-Theta | 15.67 | 12.95 | 16.74 | 14.71 | 14.29 |
| | C3' Eta'-Theta' | 4.55 | 3.95 | 4.84 | 4.93 | 3.93 |
| | C2' Eta'-Theta' | 36.19 | 37.95 | 34.42 | 34.8 | 39.43 |
| | C3' Eta''-Theta'' | 3.38 | 3.00 | 3.67 | 3.94 | 3.74 |
| | C2' Eta''-Theta'' | 10.45 | 8.93 | 6.05 | 13.24 | 9.14 |
| <i>StTCTP</i> | C3' Eta-Theta | 4.09 | 2.3 | 3.48 | 3.1 | 4.46 |
| | C2' Eta-Theta | 8.06 | 12.9 | 7.02 | 7.22 | 14.75 |
| | C3' Eta'-Theta' | 2.16 | 2.3 | 2.74 | 2.33 | 2.36 |
| | C2' Eta'-Theta' | 37.10 | 40.32 | 42.11 | 32.99 | 42.62 |
| | C3' Eta''-Theta'' | 2.64 | 2.56 | 2.49 | 3.62 | 3.15 |
| | C2' Eta''-Theta'' | 11.29 | 4.84 | 7.02 | 7.22 | 16.39 |
| <i>AtTCTP1</i> | C3' Eta-Theta | 3.58 | 4.04 | 2.55 | 3.63 | 4.06 |
| | C2' Eta-Theta | 10.59 | 9.92 | 18.42 | 13.14 | 16.88 |
| | C3' Eta'-Theta' | 3.41 | 3.20 | 2.72 | 2.77 | 3.38 |
| | C2' Eta'-Theta' | 48.24 | 31.40 | 51.32 | 37.96 | 31.17 |

| | | | | | | |
|----------------|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | C3' Eta''-Theta'' | 2.39 | 1.68 | 2.04 | 1.21 | 1.52 |
| | C2' Eta''-Theta'' | 4.71 | 4.13 | 5.26 | 5.84 | 5.19 |
| <i>AtTCTP2</i> | C3' Eta-Theta | 3.73 | 5.74 | 4.48 | 3.02 | 3.54 |
| | C2' Eta-Theta | 18.37 | 7.27 | 10.71 | 13.25 | 14.04 |
| | C3' Eta'-Theta' | 2.67 | 4.37 | 3.36 | 2.75 | 3.27 |
| | C2' Eta'-Theta' | 40.82 | 29.09 | 39.29 | 32.53 | 40.35 |
| | C3' Eta''-Theta'' | 1.87 | 3.55 | 2.24 | 2.20 | 1.91 |
| | C2' Eta''-Theta'' | 14.29 | 5.45 | 1.79 | 7.23 | 10.53 |
| <i>CmTCTP</i> | C3' Eta-Theta | 4.07 | 2.77 | 7.87 | 6.53 | 5.74 |
| | C2' Eta-Theta | 15.73 | 11.22 | 10.20 | 12.0 | 15.07 |
| | C3' Eta'-Theta' | 3.23 | 2.77 | 6.70 | 5.41 | 5.41 |
| | C2' Eta'-Theta' | 38.2 | 45.92 | 20.41 | 14.0 | 9.59 |
| | C3' Eta''-Theta'' | 3.24 | 2.42 | 5.06 | 3.84 | 4.24 |
| | C2' Eta''-Theta'' | 7.87 | 1.02 | 12.24 | 14.0 | 6.85 |

Después de haber obtenido las estructuras 3D hipotéticas de los transcritos de interés, se predijeron las estructuras terciarias de las proteínas StPTB1 y StPTB6, para ello, las secuencias en PDB fueron ingresadas en el programa AlphaFold, el cual generó una estructura que fue refinada en el servidor DeepRefiner y evaluada con MolProbity y Saves v60, en estos dos últimos programas se llevaron a cabo los cálculos sobre los parámetros que nos permitieron discernir entre los cinco modelos obtenidos con el programa de refinamiento. De esta manera, el modelo 3 fue seleccionado para PTB1, mientras que el modelo 2 fue elegido para PTB6 (Tablas 9 y 10).

Tabla 9. Puntuación MolProbity para los modelos PTB1 y PTB6

| Proteína | Parámetros de MolProbity | Modelo 1 | Modelo 2 | Modelo 3 | Modelo 4 | Modelo 5 |
|----------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| PTB1 | Rotámeros débiles | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Rotámeros favorecidos | 385 | 385 | 385 | 385 | 385 |
| | Valores Ramachandran atípicos | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | Valores Ramachandran favorecidos | 427 | 429 | 430 | 427 | 428 |
| | Puntuación Z de la distribución de Rama | 0.40 ± 0.41 | 0.51 ± 0.41 | 0.56 ± 0.40 | 0.49 ± 0.40 | 0.50 ± 0.40 |
| | Desviaciones de $C\beta > 0.25 \text{ \AA}$ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Enlaces erróneos | 0 / 3521 | 0 / 3521 | 0 / 3521 | 0 / 3521 | 0 / 3521 |
| | Ángulos erróneos | 12 / 4764 | 12 / 4764 | 12 / 4764 | 12 / 4764 | 12 / 4764 |
| | Prolinas Cis | 0 / 19 | 0 / 19 | 0 / 19 | 0 / 19 | 0 / 19 |
| | Sin prolinas Cis | 2 / 421 | 2 / 421 | 2 / 421 | 2 / 421 | 2 / 421 |
| | Valores CaBLAM atípicos | 11 | 12 | 11 | 11 | 11 |
| | Valores atípicos de la geometría CA | 7 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | Valores atípicos del volumen quiral | 0 / 525 | 0 / 525 | 0 / 525 | 0 / 525 | 0 / 525 |
| PTB6 | Rotámeros débiles | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Rotámeros favorecidos | 383 | 383 | 384 | 384 | 384 |
| | Valores Ramachandran atípicos | 4 | 3 | 3 | 2 | 3 |
| | Valores Ramachandran favorecidos | 429 | 434 | 429 | 429 | 431 |
| | Puntuación Z de la distribución de Rama | 0.50 ± 0.39 | 0.61 ± 0.39 | 0.72 ± 0.40 | 0.97 ± 0.40 | 0.73 ± 0.41 |

| | | | | | | |
|--|---|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|
| | | | | | | |
| | Desviaciones de $C\beta > 0.25 \text{ \AA}$ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Enlaces erróneos | 0 / 3551 | 0 / 3551 | 0 / 3551 | 0 / 3551 | 0 / 3551 |
| | Ángulos erróneos | 12 / 4813 | 15 / 4813 | 14 / 4813 | 12/4813 | 14 / 4813 |
| | Prolinas Cis | 0 / 22 | 0 / 22 | 0 / 22 | 0 / 22 | 0 / 22 |
| | Sin prolinas Cis | 2 / 421 | 2 / 421 | 2 / 421 | 2 / 421 | 2 / 421 |
| | Valores CaBLAM atípicos | 5 | 4 | 8 | 9 | 5 |
| | Valores atípicos de la geometría CA | 6 | 5 | 5 | 5 | 7 |
| | Valores atípicos del volumen quiral | 0 / 530 | 0 / 530 | 0 / 530 | 0 / 530 | 0 / 530 |

Tabla 10. Evaluación de la validez estructural (SAVES v6.0) de los modelos refinados PTB1 y PTB6

| Proteína | Parámetros de validación | Modelo 1 | Modelo 2 | Modelo 3 | Modelo 4 | Modelo 5 |
|----------|---|--|--|--|--|--|
| PTB1 | ERRAT | 95.619 | 95.90790 | 96.62340 | 96.63210 | 96.65810 |
| | Verify 3D Residuos con el promedio 3D-1D score ≥ 0.1 (%) | 85.26 | 83.45 | 84.35 | 82.09 | 84.58 |
| | PROCHECK | 9 evaluaciones atípicas: Errores: 3 Advertencias: 3 Pases:3 | 9 evaluaciones atípicas: Errores: 3 Advertencias: 3 Pases:3 | 9 evaluaciones atípicas: Errores: 3 Advertencias: 3 Pases:3 | 9 evaluaciones atípicas: Errores: 3 Advertencias: 3 Pases:3 | 9 evaluaciones atípicas: Errores: 3 Advertencias: 3 Pases:3 |

| | | | | | | |
|------|--|--|--|--|--|--|
| | RAMA-CHANDRAN Residuos en las regiones más favorecidas (%) | 90.8 | 91 | 91.3 | 91.3 | 91.3 |
| PTB6 | ERRAT | 95.0739 | 95.3771 | 94.7761 | 96.4377 | 94.321 |
| | Verify 3D (Residuos con el promedio 3D-1D score ≥ 0.1) (%) | 86.26 | 87.61 | 85.59 | 86.26 | 84.46 |
| | PROCHECK | 9 evaluaciones atípicas: Errores: 3 Advertencias: 3 Pases:3 | 9 evaluaciones atípicas: Errores: 3 Advertencias: 3 Pases:3 | 9 evaluaciones atípicas: Errores: 3 Advertencias: 3 Pases:3 | 9 evaluaciones atípicas: Errores: 3 Advertencias: 3 Pases:3 | 9 evaluaciones atípicas: Errores: 3 Advertencias: 3 Pases:3 |
| | RAMA-CHANDRAN Residuos en las regiones más favorecidas (%) | 91 | 92.3 | 90.5 | 92 | 92 |

6.5.1 Predicción del acoplamiento molecular proteína-RNA

La estructura 3D hipotética de los mRNA *StTCTP*, *AtTCTP1*, *AtTCTP2*, *CmTCTP* y *StBEL5*, fueron acopladas con las estructuras 3D hipotéticas de *StPTB1* y *StPTB6*, de forma independiente, por medio de un programa de simulación del acoplamiento proteína-RNA, HDock. Se obtuvieron 10 modelos por cada interacción hipotética proteína-RNA, el modelo elegido fue aquel que obtuvo la mejor calidad en los puntajes

del acoplamiento calculados por el servidor empleado. Así, el modelo 1 fue seleccionado para todas las predicciones del acoplamiento proteína-mRNA (Tabla 11).

Tabla 11. Calidad de las estructuras proteína-mRNA calculadas en HDock

| Docking (Proteína -mRNA) | Rango | Modelos | | | | | | | | | |
|--------------------------------|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| PTB1-StBEL5 | Puntaje del docking | -351.28 | -309.07 | -307.57 | -284.97 | -281.59 | -279.56 | -279.5 | -278.47 | -276.56 | -276.11 |
| | Puntaje de la confianza | 0.9825 | 0.9601 | 0.959 | 0.937 | 0.9329 | 0.9303 | 0.9302 | 0.9289 | 0.9263 | 0.9257 |
| | Ligando rmsd (Å) | 374.7 | 344.45 | 383.06 | 422.26 | 409.86 | 401.84 | 374.04 | 423.48 | 412.13 | 403.86 |
| PTB1-CmTCTP | Puntaje del docking | -362.42 | -333.8 | -325.11 | -320.96 | -312.33 | -310.28 | -308.33 | -307.61 | -305.27 | -303.39 |
| | Puntaje de la confianza | 0.9859 | 0.9753 | 0.9708 | 0.9683 | 0.9626 | 0.961 | 0.9596 | 0.959 | 0.9571 | 0.9555 |
| | Ligando rmsd (Å) | 180.4 | 164.95 | 147.76 | 119.29 | 131.41 | 138.3 | 130.88 | 139.56 | 145 | 156.62 |
| PTB1-A β TC TP1 | Puntaje del docking | -325.78 | -320.46 | -315.17 | -307.78 | -296.3 | -292.57 | -291.55 | -290.28 | -288.23 | -287.72 |
| | Puntaje de la confianza | 0.9711 | 0.968 | 0.9645 | 0.9591 | 0.9491 | 0.9454 | 0.9443 | 0.943 | 0.9407 | 0.9402 |
| | Ligando rmsd (Å) | 238.3 | 216.16 | 158.81 | 137.06 | 214.91 | 205.58 | 132.05 | 147.86 | 184.81 | 154.97 |
| PTB1-A β TC TP2 | Puntaje del docking | -351.09 | -349.94 | -346.77 | -344.97 | -342.6 | -334.66 | -327.26 | -325.47 | -324.42 | -319.15 |
| | Puntaje de la confianza | 0.9824 | 0.982 | 0.9808 | 0.9801 | 0.9792 | 0.9757 | 0.9719 | 0.971 | 0.9704 | 0.9672 |
| | Ligando rmsd (Å) | 103.23 | 104.04 | 89.9 | 144.88 | 116.3 | 73.7 | 68.9 | 130.55 | 109.65 | 65.87 |
| PTB1-StTCT _P | Puntaje del docking | -327.84 | -321.2 | -320.73 | -320.59 | -319.78 | -319.01 | -315.11 | -306.68 | -302.85 | -299.24 |

| | | | | | | | | | | | |
|---------------|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Puntaje de la confianza | 0.9723 | 0.9684 | 0.9682 | 0.9681 | 0.9676 | 0.9671 | 0.9645 | 0.9583 | 0.9551 | 0.9519 |
| | Ligando rmsd (Å) | 173.1 | 126.63 | 125.54 | 138.71 | 124.49 | 165.66 | 133.33 | 108.91 | 140.94 | 110.39 |
| PTB6-BEL5 | Puntaje del docking | -339.54 | -315.74 | -310.53 | -291.82 | -289.46 | -288.52 | -268.61 | -263.18 | -262.29 | -262.23 |
| | Puntaje de la confianza | 0.9779 | 0.9649 | 0.9612 | 0.9446 | 0.9421 | 0.9411 | 0.9147 | 0.9058 | 0.9043 | 0.9042 |
| | Ligando rmsd (Å) | 372.99 | 367.34 | 416.52 | 380.73 | 370.07 | 384.37 | 486.22 | 407.15 | 431.95 | 354.6 |
| PTB6-CmTCTP | Puntaje del docking | -387.92 | -353.62 | -349.95 | -342.97 | -342.03 | -328.35 | -322.07 | -320.64 | -319.69 | -319.51 |
| | Puntaje de la confianza | 0.9915 | 0.9832 | 0.982 | 0.9794 | 0.979 | 0.9725 | 0.969 | 0.9681 | 0.9675 | 0.9674 |
| | Ligando rmsd (Å) | 133.24 | 137.5 | 143.35 | 122.22 | 141.03 | 130.87 | 103.51 | 156.51 | 135.51 | 139.14 |
| PTB6-AtTC TP1 | Puntaje del docking | -335.37 | -333.95 | -318.87 | -315.51 | -315.02 | -312.49 | -311.78 | -305.52 | -304.84 | -301.22 |
| | Puntaje de la confianza | 0.976 | 0.9754 | 0.967 | 0.9648 | 0.9644 | 0.9627 | 0.9622 | 0.9573 | 0.9568 | 0.9537 |
| | Ligando rmsd (Å) | 142.38 | 202.82 | 204.67 | 207.55 | 211 | 177.63 | 199.5 | 141.94 | 134.6 | 107.55 |
| PTB6-AtTC TP2 | Puntaje del docking | -353.89 | -347.41 | -345.47 | -335.88 | -333.83 | -329.95 | -329.69 | -328.78 | -327.22 | -326.87 |
| | Puntaje de la confianza | 0.9833 | 0.9811 | 0.9803 | 0.9763 | 0.9753 | 0.9734 | 0.9732 | 0.9728 | 0.9719 | 0.9717 |
| | Ligando rmsd (Å) | 97 | 118.91 | 131.42 | 106.97 | 109.71 | 117.67 | 107.09 | 116.66 | 126.96 | 93.5 |
| PTB6-StTCTP | Puntaje del docking | -354.98 | -354.69 | -354.6 | -338.49 | -335.28 | -317.85 | -312.51 | -311.91 | -310.59 | -309.33 |
| | Puntaje de la confianza | 0.9837 | 0.9836 | 0.9836 | 0.9775 | 0.976 | 0.9663 | 0.9627 | 0.9622 | 0.9613 | 0.9603 |
| | Ligando rmsd (Å) | 138.36 | 74.1 | 155.87 | 144.79 | 127.9 | 127.83 | 142.8 | 119.57 | 119.18 | 124.33 |

Los resultados del acoplamiento proteína-mRNA sugieren que el transcrito de *StTCTP* podría interactuar con PTB1 y PTB6 (Figura 17), lo que implica que podría transportarse a las raíces, donde tendría una participación en la regulación de la formación de tubérculos y la propagación vegetativa, además, de que estas proteínas de transporte también podrían ejercer algún tipo de regulación sobre *StTCTP*. Estos hallazgos también sugieren que los transcritos móviles del floema, *AtTCTP1*, *AtTCTP2*, *CmTCTP* y *StBEL5* (control), podrían tener la capacidad de unirse a PTB1/6 (Figura 17). En estudios sobre el transporte del mRNA de *TCTP*, se determinó que las regiones 5' y 3'- UTR contienen motivos potenciales de unión a PTB, sin embargo, éstos son prescindibles para la movilidad de TCTP (Yang *et al.*, 2019). Premisa que es soportada por este estudio, en el cual determinamos que el ORF de *StTCTP* es suficiente para la movilización de este transcrito a largas distancias.

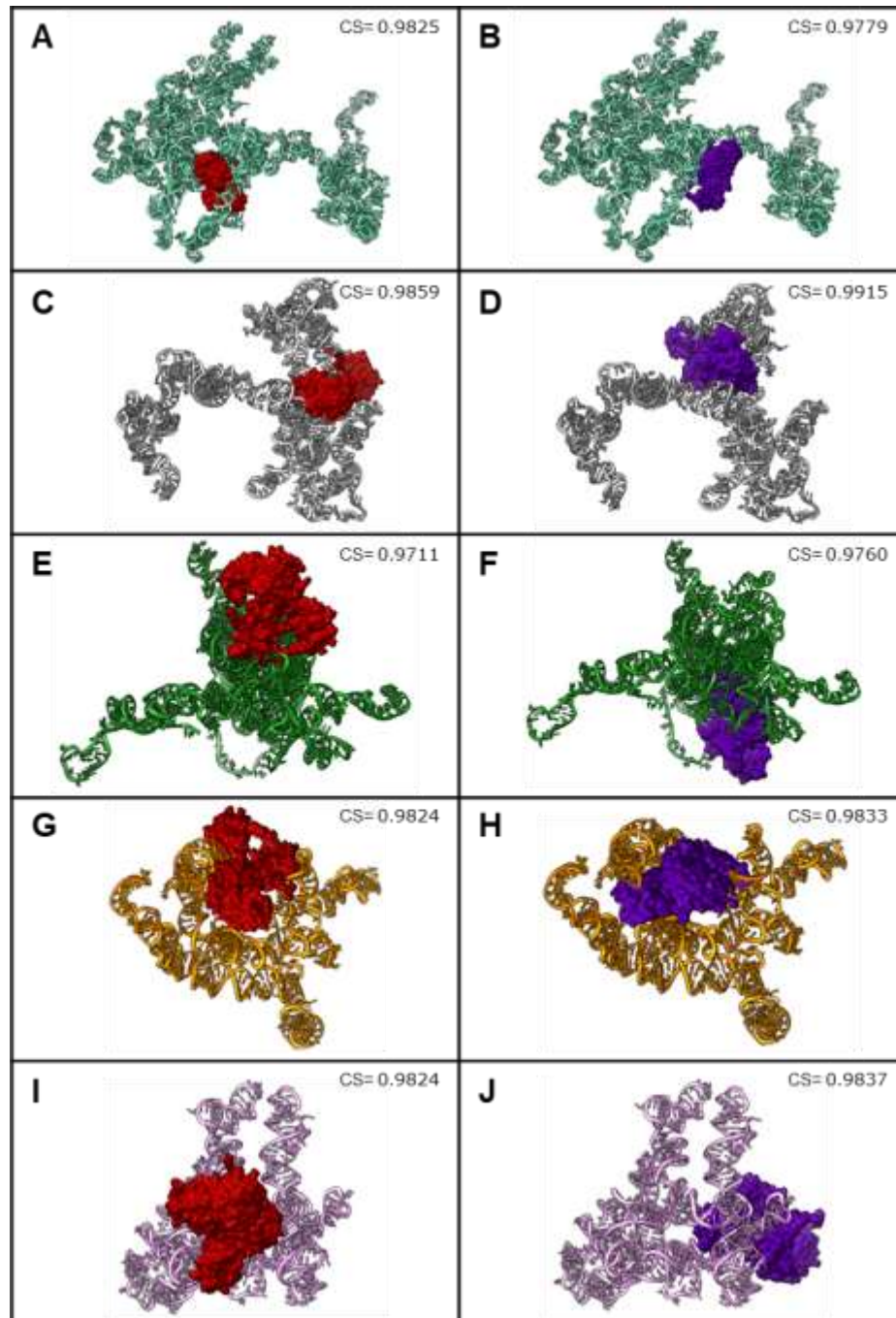


Figura 17. Predicciones del acoplamiento molecular entre los transcritos de *StTCTP*, *AtTCTP1*, *AtTCTP2*, *CmTCTP* y *StBEL5* con las proteínas *PTB1* y *PTB6*. Se obtuvieron las estructuras 3D hipotéticas de las transcripciones de *StTCTP*, *CmTCTP*, *AtTCTP1*, *AtTCTP2* y *StBEL5*. Así como las predicciones de las estructuras

terciarias de las proteínas PTB1 y PTB6. El acoplamiento 3D de cada proteína con las estructuras de los transcritos se calculó de forma independiente con el programa en línea HDock. Las estructuras en rojo y violeta, corresponden a PTB1 y PTB6, respectivamente en todos los casos. Se muestran acoplamientos moleculares hipotéticos entre PTB1 y PTB6 con los transcritos de *StBEL5* (**A y B**), *CmTCTP* (**C y D**), *AtTCTP1* (**E y F**), *AtTCTP2* (**G y H**) y *StTCTP* (**I y J**). El puntaje de confianza de los acoplamientos (SC) se calculó en HDock.

6.6 Modelo del transporte a larga distancia del transcrito de StTCTP y su posible efecto en el fenotipo de los tubérculos y brotes

En este estudio, hemos recopilado evidencia experimental que respalda la hipótesis de que el transcrito de *StTCTP* puede transportarse a largas distancias y desempeñar un papel clave en varios procesos biológicos. Concretamente, hemos observado que la sobreexpresión de *StTCTP* en un sistema de transformación transitoria, promueve las etapas iniciales de la tuberización, induce la acumulación de antocianinas y aumenta el engrosamiento transversal de los brotes emergentes de los tubérculos desarrollados a partir de las plantas agroinfiltradas con el vector que contiene a *StTCTP* fusionado a GFP bajo el control del promotor e35S (Figura 18). Estos resultados respaldan la hipótesis de que *StTCTP* está implicada en procesos de diferenciación celular, particularmente en la propagación vegetativa de la papa.

La implicación de *StTCTP* en estos procesos biológicos, subraya su importancia en la regulación de la biología de las plantas y sugiere que podría ser un objetivo interesante para futuras investigaciones. El conocimiento más profundo de los mecanismos

moleculares en los que StTCTP está involucrado podría tener aplicaciones significativas en campos como la agrobiotecnología, la farmacéutica y la medicina, lo que hace que este estudio sea un paso importante hacia la comprensión completa de las funciones de StTCTP en las plantas.

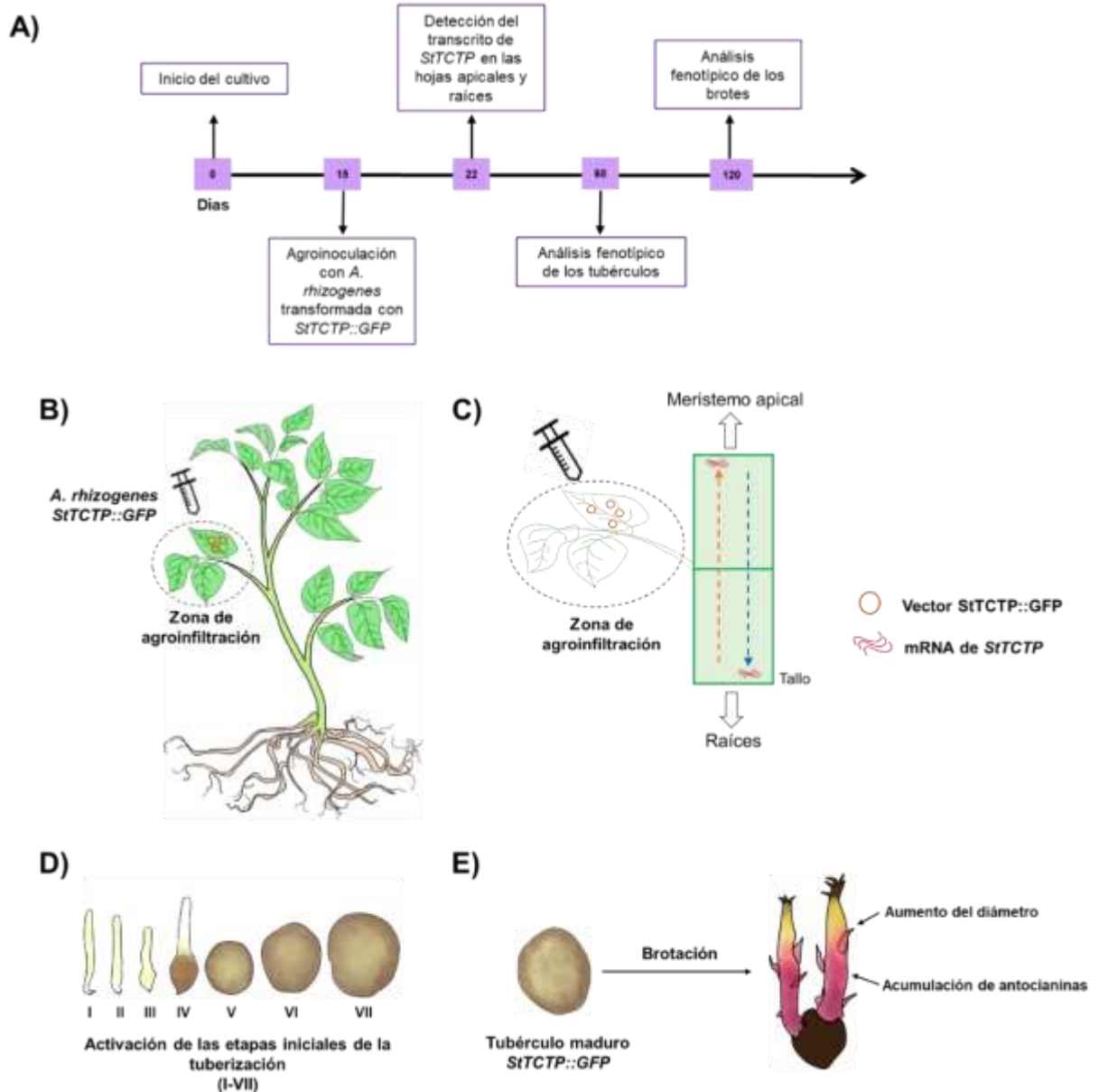


Figura 18. Modelo del transporte a larga distancia del mRNA de *StTCTP*. A) Línea de tiempo que resume los eventos clave de este estudio, mostrando la secuencia, en días, de la transformación transitoria, la investigación sobre el transporte a larga distancia del transcrito de *StTCTP*, el análisis fenotípico de los tubérculos emergentes de las plantas agroinfiltradas y el análisis de los brotes que se desarrollaron a partir de

estos tubérculos. **B)** Representación de la transformación transitoria con *A. rhizogenes* transformada con el vector binario *StTCTP::GFP* por medio de la técnica de agroinfiltración con jeringa de insulina. La zona de agroinfiltración abarca la agroinoculación en tres hojas distales al meristemo apical y raíces. **C)** El mRNA de *StTCTP* tiene la capacidad de transportarse a larga distancia hacia el meristemo apical y raíces, presumiblemente, a través del floema. **D)** *StTCTP* tiene la capacidad de inducir tanto las etapas tempranas de la tuberización, como el desarrollo de tubérculos maduros. **E)** Los tubérculos que se desarrollaron a partir de las plantas agroinoculadas con el vector *StTCTCP::GFP*, fueron incubados hasta la emergencia de los brotes. *StTCTP* promueve el engrosamiento de los brotes en el plano transversal y la acumulación de antocianinas.

7. CONCLUSIONES

- El transcrito de *StTCTP* fusionado a *GFP* se transporta a larga distancia desde las hojas agroinfiltradas hasta las hojas apicales y las raíces.
- El efecto del transcrito recombinante de *StTCTP* provocó cambios en el fenotipo de los tubérculos, manifestando etapas tempranas de la tuberización en las plantas que expresan *StTCTP::GFP* en comparación con el grupo de control.
- El transcrito de *StTCTP* recombinante generó brotes con evidencia de antocianinas con mayor diámetro en los tubérculos emergentes de las plantas que expresan el *ORF* de *StTCTP*, en comparación con las plantas que expresan a *GFP* fusionado a *GUS*.
- Se encontró evidencia de dos plántulas y un estolón en plantas independientes que fueron transformadas transitoriamente con el vector que contiene a *StTCTP* fusionada a *GFP*, en comparación con las plantas control, las cuales no presentaron estas estructuras.
- Se identificó evidencia de una posible interacción entre el mRNA de *StTCTP* y las proteínas PTB1/6, sugiriendo que estas proteínas podrían tener la capacidad de transportar dicho transcrito hacia la parte subterránea de la planta, al tiempo que regulan a *StTCTP*.

8. PERSPECTIVAS

1. Mecanismos de transporte de StTCTP-GFP:

- Profundizar en los mecanismos moleculares que permiten el transporte de StTCTP (transcrito y proteína) a larga distancia en plantas, considerando la existencia de la evidencia previa en otras especies vegetales.
- Comparar y contrastar los procesos de transporte observados en diferentes especies, identificando posibles variaciones y determinando la conservación de estos mecanismos.

2. Impacto agronómico de StTCTP en tubérculos:

- Evaluar de manera más detallada el impacto agronómico de la presencia del transcrito recombinante de *StTCTP* en las etapas tempranas de la tuberización.
- Analizar la aplicabilidad práctica de estos cambios fenotípicos en el desarrollo de tubérculos en el contexto de cultivos agrícolas.

3. Antocianinas y tolerancia a estrés biótico y abiótico:

- Investigar la relación entre la expresión de StTCTP y la acumulación de antocianinas en tubérculos, considerando estudios previos que sugieren este vínculo.
- Examinar las implicaciones antioxidantes de los brotes enriquecidos con antocianinas para determinar su valor en términos de calidad alimentaria.
- Investigar la relación potencial entre la acumulación de antocianinas y la capacidad de la planta para resistir el estrés biótico (por ejemplo, patógenos) y abiótico (como condiciones climáticas adversas). Se pretende entender si

la presencia de antocianinas está asociada a respuestas de defensa y tolerancia.

4. Formación de estructuras adicionales:

- Profundizar en el estudio de la implicación de TCTP en formación de plántulas y estolones.

5. Interacción molecular con proteínas PTB1/6:

- Ampliar la investigación experimental sobre la interacción entre el mRNA de StTCTP y las proteínas PTB1/6.
- Explorar posibles implicaciones de estas interacciones en otras vías de señalización celular y su contribución a la regulación global de la planta.

Estas perspectivas, basadas en la evidencia de transporte de TCTP en otras especies los hallazgos de este proyecto, fortalecen la relevancia y la aplicabilidad del entendimiento de la función de TCTP a nivel general en el reino vegetal.

9. REFERENCIAS

- Amson, R., Pece, S., Lespagnol, A., Vyas, R., Mazzarol, G., Tosoni, D., et al. (2012) Reciprocal repression between P53 and TCTP. *Nat Med* **18**: 91–99.
- Amson, R., Pece, S., Marine, J.-C., Fiore, P.P.D., Telerman, A. (2013) TPT1/ TCTP-regulated pathways in phenotypic reprogramming. *Trends in Cell Biology* **23**: 37–46.
- Banerjee, A.K., Chatterjee, M., Yu, Y., Suh, S.-G., Miller, W.A., Hannapel, D.J. (2007) Dynamics of a Mobile RNA of Potato Involved in a Long-Distance Signaling Pathway. *The Plant Cell* **18**: 3443–3457.
- Berkowitz, O., Jost, R., Pollmann, S., Masle, J. (2009) Characterization of TCTP, the Translationally Controlled Tumor Protein, from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **20**: 3430–3447.
- Betsch, L., Boltz, V., Brioudes, F., Pontier, G., Girard, V., Savarin, J., et al. (2019) TCTP and CSN4 control cell cycle progression and development by regulating CULLIN1 neddylation in plants and animals. *PLoS Genet* **15**: e1007899.
- Bhogale, S., Mahajan, A.S., Natarajan, B., Rajabhoj, M., Thulasiram, H.V., and Banerjee, A.K. (2014) *MicroRNA156*: A Potential Graft-Transmissible MicroRNA That Modulates Plant Architecture and Tuberization in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *Plant Physiology* **164**: 1011–1027.
- Birnbaum, K.D. Alvarado, A.S. (2008) Slicing across Kingdoms: Regeneration in Plants and Animals. *Cell* **132**: 697–710.
- Bommer, U.-A., Borovjagin, A.V., Greagg, M.A., Jeffrey, I.W., Russell, P., Laing, K.G., et al. (2002) The mRNA of the translationally controlled tumor protein *P23/TCTP*

- is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR. *RNA* **8**: 478–496.
- Bommer, U.-A. Thiele, B.-J. (2004) The translationally controlled tumour protein (TCTP). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**: 379–385.
- Branco, R. Masle, J. (2019) Systemic signalling through translationally controlled tumour protein controls lateral root formation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **70**: 3927–3940.
- Brioude, F., Thierry, A.-M., Chambrier, P., Mollereau, B., Bendahmane, M. (2010) Translationally controlled tumor protein is a conserved mitotic growth integrator in animals and plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 16384–16389.
- Bruckner, F.P., Xavier, A.D.S., Cascardo, R.D.S., Otoni, W.C., Zerbini, F.M., Alfenas-Zerbini, P. (2017) Translationally controlled tumour protein (TCTP) from tomato and *Nicotiana benthamiana* is necessary for successful infection by a potyvirus: TCTP is a host factor for potyvirus infection. *Molecular Plant Pathology* **18**: 672–683.
- Calderón-Pérez, B., Xoconostle-Cázares, B., Lira-Carmona, R., Hernández-Rivas, R., Ortega-López, J., Ruiz-Medrano, R. (2014) The *Plasmodium falciparum* Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) Is Incorporated More Efficiently into B Cells than Its Human Homologue. *PLoS ONE* **9**: e85514.
- Cedzich, A., Stransky, H., Schulz, B., Frommer, W.B. (2008) Characterization of Cytokinin and Adenine Transport in *Arabidopsis* Cell Cultures. *Plant Physiol* **148**: 1857–1867.
- Chan, T.H.M., Chen, L., Guan, X.-Y. (2012) Role of Translationally Controlled Tumor Protein in Cancer Progression. *Biochemistry Research International* **2012**: 1–5.

- Chan, T.H.M., Chen, L., Liu, M., Hu, L., Zheng, B., Poon, V.K.-M., et al. (2012) Translationally controlled tumor protein induces mitotic defects and chromosome missegregation in hepatocellular carcinoma development. *Hepatology* **55**: 491–505.
- Chen, S.H., Wu, P.-S., Chou, C.-H., Yan, Y.-T., Liu, H., Weng, S.-Y., Yang-Yen, H.-F. (2007) A Knockout Mouse Approach Reveals that TCTP Functions as an Essential Factor for Cell Proliferation and Survival in a Tissue- or Cell Type-specific Manner. *MBoC* **18**: 2525–2532.
- Chou, M., Xia, C., Feng, Z., Sun, Y., Zhang, D., Zhang, M., et al. (2016) A translationally controlled tumor protein gene *Rpf41* is required for the nodulation of *Robinia pseudoacacia*. *Plant Mol Biol* **90**: 389–402.
- Christianson, M.L. Warnick, D.A. (1983) Competence and determination in the process of in vitro shoot organogenesis. *Developmental Biology* **95**: 288–293.
- Colovos, C. Yeates, T.O. (1993) Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci* **2**: 1511–1519.
- Crookshanks, M., Emmersen, J., Welinder, K.G., Lehmann Nielsen, K. (2001) The potato tuber transcriptome: analysis of 6077 expressed sequence tags. *FEBS Letters* **506**: 123–126.
- De Carvalho, M., Acencio, M.L., Laitz, A.V.N., De Araújo, L.M., De Lara Campos Arcuri, M., Do Nascimento, L.C., Maia, I.G. (2017) Impacts of the overexpression of a tomato translationally controlled tumor protein (TCTP) in tobacco revealed by phenotypic and transcriptomic analysis. *Plant Cell Rep* **36**: 887–900.

- Dhaliwal, H.S., Ramesar-Fortner, N.S., Yeung, E.C., Thorpe, T.A. (2003) Competence, determination, and meristemoid plasticity in tobacco organogenesis in vitro. *Can J Bot* **81**: 611–621.
- Ermolayev, V. (2003) Comparison of AI-induced gene expression in sensitive and tolerant soybean cultivars. *Journal of Experimental Botany* **54**: 2745–2756.
- Fabro, G., Di Rienzo, J.A., Voigt, C.A., Savchenko, T., Dehesh, K., Somerville, S., Alvarez, M.E. (2008) Genome-Wide Expression Profiling Arabidopsis at the Stage of *Golovinomyces cichoracearum* Haustorium Formation. *Plant Physiology* **146**: 1421–1439.
- Fraga, H.P.D.F., Moraes, P.E.C., Vieira, L.D.N., Guerra, M.P. (2023) Somatic Embryogenesis in Conifers: One Clade to Rule Them All? *Plants* **12**: 2648.
- Gachet, Y., Tournier, S., Lee, M., Lazaris-Karatzas, A., Poulton, T., Bommer, U.A. (1999) The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *Journal of Cell Science* **112**: 1257–1271.
- Gaillochet, C. Lohmann, J.U. (2015) The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity. *Development* **142**: 2237–2249.
- Ghabooli, M., Khatabi, B., Ahmadi, F.S., Sepehri, M., Mirzaei, M., Amirkhani, A., et al. (2013) Proteomics study reveals the molecular mechanisms underlying water stress tolerance induced by *Piriformospora indica* in barley. *Journal of Proteomics* **94**: 289–301.
- Glover, B.J. (2000) Differentiation in plant epidermal cells. *Journal of Experimental Botany* **51**: 497–505.

- Gong, L., Zhang, H., Gan, X., Zhang, L., Chen, Y., Nie, F., et al. (2015) Transcriptome Profiling of the Potato (*Solanum tuberosum* L.) Plant under Drought Stress and Water-Stimulus Conditions. *PLoS ONE* **10**: e0128041.
- Gross, B., Gaestel, M., Böhm, H., Bielka, H. (1989) cDNA sequence coding for a translationally controlled human tumor protein. *Nucl Acids Res* **17**: 8367–8367.
- Guo, X. Dong, J. (2022) Protein polarization: Spatiotemporal precisions in cell division and differentiation. *Current Opinion in Plant Biology* **68**: 102257.
- Gutiérrez-Galeano, D.F., Toscano-Morales, R., Calderón-Pérez, B., Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R. (2014) Structural divergence of plant TCTPs. *Front Plant Sci* **5**..
- Hinojosa-Moya, J., Xoconostle-Cázares, B., Piedra-Ibarra, E., Méndez-Tenorio, A., Lucas, W.J., Ruiz-Medrano, R. (2008) Phylogenetic and Structural Analysis of Translationally Controlled Tumor Proteins. *J Mol Evol* **66**: 472–483.
- Hinojosa-Moya, J.J., Xoconostle-Cázares, B., Toscano-Morales, R., Ramírez-Ortega, F., Luis Cabrera-Ponce, J., Ruiz-Medrano, R. (2013) Characterization of the pumpkin Translationally-Controlled Tumor Protein *CmTCTP*. *Plant Signaling & Behavior* **8**: e26477.
- Hochedlinger, K. and Plath, K. (2009) Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* **136**: 509–523.
- Hofacker, I.L. (2003) Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Research* **31**: 3429–3431.
- Hsu, Y.-C., Chern, J.J., Cai, Y., Liu, M., Choi, K.-W. (2007) Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. *Nature* **445**: 785–788.

- Jackson, S.D. (1999) Multiple Signaling Pathways Control Tuber Induction in Potato. *Plant Physiology* **119**: 1–8.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., et al. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**: 583–589.
- Jumper, J. Hassabis, D. (2022) Protein structure predictions to atomic accuracy with AlphaFold. *Nat Methods* **19**: 11–12.
- Khosa, J., Bellinazzo, F., Kamenetsky Goldstein, R., Macknight, R., Immink, R.G.H. (2021) PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE-BINDING PROTEINS: the conductors of dual reproduction in plants with vegetative storage organs. *Journal of Experimental Botany* **72**: 2845–2856.
- Kikuchi, R., Sage-Ono, K., Kamada, H., Ono, M. (2005) Efficient transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* with a ternary plasmid in *Pharbitis nil*. *Plant Biotechnology* **22**: 295–302.
- Kim, M., Jung, Y., Lee, K., Kim, C. (2000) Identification of the calcium binding sites in translationally controlled tumor protein. *Arch Pharm Res* **23**: 633–636.
- Kloosterman, B., Abelenda, J.A., Gomez, M.D.M.C., Oortwijn, M., De Boer, J.M., Kowitzanich, K., et al. (2013) Naturally occurring allele diversity allows potato cultivation in northern latitudes. *Nature* **495**: 246–250.
- Koo, N., Shin, A.-Y., Oh, S., Kim, H., Hong, S., Park, S.-J., et al. (2020) Comprehensive analysis of Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) provides insights for lineage-specific evolution and functional divergence. *PLoS ONE* **15**: e0232029.

- Kumar, R., Maurya, R., Saran, S. (2020) Investigating the Role of Translationally Control Tumor Protein in Growth, Development and Differentiation of *Dictyostelium discoideum*. *Front Cell Dev Biol* **8**: 742.
- Lagunas-Rangel, F.A. (2022) Sequence Analysis and Comparison of TCTP Proteins from Human Protozoan Parasites. *Acta Parasit* **67**: 1024–1031.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* **26**: 283–291.
- Lee, J.-Y. Lee, D.-H. (2003) Use of Serial Analysis of Gene Expression Technology to Reveal Changes in Gene Expression in Arabidopsis Pollen Undergoing Cold Stress. *Plant Physiology* **132**: 517–529.
- Liao, M., Li, Y., Wang, Z. (2009) Identification of elicitor-responsive proteins in rice leaves by a proteomic approach. *Proteomics* **9**: 2809–2819.
- Lin, T., Sharma, P., Gonzalez, D.H., Viola, I.L., Hannapel, D.J. (2013) The Impact of the Long-Distance Transport of a *BEL1* -Like Messenger RNA on Development. *Plant Physiology* **161**: 760–772.
- Liu, H., Peng, H.-W., Cheng, Y.-S., Yuan, H.S., Yang-Yen, H.-F. (2005) Stabilization and Enhancement of the Antiapoptotic Activity of Mcl-1 by TCTP. *Molecular and Cellular Biology* **25**: 3117–3126.
- Liu, W., Liu, Q., Zhang, B., Lin, Z., Li, X., Yang, X., et al. (2020) The mRNA of TCTP functions as a sponge to maintain homeostasis of TCTP protein levels in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis* **11**: 974.
- Lüthy, R., Bowie, J.U., Eisenberg, D. (1992) Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* **356**: 83–85.

- Martin, A., Adam, H., Díaz-Mendoza, M., Żurczak, M., González-Schain, N.D., Suárez-López, P. (2009) Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA *miR172*. *Development* **136**: 2873–2881.
- Melnyk, C.W. (2017) Plant grafting: insights into tissue regeneration. *Regeneration* **4**: 3–14.
- Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C., Robaglia, C. (2002) Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 6422–6427.
- Mostek, A., Börner, A., Badowiec, A., Weidner, S. (2015) Alterations in root proteome of salt-sensitive and tolerant barley lines under salt stress conditions. *Journal of Plant Physiology* **174**: 166–176.
- Naing, A.H. Kim, C.K. (2021) Abiotic stress-induced anthocyanins in plants: Their role in tolerance to abiotic stresses. *Physiologia Plantarum* **172**: 1711–1723.
- Navarro, C., Abelenda, J.A., Cruz-Oró, E., Cuéllar, C.A., Tamaki, S., Silva, J., et al. (2011) Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. *Nature* **478**: 119–122.
- Notaguchi, M., Wolf, S., Lucas, W.J. (2012) Phloem-mobile Aux/IAA transcripts target to the root tip and modify root architecture. *J Integr Plant Biol* **54**: 760–772.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E. (2004) UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**: 1605–1612.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Meng, E.C., Couch, G.S., Croll, T.I., et al. (2021) UCSF CHIMERAX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science* **30**: 70–82.

- Qin, X., Gao, F., Zhang, J., Gao, J., Lin, S., Wang, Y., et al. (2011) Molecular cloning, characterization and expression of cDNA encoding translationally controlled tumor protein (TCTP) from *Jatropha curcas* L. *Mol Biol Rep* **38**: 3107–3112.
- Rinnerthaler, M., Jarolim, S., Heeren, G., Palle, E., Perju, S., Klinger, H., et al. (2006) MMI1 (YKL056c, TMA19), the yeast orthologue of the translationally controlled tumor protein (TCTP) has apoptotic functions and interacts with both microtubules and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1757**: 631–638.
- Rodriguez-Medina, C., Atkins, C.A., Mann, A.J., Jordan, M.E., Smith, P.M. (2011) Macromolecular composition of phloem exudate from white lupin (*Lupinus albus*L.). *BMC Plant Biol* **11**: 36.
- Roumeliotis, E. (2012) Physiology of tuber development and stolon architecture, Wageningen: Wageningen University: 80
- Shan, J., Song, W., Zhou, J., Wang, X., Xie, C., Gao, X., et al. (2013) Transcriptome analysis reveals novel genes potentially involved in photoperiodic tuberization in potato. *Genomics* **102**: 388–396.
- Shao, W. Dong, J. (2016) Polarity in plant asymmetric cell division: Division orientation and cell fate differentiation. *Developmental Biology* **419**: 121–131.
- Sharma, P., Lin, T., Hannapel, D.J. (2016) Targets of the *StBEL5* Transcription Factor Include the FT Ortholog *StSP6A*. *Plant Physiol* **170**: 310–324.
- Shuvo, M.H., Gulfam, M., Bhattacharya, D. (2021) DeepRefiner: high-accuracy protein structure refinement by deep network calibration. *Nucleic Acids Research* **49**: W147–W152.

- Spooner, D.M., McLean, K., Ramsay, G., Waugh, R., Bryan, G.J. (2005) A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 14694–14699.
- Spooner, D.M., Núñez, J., Trujillo, G., Del Rosario Herrera, M., Guzmán, F., Ghislain, M. (2007) Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 19398–19403.
- Stange, L. (1964) Regeneration in Lower Plants. In *Advances in Morphogenesis*. Elsevier, pp. 111–153.
- Tada, M. (2021) The morphogenetic changes that lead to cell extrusion in development and cell competition. *Developmental Biology* **477**: 1–10.
- Thaw, P., Baxter, N.J., Hounslow, A.M., Price, C., Waltho, J.P., Craven, C.J. (2001) [No title found]. *Nat Struct Biol* **8**: 701–704.
- Thébault, S., Agez, M., Chi, X., Stojko, J., Cura, V., Telerman, S.B., et al. (2016) TCTP contains a BH3-like domain, which instead of inhibiting, activates Bcl-xL. *Sci Rep* **6**: 19725.
- Thiele, H., Berger, M., Skalweit, A., Thiele, B.-J. (2000) Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled tumour protein (TCTP): TPT1 gene expression. *European Journal of Biochemistry* **267**: 5473–5481.
- Thieme, C.J., Rojas-Triana, M., Stecyk, E., Schudoma, C., Zhang, W., Yang, L., et al. (2015) Endogenous Arabidopsis messenger RNAs transported to distant tissues. *Nature Plants* **1**: 15025.

- Thompson, D.S. (2007) Space and Time in the Plant Cell Wall: Relationships between Cell Type, Cell Wall Rheology and Cell Function. *Annals of Botany* **101**: 203–211.
- Tiwari, J.K., Devi, S., Sundaresha, S., Chandel, P., Ali, N., Singh, B., et al. (2015) Microarray analysis of gene expression patterns in the leaf during potato tuberization in the potato somatic hybrid *Solanum tuberosum* and *Solanum tuberosum*. *Genome* **58**: 305–313.
- Toscano-Morales, R., Xoconostle-Cázares, B., Cabrera-Ponce, J.L., Hinojosa-Moya, J., Ruiz-Salas, J.L., Galván-Gordillo, S.V., et al. (2015) AtTCTP2, an Arabidopsis thaliana homolog of Translationally Controlled Tumor Protein, enhances in vitro plant regeneration. *Front Plant Sci* **6**:
- Toscano-Morales, R., Xoconostle-Cázares, B., Martínez-Navarro, A.C., Ruiz-Medrano, R. (2014) Long distance movement of an Arabidopsis Translationally Controlled Tumor Protein (AtTCTP2) mRNA and protein in tobacco. *Front Plant Sci* **5**:
- Valencia-Lozano, E., Herrera-Isidró, L., Flores-López, J.A., Recoder-Meléndez, O.S., Barraza, A., Cabrera-Ponce, J.L. (2022) *Solanum tuberosum* Microtuber Development under Darkness Unveiled through RNAseq Transcriptomic Analysis. *IJMS* **23**: 13835.
- Venugopal, T. (2005) Evolution and expression of Translationally Controlled Tumour Protein (TCTP) of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **142**: 8–17.

- Verdeil, J., Alemanno, L., Niemenak, N., and Tranbarger, T. (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends in Plant Science* **12**: 245–252.
- Vernoux, T. Benfey, P.N. (2005) Signals that regulate stem cell activity during plant development. *Current Opinion in Genetics & Development* **15**: 388–394.
- Wadley, L.M., Keating, K.S., Duarte, C.M., Pyle, A.M. (2007) Evaluating and Learning from RNA Pseudotorsional Space: Quantitative Validation of a Reduced Representation for RNA Structure. *Journal of Molecular Biology* **372**: 942–957.
- Weeda, S.M., Mohan Kumar, G.N., Richard Knowles, N. (2009) Developmentally linked changes in proteases and protease inhibitors suggest a role for potato multicystatin in regulating protein content of potato tubers. *Planta* **230**: 73–84.
- Williams, C.J., Headd, J.J., Moriarty, N.W., Prisant, M.G., Videau, L.L., Deis, L.N., et al. (2018) MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation: PROTEIN SCIENCE.ORG. *Protein Science* **27**: 293–315.
- Xu, Xin, Van Lammeren, A.A.M., Vermeer, E., Vreugdenhil, D. (1998) The Role of Gibberellin, Abscisic Acid, and Sucrose in the Regulation of Potato Tuber Formation in Vitro¹. *Plant Physiology* **117**: 575–584.
- Xu, X., Vreugdenhil, D., Lammeren, A.A.M.V. (1998) Cell division and cell enlargement during potato tuber formation. *Journal of Experimental Botany* **49**: 573–582.
- Yan, Y., Tao, H., He, J., Huang, S.-Y. (2020) The HDock server for integrated protein–protein docking. *Nat Protoc* **15**: 1829–1852.
- Yan, Y., Zhang, D., Zhou, P., Li, B., Huang, S.-Y. (2017) HDock: a web server for protein–protein and protein–DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. *Nucleic Acids Research* **45**: W365–W373.

- Yang, L., Perrera, V., Saplaoura, E., Apelt, F., Bahin, M., Kramdi, A., et al. (2019) m5C Methylation Guides Systemic Transport of Messenger RNA over Graft Junctions in Plants. *Current Biology* **29**: 2465-2476.e5.
- Yang, Y., Yang, F., Xiong, Z., Yan, Y., Wang, X., Nishino, M., et al. (2005) An N-terminal region of translationally controlled tumor protein is required for its antiapoptotic activity. *Oncogene* **24**: 4778–4788.
- Zhang, Y. Dong, J. (2018) Cell polarity: compassing cell division and differentiation in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **45**: 127–135.
- Zhang, Y., Wang, J., Xiao, Y. (2022) 3dRNA: 3D Structure Prediction from Linear to Circular RNAs. *Journal of Molecular Biology* **434**: 167452.
- Zhang, Y., Xiong, Y., Xiao, Y. (2022) 3dDNA: A Computational Method of Building DNA 3D Structures. *Molecules* **27**: 5936.
- Zhang, Z., Zheng, Y., Ham, B.-K., Chen, J., Yoshida, A., Kochian, L.V., et al. (2016) Vascular-mediated signalling involved in early phosphate stress response in plants. *Nature Plants* **2**: 16033.