

**Rol de la proteína BBX21 en plantas de *Arabidopsis thaliana* y papa (*Solanum tuberosum*) creciendo bajo diferentes condiciones de estrés**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias*

**Jorge Gabriel Gómez Ocampo**

Ingeniero Agrónomo - Universidad de Buenos Aires - 2015

Lugar de trabajo: IFEVA – Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



**FAUBA**

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano  
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



## COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

**Javier Francisco Botto**

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Codirector

**Carlos Daniel Crocco**

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Consejero de estudios

**Edmundo Leonardo Ploschuk**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Magister Scientiae en Producción Vegetal (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

## JURADO DE TESIS

JURADO

**Paula Casati**

Licenciada en Biotecnología (Universidad Nacional de Rosario)

Doctora (Universidad Nacional de Rosario)

JURADO

**Sergio Enrique Feingold**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

**Gabriela Toledo-Ortiz**

Licenciada en Ciencias Químicas (Universidad Nacional Autónoma de México)

Doctora (Universidad de California)

Fecha de defensa de la tesis: 25 de abril de 2023

*“If you want your children to be intelligent,  
read them fairy tales. If you want them to be more  
intelligent, read them more fairy tales.”  
Hans Albert Einstein.*

*Esta tesis está dedicada a Gael, que cedió tiempo de juegos y lectura para que esta  
tesis pudiera llegar a su fin.  
A vos y a Juli, los amo.*

## Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a mi comité consejero de tesis. A mi director, Javier, por darme la posibilidad de mejorar día a día en el ámbito científico y por todos los aportes y consejos en la parte final de la tesis, donde trabajamos muchas horas a la par. A Carlos Crocco, por trabajar al lado mío siempre que los experimentos así lo requerían. Por último, a Edy Ploschuk, por hacer amenas las largas jornadas de medición de fotosíntesis, siempre hablando de comida y de nuestro querido club BOCA JUNIORS.

A la Universidad de Buenos Aires, por formarme como profesional y como persona.

A mis compañeros del labo grande. Los que están ahora y los que se fueron. Los Casalitos: Romi gracias por darme siempre una mano con todo lo que necesito; Pipa por prestarme los filtros verdes y hacerme un lugarcito en el módulo siempre que estaba necesitado de espacio; a Belu B. por los macarons y toda la comida sin TACC que me hiciste probar en estos años; a Eze por llevarme a entrenar a Suyai un día a las 7 de la mañana y por todos los mates que te robé; a Belu Delu por hacerme reír cuando me peleas, anda preparándote para que te haga muuuuuchas preguntas sobre tomate. A Marianita y Sofi por los almuerzos y afters compartidos.

Del grupo Botto: A Maite y Taichi que fueron las primeras en recibirme y me guiaron cuando estaba un poco perdido con las Arabidopsis; a Danielito que fue con quien mas tiempo compartí, ya que empezamos juntos el doctorado y la beca, y compartimos cursos y muchas horas en el labo, me debés unas vacaciones en la casa de campo de Perú o en el hotel en la playa en Costa Rica; a Jime, fuiste la última en entrar al labo, pero terminaste siendo con la que más tiempo terminé trabajando con siembras interminables en el flujo, y seguramente seguiremos colaborando cuando seas investigadora asistente y me metas en tus proyectos.

A mi familia que siempre está ahí bancándome en todas: Para mis viejos (en especial para mi vieja que quería un hijo doctor, aunque creo que se refería a otro tipo de doctor), mis hermanos, mis sobrinos, a Gaelito que me hace levantar con una sonrisa desde muuuuy temprano, y a Juli por acompañarme en todo este camino.

A todos ustedes les agradezco de corazón.



*Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución.*

Ing. Agr. Jorge Gabriel Gómez Ocampo

## PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS.

**Artículos Académicos**

Crocco C.D.\*, **Gómez-Ocampo G.\***, Ploschuk E.L., Mantese A., Botto J.F. (2018). Heterologous expression of *AtBBX21* enhances the rate of photosynthesis and alleviates photoinhibition in *Solanum tuberosum*. *Plant Physiology* **177**: 369–380.

**Gómez-Ocampo G.**, Ploschuk E.L., Mantese A., Crocco C.D., Botto J.F. (2021). BBX21 reduces abscisic acid sensitivity, mesophyll conductance and chloroplast electron transport capacity to increase photosynthesis and water use efficiency in potato plants cultivated under moderated drought. *The Plant Journal* 108, 1131–1144.

\*Ambos autores contribuyeron de igual manera.

## ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria.....	III
Agradecimientos .....	IV
PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS.....	VI
ÍNDICE GENERAL .....	VII
ÍNDICE DE CUADROS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMEN .....	XV
ABSTRACT.....	XVII
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....	1
Fotorreceptores en las plantas.....	2
Factores de transcripción B-BOX (BBX).....	6
Respuesta de escape al sombreado.....	7
Hormonas y respuestas de escape al sombreado.....	9
Estrés hídrico en plantas .....	11
Estrés hídrico y fotosíntesis .....	12
El cultivo de papa.....	14
Estrés hídrico en papa.....	16
Estrategias biotecnológicas para el aumento de los rendimientos de los cultivos .....	17
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	18
Objetivos .....	18
Hipótesis .....	19
Estructura de la tesis .....	20
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
Material vegetal .....	21
Sección I: Evaluación de la respuesta de BBX21 a los brasinosteroides en la inhibición del crecimiento en ambientes sombreados en plántulas de <i>A. thaliana</i> .....	21
Condiciones de crecimiento y tratamientos de luz.....	21
Experimentos hormonales.....	22
Cuantificación de brasinoesteroides.....	22
Análisis transcriptómico .....	23
Cuantificación de expresión génica por RT-qPCR .....	23

Sección II: Caracterización de la morfología y fisiología de plantas de <i>A. thaliana</i> y de <i>S. tuberosum</i> sobreexpresantes de <i>BBX21</i> creciendo en condiciones óptimas. ....	24
Condiciones de crecimiento y diseño experimental.....	24
Determinaciones anatómicas y morfológicas.....	24
Determinaciones de clorofila, antocianinas y fenoles.....	25
Mediciones de fotosíntesis, transpiración y conductancia estomática.....	25
Análisis de expresión génica.....	26
Sección III: Estudio del comportamiento de las plantas de <i>S. tuberosum</i> sobreexpresantes de <i>BBX21</i> creciendo en ambientes con riegos restringidos. ....	26
Condiciones experimentales para evaluar el crecimiento vegetativo en restricción hídrica.....	26
Condiciones de crecimiento para evaluar el rendimiento de tubérculos en restricción hídrica.....	27
Determinaciones morfológicas en condiciones de restricción hídrica.....	27
Determinaciones de clorofila, antocianinas y fenoles.....	27
Mediciones de fotosíntesis, transpiración y conductancia estomática.....	27
Conductancia del mesófilo y parámetros no estomáticos.....	28
Bioensayos de ABA en hojas cortadas y en planta entera.....	29
Determinaciones de ABA.....	29
Preparación y secuenciación de la biblioteca de secuencias de ARNm.....	31
Análisis de RNA-seq y expresión de qRT-PCR.....	32
CAPITULO 3: RESULTADOS.....	37
Sección I: <i>BBX21</i> inhibe el crecimiento en sombra en plántulas de <i>A. thaliana</i> a través de la vía de señalización de brasinoesteroides. ....	37
El mutante <i>bbx21</i> imita el fenotipo Ler en sombra con el inhibidor de BR.....	38
Col-0 y Ler imitan el fenotipo de hipocótilo del mutante <i>bbx21-1</i> y <i>bbx21-2</i> con agregado de <i>24-epiBL</i> exógeno bajo condiciones de sombra.....	39
<i>BBX21</i> inhibe la síntesis de BR activos e intermediarios, bajo luz blanca y sombra.....	42
<i>BBX21</i> inhibe los genes de biosíntesis <i>DWF4</i> , <i>BR6OX1</i> y <i>BR6OX2</i> .....	45
La señalización de <i>BBX21</i> , <i>BZR1</i> y <i>PIF4</i> corregula la expresión génica bajo sombra.....	47
La expresión de genes de señalización de BR no es controlada por <i>BBX21</i> en tiempos cortos de exposición a la sombra.....	51
<i>BBX21</i> y <i>BZR1</i> actúan de manera interdependiente en el control del largo del hipocótilo bajo sombra.....	52
Sección II: Efecto de la sobreexpresión del gen <i>BBX21</i> en plantas de <i>A. thaliana</i> y papa.....	55
Caracterización morfológica de plantas mutantes nulas y sobreexpresantes del gen <i>BBX21</i> en plantas de <i>A. thaliana</i> .....	55

La sobreexpresión de <i>BBX21</i> promueve la acumulación de antocianinas y fenoles en Arabidopsis .....	57
La sobreexpresión de <i>BBX21</i> promueve la fotosíntesis en Arabidopsis .....	58
La sobreexpresión de <i>BBX21</i> promueve la vasculatura del tallo y el engrosamiento de las hojas de papa .....	60
La sobreexpresión de <i>BBX21</i> aumenta el rendimiento de tubérculos de papa.....	63
La sobreexpresión de <i>BBX21</i> aumenta la tasa de fotosíntesis en plantas de papa .....	65
La sobreexpresión de <i>BBX21</i> aumenta la apertura estomática en hojas de papa .....	67
La sobreexpresión de <i>BBX21</i> promueve la expresión génica y los metabolitos de la vía de los fenilpropanoides en plantas de papa. ....	69
La sobreexpresión de <i>BBX21</i> reduce la fotoinhibición del fotosistema II en plantas de papa.....	70
Sección III: Efecto de la sobreexpresión de <i>BBX21</i> en plantas de papa creciendo bajo restricción hídrica .....	72
Las plantas de papa <i>BBX21-OE</i> son tolerantes a la sequía .....	72
Las plantas de papa <i>BBX21-OE</i> producen mayor fotosíntesis bajo restricción hídrica .....	74
Las plantas de papa <i>BBX21-OE</i> son menos sensibles a la fotoinhibición durante las primeras horas de la mañana bajo restricción hídrica .....	77
Las plantas <i>BBX21-OE</i> tienen mayor difusión de CO <sub>2</sub> al cloroplasto bajo restricción hídrica..	78
Las plantas <i>BBX21-OE</i> tienen mayor afinidad bioquímica para la fotosíntesis bajo restricción hídrica .....	80
Las plantas de papa <i>BBX21-OE</i> son menos sensibles al ABA bajo restricción hídrica.....	83
Las plantas de papa <i>BBX21-OE</i> tienen mayor rendimiento de tubérculos bajo restricción hídrica .....	86
<i>BBX21</i> regula la expresión de factores de transcripción, acuaporinas y genes de fotosíntesis bajo restricción hídrica.....	88
CAPITULO 4: DISCUSIÓN .....	92
<i>BBX21</i> inhibe el crecimiento en sombra en plántulas de <i>A. thaliana</i> a través de los brasinoesteroides.....	94
Efecto de la sobreexpresión del gen <i>BBX21</i> en plantas de <i>A. thaliana</i> y papa .....	98
Efecto de la sobreexpresión de <i>BBX21</i> en plantas de papa creciendo bajo restricción hídrica....	101
CAPITULO 5: CONCLUSIONES GENERALES .....	106
Cumplimiento de objetivos y verificación de hipótesis .....	108
Futuras líneas de investigación .....	111
BIBLIOGRAFÍA .....	113
FIGURAS SUPLEMENTARIAS .....	136

Figura suplementaria 1: Ruta biosintética simplificada de brasinoesteroides, indicando las enzimas implicadas en cada una de las reacciones (adaptado de Zhao y Li, 2012).....	136
CUADROS SUPLEMENTARIOS .....	137

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Primers usados para la cuantificación de genes en plantas de Arabidopsis y papa.....	32
Cuadro 2: Gen ID de los genes usados en esta tesis.....	35
Cuadro S3.1: Objetivos de BZR y genes que son regulados por BBX21 bajo sombra. ....	138
Cuadro S3.2: Objetivos de BZR1 (con regulación de brasinoesteroides), objetivos de PIF4 y genes regulados por BBX21 en sombra. ....	139
Cuadro S3.3: Objetivos de BZR1 (sin regulación de brasinoesteroides) y genes regulados por BBX21 en sombra.....	140
Cuadro S3.4: Objetivos de BZR1 (sin regulación de brasinoesteroides) objetivos de PIF4 y genes regulados por BBX21 en sombra. ....	141
Cuadro S3.5: Objetivos de unión a PIF4 que están regulados por PIF y genes que son regulados por BBX21 en sombra (41 genes).....	142
Cuadro S3.6: Genes regulados positivamente en restricción hídrica expresados diferencialmente en plantas Spunta. ....	145
Cuadro S3.7: Genes regulados negativamente en restricción hídrica expresados diferencialmente en plantas Spunta. ....	163
Cuadro S3.8: Genes regulados negativamente expresados diferencialmente en restricción hídrica entre plantas Spunta y <i>BBX21-OE</i> (Cluster 1). ....	198
Cuadro S3.9: Genes regulados positivamente expresados diferencialmente en restricción hídrica entre plantas Spunta y <i>BBX21-OE</i> (Cluster 1). ....	209
Cuadro S3.10: Genes regulados negativamente expresados diferencialmente en restricción hídrica entre plantas Spunta y <i>BBX21-OE</i> (Cluster 2). ....	210

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Representación esquemática de los factores bióticos y abióticos que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas. ....1

Figura 1.2: Representación esquemática del espectro lumínico y los fotorreceptores específicos para cada longitud de onda. ....3

Figura 1.3: Fotoconversión del fitocromo entre la forma inactiva (Pr) y la forma activa (Pfr). ....5

Figura 1.4 Descripción general del síndrome de escape al sombreado. ....8

Figura 1.5: Vía de señalización de brasinoesteroides (BR). ....10

Figura 1.6: Efectos del déficit hídrico sobre la fisiología de las plantas. ....13

Figura 1.7: Esquema de la planta de papa. ....15

Figura 3.1: Largo del hipocótilo para plántulas Ler y *bbx21-2* en luz blanca y sombra con inhibidores sintéticos de auxina (NPA), giberelina (PAC) y brasinoesteroides (BZR). ....39

Figura 3.2: Curvas de respuesta a diferentes dosis de BZR y 24-*epiBL* en plántulas de Ler y *bbx21-2* y de Col-0 y *bbx21-1* creciendo durante 5 días en luz blanca y sombra. ....40

Figura 3.3: Fotografías de plántulas de Col-0 y *bbx21-1* expuestas a diferentes dosis de 24-*epiBL* y BZR, y crecidas en sombra durante 5 días. ....41

Figura 3.4: Largo de hipocótilo de Col-0 y la línea sobreexpresante 35S:BBX21-YFP bajo luz blanca, sombra y sombra + 24-*epiBL* 1  $\mu$ M. ....42

Figura 3.5: Contenido de BR activo en plántulas Col-0 y *bbx21-1* creciendo bajo luz blanca y sombra durante 5 días. ....43

Figura 3.6: Precursores de la síntesis de BR en plántulas Col-0 y *bbx21-1* creciendo bajo luz blanca y sombra durante 5 días. ....44

Figura 3.7: Precursores de la síntesis de BR en plántulas Col-0 y *bbx21-1* creciendo bajo luz blanca y sombra durante 5 días. ....45

Figura 3.8: Expresión génica relativa medida por qRT-PCR de *DWF4*, *BR6OX1* y *BR6OX2*. ....46

Figura 3.9: Expresión génica relativa medida por qRT-PCR de *DWF4*, *BR6OX1* y *BR6OX2*. ....46

Figura 3.10: a) Análisis comparativo entre los transcriptomas de BZR1 (Bai et al., 2012), BBX21 en sombra (Crocco et al., 2010) y PIF4 (Oh et al., 2012). ....49

Figura 3.11: Expresión de genes corregulados por BBX21 en sombra, BZR y/o PIF4. ....51

Figura 3.12: Expresión génica medida por qRT-PCR de *BZR1*, *PRE5* y *ARL*. ....52

Figura 3.13: Largo del hipocótilo de plántulas Col, *bbx21-1*, *bzr1-D* y *bbx21 bzr1-D*. ....53

Figura 3.14: Expresión génica medida por qRT-PCR de *PIL1*, *ATHB2* y *HFR1*. ....54

Figura 3.15: Características fenotípicas de plantas mutantes *bbx21-1* en *A. thaliana*. ....56

Figura 3.16: Características fenotípicas de plantas sobreexpresantes de *BBX21* en *A. thaliana*. ....57

Figura 3.17: Contenido de metabolitos y expresión de genes asociados a su síntesis en plantas *BBX21-OE* y mutante *bbx21-1*. ....58

Figura 3.18: Medición de parámetros relacionados con la fotosíntesis y genes asociados en plantas *BBX21-OE* de *A. thaliana*. ....60

Figura 3.19: Caracterización anatómica del tallo de las líneas CH2 y CH13. ....62

Figura 3.20: Caracterización anatómica de la hoja de la línea CH2. ....63

Figura 3.21: Caracterización del rendimiento de las plantas de la línea CH2. ....64

Figura 3.22: Fotos representativas de cortes transversales de tubérculos. ....65

Figura 3.23: Medición de parámetros relacionados con la fotosíntesis y de la expresión de genes asociados en plantas de las líneas CH2 y CH13. ....	66
Figura 3.24: Caracterización de los estomas de las plantas de la línea CH2. ....	68
Figura 3.25: Caracterización de los genes y metabolitos de la vía de los fenilpropanoides en hojas de plantas de papa de las líneas CH2 y CH13.....	70
Figura 3.26: Eficiencia fotoquímica máxima (Fv/Fm). ....	71
Figura 3.27: Diagrama del diseño experimental y caracterización morfológica y de pigmentos en plantas de las líneas CH2 y CH13 creciendo bajo distintos regímenes hídricos.....	73
Figura 3.28: Fotos representativas de plantas de papa Spunta y <i>BBX21-OE</i> (CH2) de 42 días de edad bien regadas y en restricción hídrica moderada.....	74
Figura 3.29: Medición de parámetros relacionados con la fotosíntesis y de expresión de genes asociados en plantas de las líneas CH2 y CH13 creciendo bajo distintos regímenes hídricos. ....	76
Figura 3.30: Marcha diaria de los parámetros relacionados con la fotosíntesis en plantas de la línea CH2 creciendo bajo distintos regímenes hídricos.....	78
Figura 3.31: Tasa de fotosíntesis en función de Cc en plantas de la línea CH2 creciendo bajo distintos regímenes hídricos.....	79
Figura 3.32: Medición de la fotosíntesis neta en función de la concentración de CO <sub>2</sub> en el cloroplasto y estimación de la conductancia del mesófilo en plantas de la línea CH2 creciendo bajo distintos regímenes hídricos.....	81
Figura 3.33: Mediciones empíricas de la tasa máxima de transporte de electrones fotosintéticos (Jmax). ....	82
Figura 3.34: Tasa de fotosíntesis en función de la concentración interna de CO <sub>2</sub> en la cámara estomática (Ci) a las 9 am. ....	82
Figura 3.35: Bioensayo de sensibilidad al ácido abscísico (ABA) en hoja cortada en plantas de la línea CH2 y CH13, contenido de ABA en plantas de la línea CH2 creciendo bajo distintos regímenes hídricos. ....	84
Figura 3.36: Bioensayo de sensibilidad al ABA en planta entera en plantas de la línea CH2 y CH13. ....	85
Figura 3.37: Caracterización del rendimiento de las plantas de la línea CH2 y CH13 creciendo bajo distintos regímenes hídricos.....	87
Figura 3.38: Transcriptoma de genes regulados por BBX21 en sequía. ....	90
Figura 3.39: Cuantificación de la expresión de genes diferencialmente expresados entre tratamientos de riego en plantas Spunta y <i>BBX21-OE</i> mediante qRT-PCR, como validación de resultados del análisis RNAseq.....	91



## ABREVIATURAS

24- <i>epi</i> BL	24- epibrasinolide
28-homoCS	28-homo castasterona
28-norCS	28-nor castasterona
6-deoxo-3-DT	3-deshidro-6-deoxoteasterona
6-deoxotifasterol	6-deoxoTY
6-oxoCN	6-oxo campestanol
ABA	ácido abscísico
BBX	proteínas B-box
BBX21-OE	plantas sobreexpresantes de BBX21
BL	epibrasinolide
BR	brasinoesteroides
BZR	brassinazole
Cc	concentración de CO <sub>2</sub> en el cloroplasto
Ci	concentración interna de CO <sub>2</sub> de la cámara subestomática
CN	campestanol
Col-0	ecotipo Columbia-0 de <i>A. thaliana</i>
COP1	CONSTITUTIVE PHOTOMOPHOGENIC 1
CR	campesterol
cry	criptocromo
CS	castasterona
EUA	eficiencia de uso instantáneo del agua
Fv/Fm	eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II
GA	giberelinas
gm	conductancia del mesófilo
homoBL	28-homobrasinolide
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HY5	ELONGATED HYPOCOTYL 5
J	tasa de transporte de electrones
J <sub>max</sub>	tasa máxima de transporte de electrones fotosintéticos
Ler	ecotipo Landsberg <i>erecta</i> de <i>A. thaliana</i>
NPA	ácido naftil-talámico
PAC	paclobutrazol
PAR	radiación fotosintéticamente activa
Pfr	fitocromo en su forma activa
phot	fototropina
PHY	fitocromo
PPFD	densidad de flujo de fotones fotosintéticos
Pr	fitocromo en su forma inactiva

PSII	fotosistema II
R	luz correspondiente a las longitudes de onda del rojo (600-700 nm)
RL	luz correspondiente a las longitudes de onda del rojo lejano (700-800 nm)
ROS	especies reactivas de oxígeno
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
SAS	respuestas de escape al sombreado ( <i>Shade Avoidance Syndrome</i> )
TS	teasterona
TY	tifasterol
V <sub>c</sub> max	la tasa máxima de actividad carboxilasa de Rubisco
WT	<i>wild-type</i>
Ψ <sub>a</sub>	potencial agua

## RESUMEN

Las proteínas B-box (BBX) son factores de transcripción del tipo dedos de zinc que contienen uno o dos motivos del tipo B-box. El objetivo principal de esta tesis es elucidar el rol de las proteínas BBX21 en la regulación del crecimiento y desarrollo, tanto en el estadio de plántula como en plantas adultas, en respuesta a diferentes condiciones ambientales. El primer objetivo particular consistió en evaluar los mecanismos de BBX21 que inhiben el crecimiento de los hipocótilos en plántulas de *Arabidopsis thaliana* en ambientes sombreados. Se realizaron ensayos genéticos, fisiológicos, estudios de perfil hormonal y análisis de expresión génica. Los resultados obtenidos vinculan la actividad de BBX21 sobre la vía de la biosíntesis y la señalización de los BR. El segundo objetivo particular consistió en la caracterización morfológica, anatómica, bioquímica y fisiológica de plantas sobreexpresantes de *BBX21* de *A. thaliana* y de *Solanum tuberosum* (papa) cultivadas en macetas con recursos ilimitados. Los resultados demuestran que las plantas que sobreexpresan *BBX21* son más robustas y tienen tasas de fotosíntesis más elevadas aumentando 15% el rendimiento de los tubérculos. Además, las plantas sobreexpresantes producen más pigmentos fotoprotectores que reducen los efectos de fotoinhibición. El tercer objetivo particular fue analizar el comportamiento de las plantas sobreexpresantes de *BBX21* de *S. tuberosum* cultivadas con riegos diferenciales. Los resultados indican que las plantas sobreexpresantes de *BBX21* son más tolerantes a la sequía con tasas de fotosíntesis más elevadas en las primeras horas de la mañana. Las mejoras en las fotosíntesis están principalmente asociadas a mecanismos no estomáticos debido al aumento de la difusión de CO<sub>2</sub> en el mesófilo y al transporte de electrones de la fotosíntesis. Además, las plantas sobreexpresantes de papa muestran una menor sensibilidad al ABA que mantiene los estomas abiertos sin penalidades en la eficiencia en el uso del agua. El transcriptoma de papa bajo restricción hídrica moderada muestra que BBX21 regula un grupo significativo de genes asociados al crecimiento y al estrés como *MYB73*, *TIP2.1*, *EGY1*, *DREB2A* y *SAP12* que están constitutivamente expresados independientemente del tratamiento de riego. En conjunto, los resultados de esta tesis sugieren que BBX21 integra las respuestas de crecimiento y desarrollo junto con distintas redes de señalización hormonal como los BR y el ABA dependiendo del contexto ambiental. Por otra parte, los datos obtenidos en esta tesis sugieren que la sobreexpresión del gen *BBX21* podría usarse en programas de

mejoramiento para aumentar los rendimientos de hoja, grano y/o tubérculos en una amplia variedad de cultivos.

**Palabras clave:** Proteínas B-Box, papa, fotosíntesis, estrés hídrico, brasinoesteroides.

## ABSTRACT

B-box proteins (BBX) are zinc finger transcription factors that contain one or two B-box-like motifs. The main objective of this thesis is to elucidate the role of BBX21 proteins in growth regulation, both in the seedling stage and in adult plants, in response to different environmental conditions. The first specific objective consisted in evaluating the mechanisms of BBX21 that inhibit the growth of hypocotyls in *Arabidopsis thaliana* seedlings in shaded environments. Genetic and physiological assays, hormonal profile studies and gene expression analysis were performed. The results obtained link the activity of BBX21 on the biosynthesis pathway and BR signaling. The second objective consisted of the morphological, anatomical, biochemical, physiological characterization of plants overexpressing *BBX21* of *A. thaliana* and *Solanum tuberosum* (potato) grown in pots with unlimited resources. The results show that plants that overexpress *BBX21* are more robust and have higher rates of photosynthesis, increasing tuber yield by 15%. In addition, overexpressing plants produce more photoprotective pigments that reduce photoinhibition effects. The third specific objective was to analyze the behavior of *S. tuberosum* *BBX21* overexpressing plants grown with differential irrigation. The results indicate that *BBX21* overexpressing plants are more tolerant to drought with higher rates of photosynthesis in the early hours of the morning. The improvements in photosynthesis are mainly associated with non-stomatal mechanisms due to the increase in the diffusion of CO<sub>2</sub> in the mesophyll and the transport of photosynthesis electrons. In addition, overexpressing potato plants show lower sensitivity to ABA that keeps stomata open without penalizing water use efficiency. Potato transcriptome under moderate water stress shows that BBX21 regulates a significant group of genes associated with growth and stress such as *MYB73*, *TIP2.1*, *EGY1*, *DREB2A* and *SAP12* that are constitutively expressed regardless of irrigation treatment. Taken together, the results of this thesis suggest that BBX21 integrates growth and development responses together with different hormonal signaling networks such as BR and ABA depending on the environmental context. On the other hand, the data obtained in this thesis suggest that the overexpression of the BBX21 gene could be used in breeding programs to increase leaf, grain and/or tuber yields in a wide variety of crops.

**Keywords:** B-Box proteins, potato, photosynthesis, water stress, brassinosteroids.

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

A lo largo de su ciclo de vida las plantas están sometidas o expuestas a distintos estímulos abióticos, bióticos y estreses como variaciones en la calidad de luz, en la temperatura, salinidad del suelo, contenido hídrico, presencia de competidores y herbívoros (Fig. 1.1).

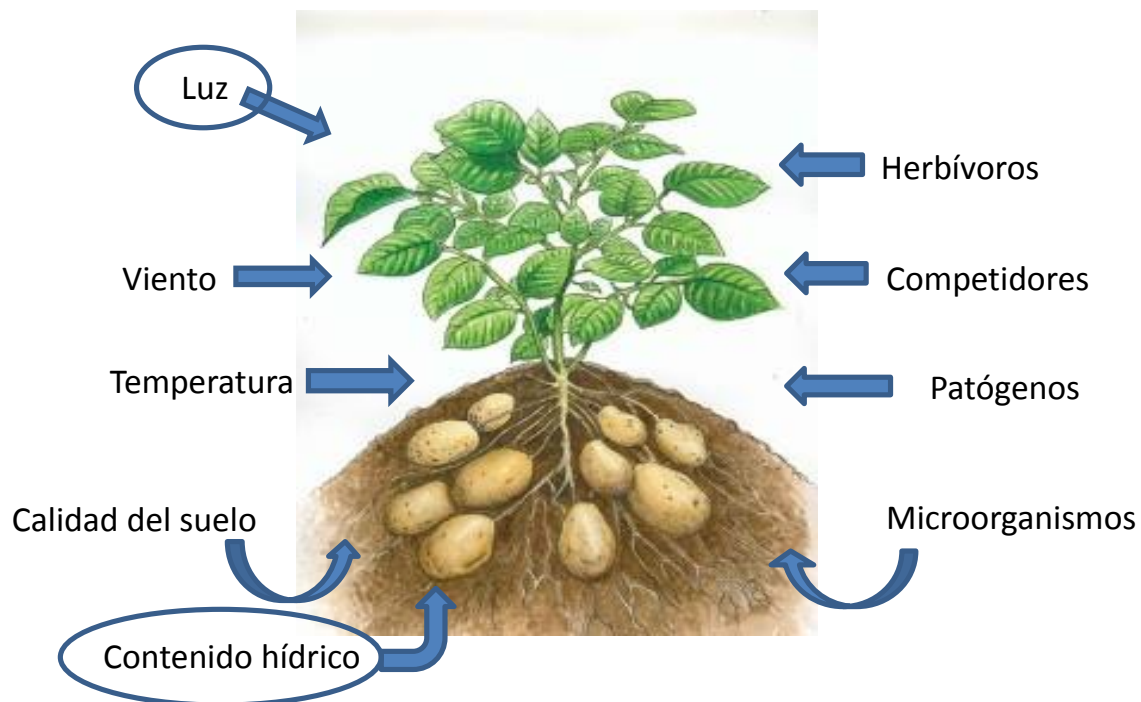


Figura 1.1: Representación esquemática de los factores bióticos y abióticos que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas.

La luz solar es esencial para la vida de las plantas ya que modula varios aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, interviniendo en los procesos energéticos (fotosíntesis) y morfogénicos (fotomorfogénesis). Las plantas monitorean la calidad (longitudes de onda), cantidad (irradiancia), duración (fotoperíodo) y la dirección de la luz del ambiente que las rodea. La intensidad de la radiación (medida como densidad de flujo de fotones fotosintéticos, o PPFD) es un determinante de la fotosíntesis de las plantas, durante la cual la energía solar se convierte en energía química y se almacena como carbono orgánico. La productividad de un cultivo depende no solo de su tasa fotosintética, sino también de otros parámetros ecofisiológicos relacionados con la arquitectura del cultivo, como la radiación interceptada y la eficiencia del uso de la radiación (Sinclair y Muchow, 1999; Monteith y Moss, 1977). La luz también sirve como una señal para el

ajuste de la arquitectura de la planta, modulando respuestas fotomorfogénicas (Givnish, 1988; Ballaré et al., 1991 y 1995; Casal, 2013). Los estudios de genética molecular de plantas modelo en las últimas décadas han identificado muchos genes y vías claves que controlan la fotomorfogénesis de las plantas. La absorción de luz por diferentes fotorreceptores conduce a la modulación de las redes de señalización centrales, que orquestan vías de señalización hormonales y metabólicas específicas para controlar con precisión el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Quail, 2002; Lau y Deng, 2012). Los fotorreceptores activan muchos factores de transcripción intermediarios pertenecientes a diversas familias, que se unen a elementos promotores sensibles a la luz para activar o reprimir la transcripción de aquellos genes que promueven las diferentes respuestas fotomorfogénicas.

### **Fotorreceptores en las plantas**

Las plantas pueden monitorear un amplio rango del espectro lumínico, desde la luz UV-B (282-320 nm) hasta el rojo lejano (700-800 nm), a través de familias de fotorreceptores específicos (Fig. 1.2). Se han aislado y caracterizado cinco clases de fotorreceptores en las plantas: el UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8), los criptocromos (CRY), las fototropinas (phot), los miembros de la familia ZEITLUPE (ZTL), y los fitocromos (PHY).

El UVR8 ha sido identificado como el fotorreceptor de luz UV-B en el rango 282-320 nm (Kliebenstein et al., 2002; Rizzini et al., 2011). Cuando la planta percibe la radiación ultravioleta, este fotorreceptor se monomeriza y las moléculas individuales de UVR8 se translocan al núcleo disparando las respuestas a la luz UV-B (Rizzini et al., 2011).

Los criptocromos (cry), las fototropinas (phot) y los miembros de la familia ZEITLUPE (ZTL) absorben la luz correspondiente a las longitudes de onda del azul y UV-A, es decir, en los 320-500 nm (Cashmore et al., 1999; Briggs et al., 2001; Demarsy y Fankhauser, 2009). Las fototropinas son fotorreceptores específicos de luz azul y UV-A involucrados en el fototropismo, el movimiento de los cloroplastos, redireccionamiento de la posición de las hojas hacia la luz, la expansión foliar y la apertura estomática. En *Arabidopsis thaliana* existen dos fototropinas, phot1 y phot2, cuyas funciones son parcialmente redundantes (Briggs et al., 2001). Por su parte, los criptocromos también son fotorreceptores de luz azul, siendo flavoproteínas que se encuentran implicadas en respuestas como inhibición de la elongación del hipocótilo, acumulación de antocianinas, elongación del entrenudo y

peciolos, germinación, iniciación de la floración, fototropismo y ritmos circadianos (Ahmad y Cashmore, 1996; Ahmad, 1999). En *A. thaliana* hay tres genes que codifican para tres criptocromos diferentes: *cry1*, *cry2* y *cry3*. En su secuencia de ADN tienen una gran similitud con enzimas de reparación fotoliasas y comparten los mismos cofactores del cromóforo, pero esta homología es solo estructural y no es funcional para *cry1* y *cry2*. *cry1* cumple un papel preponderante en altas irradiancias de luz azul, mientras que *cry2* es importante a bajas irradiancias de luz azul (Lin et al., 1998). Esta distinta sensibilidad es en parte explicada por la naturaleza lábil de *cry2* en contraste con *cry1*, que permanece estable en luz (Lin, 2002). Por último, la función de los fotorreceptores de la familia ZEITLUPE fue asociada a la sincronización del reloj circadiano, y también se los ha vinculado a la inducción de la vía fotoperiódica de la floración. Dentro de esta familia se encuentran ZEITLUPE (ZTL), FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX (FKF), y LOV KELCH REPEAT PROTEIN 2 (LKP2) (Demarsy y Fankhauser, 2009; Baudry et al., 2010). Los fitocromos (PHY) absorben con máxima eficiencia la luz correspondiente a las longitudes de onda del rojo (R) en los 600-700 nm, y del rojo lejano (RL) en los 700-800 nm (Quail, 2002) (Fig. 1.2).

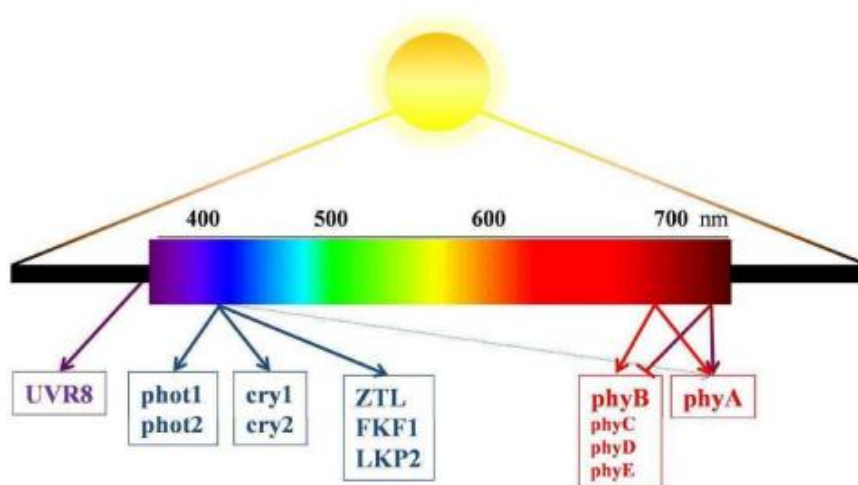


Figura 1.2: Representación esquemática del espectro lumínico y los fotorreceptores específicos para cada longitud de onda.

Los fitocromos son cromoproteínas (moléculas que combinan una parte proteica o apoproteína y un cromóforo) homodiméricas, conformadas por dos polipéptidos de



aproximadamente 125 kDa. Cada monómero posee dos dominios estructurales: el carboxi-terminal, que media la dimerización, y el amino-terminal, que está unido covalentemente a un cromóforo tetrapirrólico responsable de la absorción de la luz. El cromóforo absorbe principalmente R o RL, modificando su conformación. La excitación del cromóforo altera la conformación de la apoproteína y, por ende, su capacidad de acción biológica (Quail, 1991).

Los fitocromos existen en dos formas fotointerconvertibles (Fig. 1.3): el Pr, con un máximo de absorción a 660 nm (es decir en el R), y el Pfr, con un máximo de absorción a 730 nm (es decir en el RL) (Quail et al., 1995; Fankhauser y Chory, 1997). Los fitocromos son sintetizados en el citoplasma en la forma Pr que es biológicamente inactiva, y al absorber luz roja pasan a su conformación activa (Pfr), luego de lo cual migran al núcleo (Nagy et al., 2001). Ambas formas son interconvertibles entre sí de modo reversible por absorción de luz. En plántulas etioladas todo el fitocromo se encuentra en la forma Pr; al exponerlas a la luz, el Pr se fotoconvierte en Pfr. El Pfr también puede destruirse (Marmé et al., 1971) o convertirse en Pr mediante una reacción independiente de la luz denominada reversión (Kendrick et al., 1971). La reversión del Pfr a Pr es una reacción más rápida que la destrucción, pero muy lenta comparada con la fotoconversión del Pr a Pfr. A diferencia de la destrucción, que implica desaparición del fitocromo, la reversión no provoca cambios en la cantidad total de fitocromo (Pr más Pfr). Dado que los espectros de absorción de las dos formas están parcialmente solapados, al irradiar una planta se establece un fotoequilibrio dinámico entre el Pr y Pfr. La proporción de Pfr respecto al fitocromo total ( $Pfr/Pfr+Pr$ ) establecida por cada tratamiento lumínico dependerá de la composición espectral del mismo. La luz monocromática R (660 nm) convierte una alta proporción del fitocromo a la forma Pfr, mientras que luz monocromática RL (730 nm) establece menos del 5% de Pfr/Pr. Cuando se expone a las plántulas a la radiación solar policromática, el Pfr/Pr estará determinado principalmente por la proporción de R y RL de la luz incidente (Mancinelli, 1994; Quail, 1997). Cuanto mayor sea la relación R/RL de luz incidente, mayor será el Pfr/Pr.

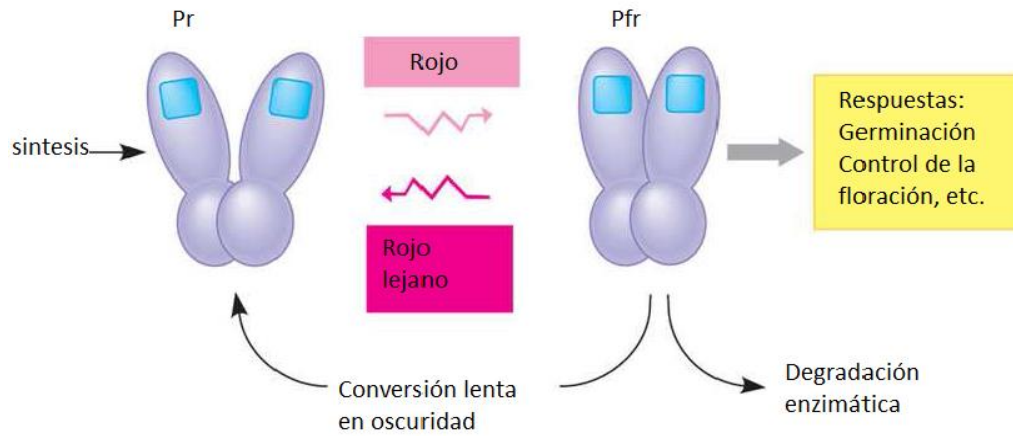


Figura 1.3: Fotoconversión del fitocromo entre la forma inactiva (Pr) y la forma activa (Pfr). Adaptado de Crocco (2012).

En *A. thaliana* se han secuenciado y caracterizado cinco genes que codifican para cinco fitocromos diferentes, *phyA*, *B*, *C*, *D* y *E* (Sharrock y Quail, 1989; Clack et al., 1994). Las proteínas codificadas por los genes *phyB* y *phyD* comparten un 80% de homología y se encuentran más relacionadas con la de *phyE* que con las de *phyA* o *phyC*. Por este motivo se considera que los genes *phyB*, *phyD* y *phyE* forman un subgrupo distinto dentro de los genes de la familia de fitocromos en *A. thaliana* (Goosey et al., 1997). En contraste al resto de los fitocromos, cuyos niveles se mantienen relativamente estables, *phyA* es lábil y su forma Pfr es rápidamente ubiquitinizada y degradada vía el proteosoma 26s en presencia de luz (Clough y Vierstra, 1997; Hennig et al., 1999). *phyA* y *phyB* son los fitocromos mejor caracterizados con respecto a su función biológica. Estos controlan procesos como la germinación, el crecimiento del hipocótilo, la orientación gravitrópica del hipocótilo, la expansión y apertura de cotiledones, la apertura del gancho apical, la elongación de la raíz principal y la floración, entre otros (Quail, 2008; Li et al., 2011).

Recientemente, además de las funciones de *phyB* como fotorreceptor, se ha propuesto y demostrado que participa en la percepción de la temperatura a través de la reversión dependiente de la temperatura del estado Pfr activo al estado Pr inactivo, actuando como un sensor de temperatura. El aumento de las tasas de reversión térmica al exponer las plántulas de *A. thaliana* a ambientes cálidos reduce tanto la abundancia de la reserva de dímeros Pfr-Pfr biológicamente activos de *phyB* como el tamaño de los cuerpos nucleares asociados, incluso a la luz del día (Legris et al., 2016).

Se han caracterizado funcionalmente varios factores de transcripción que funcionan aguas abajo de uno o múltiples fotorreceptores. Por ejemplo, ELONGATED HYPOCOTYL5 (HY5) es un regulador positivo central del desarrollo fotomorfogénico en *Arabidopsis* (Koornneef et al., 1980; Ang y Deng, 1994; Oyama et al., 1997; Gangappa y Botto, 2016). Un socio importante de HY5 es CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1 (COP1), un supresor clave de la fotomorfogénesis (Hoecker, 2017; Lau y Deng, 2012). COP1 marca a HY5 y muchos otros factores de transcripción para la degradación en condiciones de oscuridad para promover la escotomorfogénesis.

### **Factores de transcripción B-BOX (BBX)**

Los factores de transcripción son actores centrales en la regulación de la transcripción, ya que mediante la unión física a secuencias específicas de ADN pueden promover o reprimir la expresión de los genes diana. Las proteínas BBX son una familia funcionalmente diversa codificada por genes que están altamente conservados en todas las plantas multicelulares, incluidas las algas y los musgos (Khanna et al., 2009; Crocco y Botto, 2013; Gangappa y Botto, 2014). El número de proteínas BBX es variable entre especies; por ejemplo, se documentaron 32 en *Arabidopsis*, 29 en arroz, 30 en tomate, 122 en papa, 25 en pera y 64 en manzana (Huang et al., 2012; Crocco y Botto 2013; Talar et al., 2017; Liu et al., 2018). En *Arabidopsis*, 21 de las 32 proteínas BBX (BBX1-13 y BBX18-25) contienen dos B-Box en tándem, mientras que 11 (BBX14-BBX17 y BBX26-BBX32) contienen una B-Box. Las proteínas BBX están involucradas en la fotomorfogénesis de las plántulas, la síntesis de antocianinas, las respuestas de escape a la sombra y la floración (Gangappa y Botto 2014; Yadav et al., 2020; Song et al., 2020). También se ha sugerido que las proteínas BBX median el ajuste del crecimiento de las plantas bajo estrés (Nagaoka y Takano, 2003; Wang et al., 2013; Kielbowicz-Matuk et al., 2014; Yang et al., 2014).

En *Arabidopsis*, BBX21 regula el crecimiento y desarrollo de las plantas durante todo el ciclo de vida. En presencia de luz, la proteína BBX21 promueve la fotomorfogénesis. El dominio B-Box II de BBX21 se une al promotor del gen *HY5* activando su expresión (Xu et al., 2016) e inhibiendo el crecimiento del hipocótilo (Datta et al., 2007; Holtan et al., 2011). Además, BBX21 actúa como un represor de las respuestas al sombreado, suprimiendo el crecimiento exagerado aguas abajo de la señalización de COP1 (Crocco et al., 2010).

Curiosamente, BBX32, una BBX que reprime la fotomorfogénesis de las plántulas, interactúa físicamente con BBX21, lo que lleva a la inactivación del complejo proteico BBX21-HY5 (Holtan et al., 2011). Este ejemplo ilustra la alta diversidad funcional de las proteínas BBX, que puede dar origen a respuestas biológicas complementarias, aditivas u opuestas. Estas funciones contribuyen a la integración homeostática de señales endógenas y ambientales para el ajuste fino de varios procesos fisiológicos (Gangappa y Botto, 2014; Crocco et al., 2015).

### **Respuesta de escape al sombreado**

Las plantas intolerantes al sombreado son capaces de provocar cambios en su morfología destinados a optimizar la captación de la luz solar cuando perciben la presencia de plantas vecinas o si están creciendo bajo un canopeo vegetal. Este conjunto de respuestas es conocido como respuestas de escape al sombreado (SAS, del inglés *shade avoidance syndrome*), y pueden involucrar la elongación de tallo, dominancia apical, la reducción en la expansión de la lámina foliar, el alargamiento de los peciolo, la disposición vertical de las hojas, aceleración de la floración, y/o una menor ramificación en el tallo de la planta adulta (Fig. 1.4) (Casal, 2012).

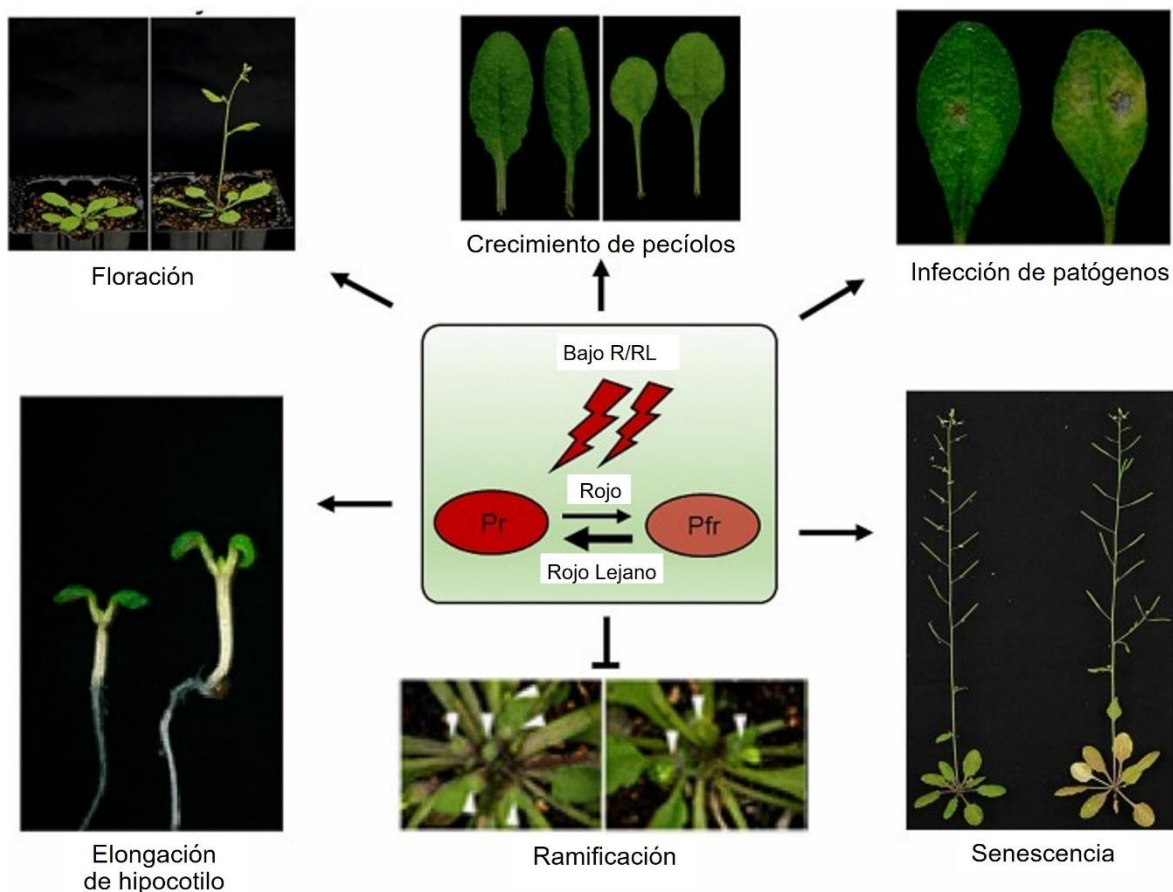


Figura 1.4 Descripción general del síndrome de escape al sombreado. Adaptado de Liu et al. (2021).

Estudios previos han permitido identificar a las proteínas BBX como reguladores de las respuestas SAS. Se caracterizaron BBX del grupo IV, y se pudo observar que BBX19, BBX21 y BBX22 son reguladores negativos de la respuesta de crecimiento en condiciones de sombra (Crocco et al., 2010), mientras que BBX24 y BBX25 promueven la elongación celular y la respuesta a sombra (Crocco et al., 2010, 2015; Gangappa et al., 2013). Los mecanismos moleculares por los que las proteínas BBX actúan en la respuesta a sombra aún no han sido del todo dilucidados. Se sabe que BBX21 y BBX24, a pesar de tener roles opuestos, contribuyen a la inducción temprana de genes que responden a la sombra. Ambas proteínas promueven la expresión de *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE1* (*PIL1*) en exposiciones cortas a las señales del sombreado (Crocco et al., 2010, 2015). Además, BBX21 promueve la expresión de los genes *LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED* (*HFR1*) y *PHY RAPIDLY REGULATED 1* (*PARI*), que son factores de transcripción del

tipo bHLH y actúan como reguladores negativos de la respuesta del escape al sombreado (Sessa et al., 2005 y Roig-Villanova et al., 2007), y también de *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN PROTEIN 2 (ATHB2)*, que codifica para un factor de transcripción que presenta en su estructura un homeodominio asociado a un cierre de leucinas (HD-Zip) y actúa como un regulador positivo de las respuestas de escape al sombreado (Carabelli et al., 1996). Por su parte, BBX24 regula positivamente la expresión de *indole-3-acetic acid inducible 29 (IAA29)* y de *Auxin-responsive GH3 family protein (GH3.3)* (Crocco et al., 2010, 2015). *IAA29* y *GH3.3* intervienen en la vía de señalización de auxinas, y sus niveles de expresión también se ven aumentados al adicionar auxina exógena al medio de crecimiento (Devlin et al., 2003; Tao et al., 2008).

Se ha propuesto que tanto BBX21 como BBX24 tendrían un rol importante en el control del crecimiento ante exposiciones prolongadas al sombreado mediante la regulación de las vías de señalización hormonales (Crocco et al., 2010, 2015). La proteína BBX21 reprimiría la elongación celular inhibiendo la expresión de genes que son regulados positivamente por las hormonas de crecimiento auxinas y brasinoesteroides (BR) (Crocco et al., 2010), aunque aún se desconoce cuál de estas dos hormonas es la que actúa de manera preponderante en las respuestas de escape al sombreado mediada por BBX21.

### **Hormonas y respuestas de escape al sombreado**

En *A. thaliana*, prácticamente todas las hormonas participan en el control de los cambios morfológicos que ocurren como respuesta de escape al sombreado, en diferentes estadios del desarrollo de la planta y condiciones ambientales (Yang y Li, 2017). Las auxinas son las principales hormonas que promueven la elongación del hipocótilo en respuesta a la sombra. Las giberelinas (GA) y los BR son otros dos tipos de hormonas de gran importancia para la promoción del crecimiento del hipocótilo en condiciones de sombreado. Otras hormonas como el ácido abscísico (ABA) y el etileno también han sido propuestas por participar en las respuestas de elongación asociadas a las SAS (Liu et al., 2021, Fernández- Milmanda y Ballaré, 2021).

Los BR son esteroides polihidroxilados que están involucrados en muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, actuando sinérgicamente con auxinas y GA (Guo et al., 2013). En *Arabidopsis*, el CITOCROMO P450 90B1 (DWF4/CYP90B1) es una de las

principales enzimas responsables de la biosíntesis de BR, actuando como un factor limitante (Choe et al., 1998; Fujita et al., 2006). La vía de señalización de BR requiere la percepción de brasinolide (BL), el compuesto BR más activo, por su receptor BR INSENSITIVE 1 (BRI1) y su correceptor BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE (BAK1), que finalmente inactivan a BR-INSENSITIVE 2 (BIN2). Esto desencadena la acumulación de los factores de transcripción BRASSINAZOLE-RESISTANT 1 (BZR1) y BRI-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1) en su forma no fosforilada, que pueden unirse a los genes diana y promover así el alargamiento celular (Li y Chory, 1997; Li et al., 2002; Wang et al., 2002; Yin et al., 2002). BES1 y BZR1 no solo regulan la expresión de miles de genes involucrados en el crecimiento y desarrollo de las plantas, sino que también son responsables de inhibir mediante la unión directa a las regiones promotoras, a múltiples genes de biosíntesis de BR, reprimiendo su expresión (He et al., 2005, Sun et al., 2010) (Fig. 1.5).

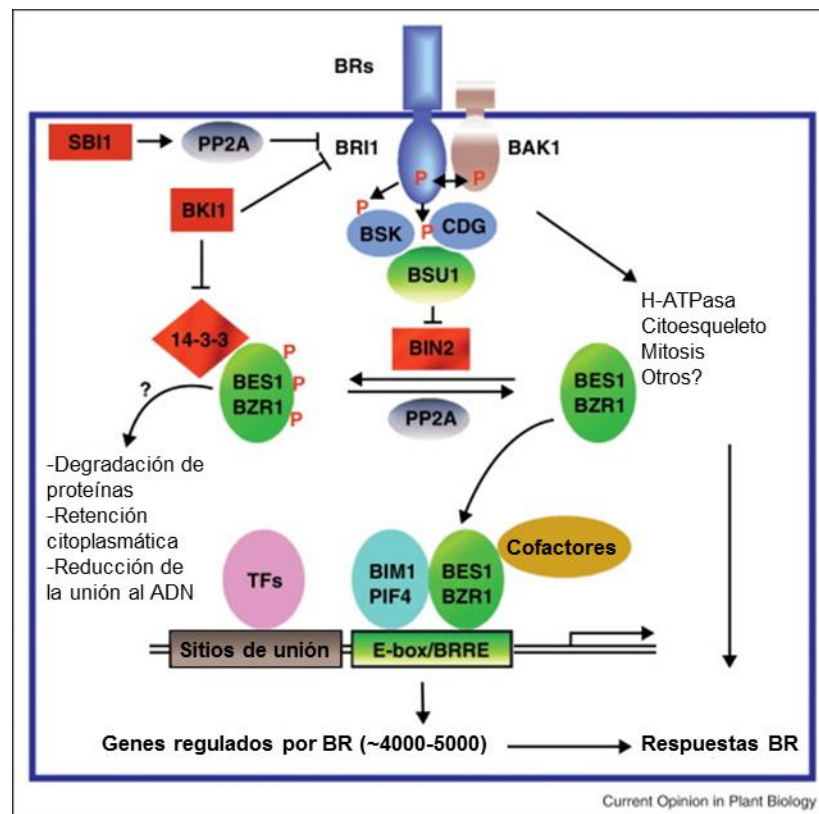


Figura 1.5: Vía de señalización de brasinoesteroides (BR).

En ausencia de BR, el regulador negativo BIN2 quinasa fosforila los factores de transcripción de la familia BES1/BZR1 e inhibe sus funciones mediante la degradación de proteínas, la retención citoplásmica y posiblemente la reducción de la unión al ADN. BES1/BZR1 cooperan con otros TF de

unión a ADN e interactúa con cofactores transcripcionales para regular miles de genes para el crecimiento regulado por BR y otros procesos celulares. Adaptado de Guo et al. (2013).

### **Estrés hídrico en plantas**

De los múltiples factores bióticos y abióticos que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas (Fig. 1.1), el estrés hídrico constituye uno de los más limitantes de la producción mundial de cultivos (Bray, 1997; Yordanov et al., 2003; Boyer, 1982). Como respuestas asociadas a la sequía se incluyen la pérdida de turgencia, cambios en la permeabilidad y fluidez de la membrana, cambios en la concentración de solutos e interacciones proteína-proteína y proteína-lípidos. La limitación de agua provoca un cambio en la relación tallo/raíz, debido a una mayor limitación en la expansión foliar con respecto al crecimiento radicular.

El control de los estomas que regula la pérdida de agua es un evento temprano en la respuesta al estrés hídrico, que lleva a una limitación en la absorción de carbono por las hojas (Chaves et al., 2002). Este es un proceso que está regulado parcialmente por el ABA, y que se inicia cuando el mesófilo comienza a sufrir deshidratación. Durante el estrés por sequía, la biosíntesis del ABA (Radin y Ackerson, 1981; Robertson et al., 1985) y/o la sensibilidad de ABA (Saez et al., 2006) aumentan e inician una serie de eventos de señalización que inducen o mejoran la tolerancia de las plantas a el estrés. Se han establecido rutas dependientes e independientes de ABA (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Zhu et al., 2002). Cuando las plantas están bajo estrés, la síntesis de ABA aumenta en los tejidos y promueve la actividad de factores de transcripción como MYELOBLASTOSIS (MYB), DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN (DREB) y BASIC REGIÓN-LEUCINE ZIPPER (bZIP), que facilitan la expresión de otros genes (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006). Con el tiempo, la inducción de circuitos de control que responden a ABA conduce a la participación de genes y proteínas de acción posterior, entre ellos proteínas “*heat-shock*”, proteínas antioxidantes y osmolitos (Zhu, 2016). Este cierre de los estomas no sólo tiene como consecuencia la disminución de la pérdida de agua por las hojas, sino también la reducción en la entrada del CO<sub>2</sub>, lo cual repercute directamente en el proceso fotosintético. La reducción de la fotosíntesis se produce por el cierre en sí de los estomas, así como por una reducción de la actividad de las enzimas fotosintéticas. Por su parte, la asimilación de carbono a nivel de



planta entera disminuye como consecuencia de la disminución de la difusión de CO<sub>2</sub> en la hoja, la desviación de la asignación de carbono a los órganos no fotosintéticos y las moléculas de defensa o por cambios a nivel bioquímico en la hoja (Chaves et al., 2002).

Las plantas responden también a nivel celular y molecular, modificándose la expresión de genes que codifican para enzimas claves en la síntesis de osmolitos, enzimas antioxidantes, proteínas con acción protectora y factores de transcripción, entre otros (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

### **Estrés hídrico y fotosíntesis**

La falta de disponibilidad de agua es la principal limitante que interfiere con el crecimiento y desarrollo de las plantas, al afectar de manera negativa en los procesos vitales que ocurren dentro de los organismos vegetales. En respuesta al estrés por sequía, las plantas sufren cambios a nivel fisiológico, bioquímico, anatómico y molecular (Fig. 1.6). Bajo un estrés hídrico severo, la elongación celular se ve inhibida debido a una interrupción del flujo de agua hacia las células, provocado por la caída del potencial agua de las células. Uno de los principales cambios durante un estrés hídrico es la disminución en la altura de las plantas, provocado por la disminución de la expansión celular. Se ha demostrado que la altura de las plantas de maíz, caña y arroz disminuyeron significativamente bajo condiciones de sequía (Anjum et al., 2017; Misra et al., 2020; Patmi et al., 2020). Aunque el crecimiento de las plantas se reduce cuando el contenido hídrico es limitante, el crecimiento de la parte aérea se ve afectado de mayor manera que el crecimiento de las raíces y, en algunos casos, la relación biomasa de las raíces/ biomasa de la parte aérea puede ser mayor en las plantas creciendo en ambientes secos cuando se las compara con plantas creciendo en ambientes bien regados (Anithakumari et al., 2012). Además de los cambios en la altura de las plantas, las hojas también sufren cambios en su morfología. La sequía induce una reducción del área foliar dada principalmente por una menor expansión foliar: al reducir la expansión de las hojas, las hojas se vuelven más pequeñas y, por lo tanto, transpiran menos. Otra de las consecuencias de un estrés hídrico es la mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés, *reactive oxygen species*). En condiciones de sequía, uno de los principales problemas que puede tener el cloroplasto es la producción del radical hidroxilo en los tilacoides (Kar, 2011). El radical hidroxilo es el ROS que tiene una vida

media más corta, pero a su vez posee un potencial oxidante extremadamente fuerte que reacciona con casi todas las moléculas biológicas (Queval et al., 2012).

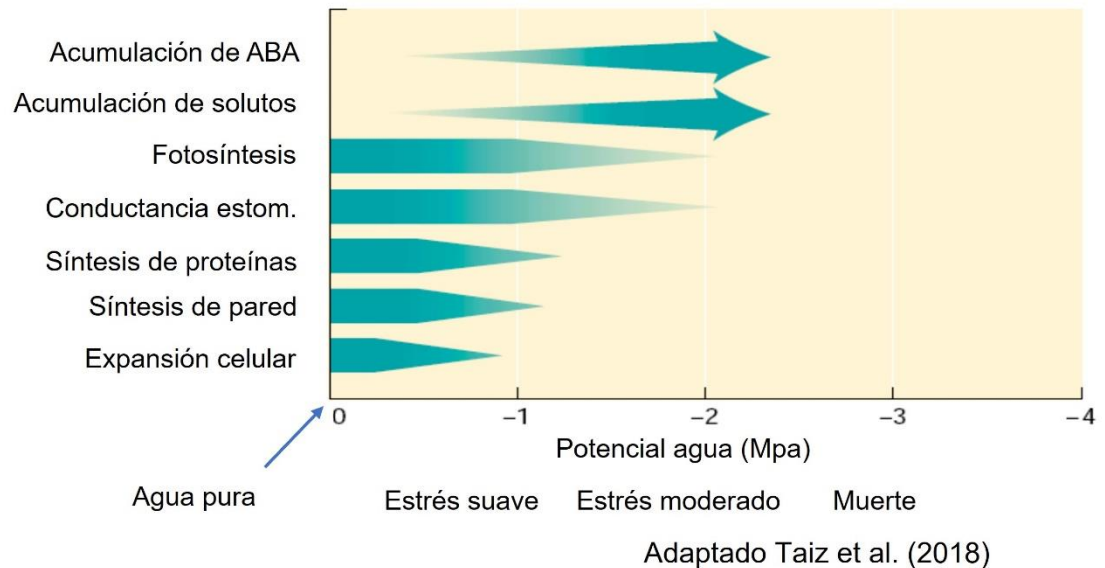


Figura 1.6: Efectos del déficit hídrico sobre la fisiología de las plantas. Adaptado de Taiz et al. (2018). El grosor de las flechas corresponde a la magnitud del proceso.

Todos estos cambios provocados por la sequía afectan los procesos de fotosíntesis (Farooq et al., 2009). La fotosíntesis es considerada como el proceso más importante en la vida terrestre, ya que es la única forma de capturar energía directamente de la luz y convertirla en energía química que es utilizada por los organismos vivos.

La reducción de la fotosíntesis en condiciones de estrés hídrico se atribuye a la disminución de la presión de turgencia, el cierre de los estomas, la limitación del intercambio de gases, reducción de asimilación de  $\text{CO}_2$  y el deterioro del aparato fotosintético (Chaves et al., 2003, Jaleel et al., 2009). La capacidad de mantener funcional la maquinaria fotosintética bajo condiciones de agua limitantes es de gran importancia en la tolerancia a la sequía. La planta reacciona al déficit hídrico con un rápido cierre de estomas para evitar una mayor pérdida de agua por transpiración (Cornic y Massacci, 1996). Esto trae aparejado una restricción en la difusión de  $\text{CO}_2$  en la hoja (Flexas et al., 2006a). La disminución en la tasa de fotosíntesis neta bajo estrés por sequía muchas veces se explica por una disminución en la concentración interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), que resulta en una limitación de la fotosíntesis en el

sitio aceptor de la Rubisco, o por inhibición directa de enzimas fotosintéticas como la misma Rubisco (Lawlor y Cornic, 2002; Haupt-Herting y Fock, 2000). A pesar de que el fotosistema II (PSII) es altamente resistente a la sequía (Yordanov et al., 2003), en condiciones de estrés hídrico el transporte de electrones fotosintéticos a través del PSII se inhibe (Chen y Hsu, 1995; Chakir y Jensen, 1999). Entre los expertos existe un consenso en que una disminución de la fotosíntesis asociada al estrés hídrico se debe no solo a limitaciones estomáticas, sino también a limitaciones no estomáticas (Shangguan et al., 1999; Flexas y Medrano, 2002). Las limitaciones no estomáticas de la fotosíntesis se han atribuido a una reducción en la eficiencia de carboxilación, una menor regeneración de ribulosa-1-5-bifosfato y una menor cantidad de Rubisco funcional (Flexas y Medrano, 2002; Drake et al., 2017).

Aunque el cierre de estomas inducido por estrés hídrico actúa como la limitación inicial y más importante para la asimilación de CO<sub>2</sub>, la caída de la asimilación fotosintética de CO<sub>2</sub> durante el estrés hídrico no se puede explicar exclusivamente por la resistencia de los estomas a la difusión de CO<sub>2</sub>, ya que las limitaciones también pueden deberse a las resistencias internas de las hojas. Estas resistencias consisten en la ruta del CO<sub>2</sub> desde los espacios aéreos intercelulares hasta las células del mesófilo, los cloroplastos y los sitios de carboxilación (Flexas et al., 2008), y se denominan como su inversa, conductancia del mesófilo (gm). Trabajos publicados anteriormente han demostrado que la difusión lateral de CO<sub>2</sub> en el mesófilo induce importantes variaciones en la fotosíntesis (Morison y Lawson, 2007). Si bien todavía no se ha podido describir la magnitud y los efectos de tal difusión lateral bajo estrés hídrico, es probable que, en casos de cierre estomático en parches, la difusión lateral desde los estomas abiertos a las porciones de mesófilo bajo estomas cerrados pueda contribuir a la fotosíntesis.

### **El cultivo de papa**

La papa (*Solanum tuberosum*) es el tercer cultivo más importante en el mundo, detrás del cultivo del trigo y arroz (FAO, 2008), por el alto contenido de almidón de sus tubérculos. La especie *S. tuberosum* se divide en dos subespecies, *andigena*, adaptada a condiciones de días cortos que se cultiva principalmente en los Andes, y *tuberosum*, la variedad que hoy se cultiva en el resto del mundo. Es una especie herbácea dicotiledónea, perenne, pero

cultivada frecuentemente como planta anual. Presenta varios tallos principales (Fig. 1.7), que inicialmente se presentan erguidos y que con el progreso del ciclo vegetativo pueden volverse parcial o totalmente rastreros.

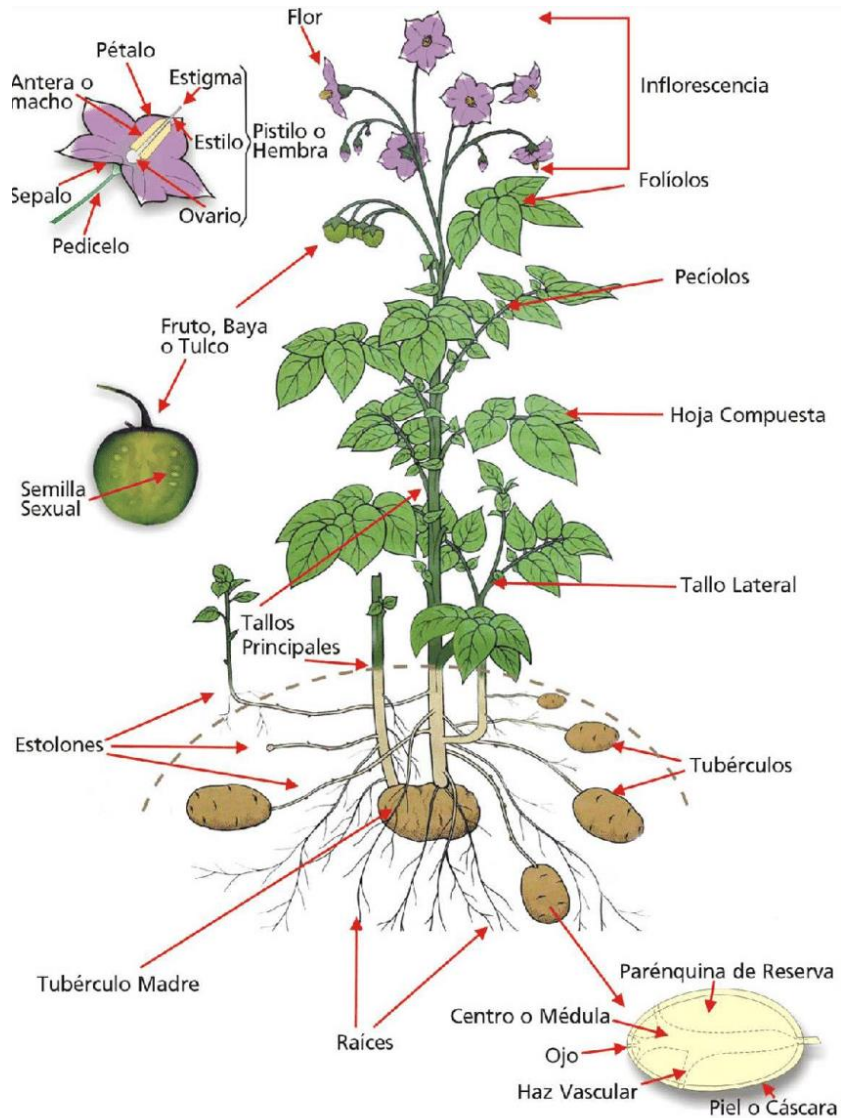


Figura 1.7: Esquema de la planta de papa.  
Tomado de Huarte y Capezio (2013).

Los tubérculos conforman un sistema subterráneo originado a partir de estolones y como consecuencia de la acumulación de reservas debidas al rápido crecimiento y división celular (Burton, 1989). El 75-85% de la materia seca total se acumula en los tubérculos. Además de ser un órgano de reserva, también sirve para la multiplicación vegetativa.

La producción de papa en Argentina se estima alrededor de 2.013 millones de toneladas por año (FAO, 2010). El principal mercado de la papa es para consumo fresco, seguido en orden de importancia por la producción destinada a papa-semilla y la exportación (Corvo Dolcet, 2005). Argentina históricamente ha abastecido la demanda interna y eventualmente ha exportado a países vecinos. Cerca del 50% de la producción nacional se centra en Balcarce, región sudeste de Buenos Aires. Esta región tiene el mayor impacto sobre los precios durante el año. Los últimos años señalan rendimientos promedio de 40 toneladas/hectárea.

### **Estrés hídrico en papa**

La papa es uno de los cultivos más sensibles al déficit hídrico en el suelo, aunque el uso del agua es mucho más eficiente que el de los cereales, con índices de cosecha cercanos al 0,75% en relación al 0,5% de los cereales. Las variedades modernas de papa necesitan un riego superficial frecuente.

La papa presenta poco desarrollo radicular, por lo cual se requiere un cuidadoso manejo del agua que evite tanto déficit como excesos. A esto se suma la tendencia a cerrar los estomas y disminuir el crecimiento en respuesta a leves deficiencias de agua. Por esto se reconoce al estrés hídrico como la mayor limitante de la producción de papa a nivel mundial (Schapendonk et al., 1989).

Cuando la tasa de transpiración es alta y el contenido hídrico del suelo es bajo, el contenido de agua de la planta decrece rápidamente. Si el contenido de agua decrece un 10%, el crecimiento se vuelve más lento y puede, eventualmente, cesar. Si decrece un 20%, la planta se marchita y los principales procesos fisiológicos se vuelven más lentos o se detienen; y si decrece un 40%, la planta usualmente muere (Coleman, 2008). La primera de las respuestas observada ante el estrés hídrico es el cierre de los estomas de las hojas; un estrés prolongado lleva al marchitamiento, debido a la pérdida de turgencia de las hojas.

Un estrés hídrico provoca una reducción del crecimiento de las plantas, una disminución en el área foliar, que trae aparejado una reducción de la absorción de CO<sub>2</sub> para la fotosíntesis y una disminución en el rendimiento, debido a que se ven afectados el desarrollo radicular y de la parte aérea provocando un menor desarrollo del canopeo y fotoasimilados disponibles (Jefferies, 1992; Jefferies, 1993; Deblonde y Ledent, 2001; Evers et al., 2010). Una

disminución de la expansión foliar limita principalmente la capacidad fotosintética total, mientras que una disminución del desarrollo radicular limita la capacidad de la planta de capturar agua y nutrientes del suelo. Estas respuestas morfológicas dependen de la etapa de desarrollo en la que ocurre el estrés y también la duración del mismo (estrés de corto o largo plazo). Si el estrés ocurre en las etapas de iniciación de los estolones y tubérculos, no solo se va a ver limitado el desarrollo foliar, sino que también se va a afectar el número de estolones, lo que conlleva a un menor número de tubérculos, y por consecuencia a una reducción en el índice de cosecha y rendimiento final (Fasan y Haverkort, 1991; Deblonde y Ledent, 2001; Lahlou et al., 2003).

### **Estrategias biotecnológicas para el aumento de los rendimientos de los cultivos**

La población mundial se encuentra en constante crecimiento y se pronostica que para el año 2050 la cantidad de personas será de un poco mayor a 9000 mil millones (consejo de población de la ONU). Con una población mundial en aumento, la demanda por alimentos seguirá creciendo. En este contexto, surge la necesidad de aumentar los rendimientos de los cultivos para satisfacer esta demanda. Una de las herramientas más utilizadas en estos días para mejorar los rendimientos es la ingeniería genética, que ha permitido el desarrollo de una variedad de cultivos transgénicos, principalmente en soja, maíz, algodón y canola, incorporando a las plantas resistencia a herbicidas o resistencia a insectos (Briefs, 2017). Una nueva estrategia implica la creación de plantas transgénicas que optimicen el crecimiento y desarrollo de la planta, mediante cambios en la morfología y fisiología, interviniendo directamente sobre los mecanismos de percepción y respuesta a señales ambientales, y aumentando así los rendimientos de los cultivos bajo distintas condiciones ambientales.

Por otra parte, la disponibilidad de agua es el factor ambiental más importante que limita la producción de cultivos y sus rindes (Boyer, 1982), no solo en ambientes áridos sino también en zonas templadas. La agricultura mundial utiliza alrededor del 70% de los recursos de agua dulce y el imparable aumento de la población humana presenta un conflicto entre la demanda de agua para la producción de alimentos y para el uso humano directo (WWAP, 2015). El cambio climático antropogénico, resultante del aumento de las concentraciones de CO<sub>2</sub> atmosférico derivado de los combustibles fósiles, está provocando

un aumento de la temperatura global y del déficit de presión de vapor atmosférico. Estos complejos cambios están alterando los patrones climáticos y meteorológicos anteriormente estables y alterando el tiempo, la distribución y el grado de precipitación en todo el planeta (Steinacher et al., 2013).

El mejoramiento moderno de cultivos para la tolerancia a la sequía ha tenido décadas de éxito, lo que ha permitido que nuevas variedades, cultivares y germoplasma de élite produzcan mejores rendimientos en condiciones de déficit hídrico. La biotecnología vegetal moderna, sin embargo, durante los últimos treinta años o más se ha centrado principalmente en la resistencia a enfermedades e insectos, así como en el manejo de malezas. Muy recientemente, científicos argentinos liderados por la Dra. Raquel Chan han desarrollado y liberado una soja transgénica, denominada HB4, resistente a la sequía (Waltz, 2015). Si bien la necesidad de cultivos resistentes a la sequía aumenta con la incidencia cada vez mayor de los déficits de agua relacionados con el cambio climático, el desarrollo de plantas que puedan tolerar la sequía a través de la biotecnología está en sus primeros pasos y, a menudo, sigue siendo el dominio de la investigación de plantas modelo.

## **OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### **Objetivos**

Esta tesis tiene como objetivo principal elucidar el rol de las proteínas BBX21 en la regulación del crecimiento y desarrollo tanto en el estadio de plántula como en plantas adultas, en respuesta a diferentes condiciones ambientales como el sombreado y el estrés hídrico.

Los objetivos particulares de esta tesis son los siguientes:

- 1- Evaluar la respuesta de BBX21 a los brasinoesteroides en la inhibición del crecimiento en ambientes sombreados en plántulas de *A. thaliana*.
- 2- Caracterizar la morfología y fisiología de plantas de *A. thaliana* y de *S. tuberosum* sobreexpresantes de *BBX21* creciendo en condiciones óptimas.
- 3- Estudiar el comportamiento de las plantas de *S. tuberosum* sobreexpresantes de *BBX21* creciendo en ambientes con riegos restringidos.

## **Hipótesis**

La hipótesis principal de trabajo es la siguiente: La sobreexpresión del gen *BBX21* en plantas genera respuestas moleculares, bioquímicas, anatómicas, morfológicas y fisiológicas que le confieren mayor resistencia diversos estreses en plantas de *Arabidopsis* y papa.

Las hipótesis parciales son las siguientes:

Para el objetivo 1:

H<sub>I-1</sub>) La respuesta a ambientes sombreados en plántulas de *A. thaliana* mutantes nulos de *BBX21* está mediado por hormonas, principalmente brasinoesteroides.

H<sub>I-2</sub>) El factor de transcripción *BBX21* media la respuesta a los brasinoesteroides en plántulas de *A. thaliana* a través de las vías de biosíntesis y señalización de los brasinoesteroides.

H<sub>I-3</sub>) El factor de transcripción *BBX21* regula la expresión de genes de la biosíntesis de los brasinoesteroides.

Para el objetivo 2:

H<sub>II-1</sub>) La sobreexpresión del gen *BBX21* confiere a las plantas de *A. thaliana* y papa cambios en su morfología, bioquímica y comportamiento fotosintético.

H<sub>II-2</sub>) La sobreexpresión del gen *BBX21* en plantas de papa aumenta el rendimiento de tubérculos.

Para el objetivo 3:

H<sub>III-1</sub>) Las plantas sobreexpresantes del gen *BBX21* en papa son más tolerantes que las plantas sin transformar cuando son cultivadas bajo restricciones hídricas moderadas.

H<sub>III-2</sub>) Las plantas sobreexpresantes del gen *BBX21* en papa son más tolerantes al estrés hídrico que las plantas sin transformar porque disminuyen las limitaciones estomáticas mediadas por la vía del ABA.

H<sub>III-3</sub>) La sobreexpresión del gen *BBX21* en plantas de papa induce cambios en la expresión génica para mejorar la tolerancia al estrés hídrico.

H<sub>III-4</sub>) Las plantas sobreexpresantes del gen *BBX21* en papa poseen un mayor rendimiento que las plantas sin transformar, cuando son cultivadas bajo restricciones hídricas moderadas.



## Estructura de la tesis

La presente tesis se encuentra separada en 5 capítulos:

- Capítulo 1: **Introducción**. En este capítulo se presenta una descripción general de los temas que van a ser tratados en esta tesis y se hace una revisión precisa de los antecedentes con los que se cuenta.
- Capítulo 2: **Materiales y métodos**. En este capítulo se aborda los materiales y métodos usados en el desarrollo de cada uno de los experimentos que componen la tesis. Este capítulo está dividido en 3 secciones, que responden a los diferentes objetivos particulares de esta tesis.
- Capítulo 3: **Resultados**. Este capítulo está dividido en 3 secciones, que responden a los diferentes objetivos particulares de esta tesis.

La sección I de resultados está enfocada a la parte mecanística de la respuesta al sombreado en plantas de *A. thaliana* y su regulación e interacción con las vías hormonales. En este capítulo se pondrán a prueba las hipótesis  $H_{I-1}$ ,  $H_{I-2}$  y  $H_{I-3}$ .

La sección II de los resultados corresponde a la caracterización de las plantas sobreexpresantes del gen *BBX21* en Arabidopsis y papa, donde se ponen a prueba las hipótesis  $H_{II-1}$ ,  $H_{II-2}$  y  $H_{II-3}$ .

La sección III de los resultados está enfocada en las plantas de papa sobreexpresantes del gen *BBX21* creciendo bajo restricción hídrica, donde se busca validar las hipótesis  $H_{III-1}$ ,  $H_{III-2}$ ,  $H_{III-3}$  y  $H_{III-4}$ .

- Capítulo 4: Este es el capítulo de **Discusión** de los resultados presentados en el capítulo anterior, también dividido en sus respectivas tres secciones.
- Capítulo 5: Conclusiones generales. En este capítulo se presentan las conclusiones obtenidas en esta tesis en forma integrada, incluyendo el contraste de hipótesis, la contribución al avance del conocimiento, aplicaciones de los resultados obtenidos, el planteo de nuevos interrogantes y la propuesta de futuras líneas de investigación.

## CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

Este capítulo consta de una sección general donde se presentan todos los materiales vegetales utilizados en esta tesis, y luego se presentan los materiales y métodos subdivididos en tres secciones, que corresponden a los respectivos objetivos e hipótesis de la tesis.

### **Material vegetal**

*Arabidopsis* es la especie modelo más utilizada para investigación, dado su pequeño tamaño y su corto ciclo de vida, que permite crecer muchas plantas en poco espacio. Además, es la primera especie vegetal que ha sido completamente secuenciada. Para este estudio se utilizaron las siguientes líneas de *A. thaliana*:

- Ecotipo silvestre: plantas del ecotipo Columbia-0 (Col-0) y Landsberg *erecta* (Ler).
- Mutantes nulos del gen *BBX21* disponibles en el laboratorio del Dr. Javier Botto (*bbx21-1* en fondo Col-0 y *bbx21-2* en fondo Ler).
- Tres líneas sobreexpresantes del gen *BBX21*: OE#1 y OE#2 en fondo Col-0 (Crocco et al., 2010 y 2018), que fueron generadas en el laboratorio del Dr. Javier Botto, y 35S:BBX21-YFP, descrita en Xu et al. (2016).
- *bzr1-D*, que ha sido descrito anteriormente en He et al. (2002).
- La doble mutante *bbx21-1 bzr1-D*, que se generó cruzando *bbx21-1* con la línea *bzr1-D* y seleccionando plantas homocigotas para ambos genes mediante PCR, utilizando los primers presentados en el Cuadro 1. Para genotipar el alelo *bzr1-D*, se utilizaron además las enzimas de restricción HpaII y MspI.

Para los experimentos en papa (*S. tuberosum*) se usaron plantas de la variedad Spunta, y tres líneas sobreexpresantes del gen *BBX21* que se denominaron CH1, CH2 y CH13. Estas líneas fueron generadas en el grupo de investigación y fueron descritas en Crocco et al. (2018).

### **Sección I: Evaluación de la respuesta de BBX21 a los brasinosteroides en la inhibición del crecimiento en ambientes sombreados en plántulas de *A. thaliana*.**

#### **Condiciones de crecimiento y tratamientos de luz**

Las semillas se sembraron en cajas de plástico transparente conteniendo agar al 0,8%/agua, y se incubaron en la oscuridad a 4 °C para reducir la latencia y homogeneizar la

germinación. Después de 4 días, las semillas embebidas se expusieron a un pulso de luz blanca y se incubaron en la oscuridad durante 24 h a 22 °C para inducir la germinación. Luego, las cajas con las plántulas se transfirieron a luz blanca para su desetiología durante 2 días. Las plántulas de tres días de edad se expusieron a luz blanca o a sombra simulada en una cámara de crecimiento a 22 °C con fotoperíodo de 10 horas de luz + 14 horas de oscuridad durante 5 días. El número de réplicas utilizado para los experimentos fisiológicos fue de 3, y cada réplica es la media de 10 plántulas creciendo en la misma caja de plástico transparente. Luz blanca consistió en  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (400–700 nm), proporcionada por una mezcla de lámparas fluorescentes y halógenas (R/FR= 1,2). La sombra simulada se generó con un filtro de acetato verde (filtros LEE 138, 121 o 089; Paolini 2031; La Casa del Acetato, Buenos Aires, Argentina) en la parte superior de las cajas con plántulas, reduciendo la irradiancia (PAR=  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y la relación R/FR= 0,2. La sombra a corto plazo se obtuvo sembrando plántulas bajo luz blanca durante 5 días y luego suplementándolas con un pulso de 1 hora de  $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de rojo lejano (RL) administrado lateralmente al final del fotoperíodo (luz blanca + RL) siguiendo la metodología descrita por Fernández-Milmanda et al. (2020).

### **Experimentos hormonales**

Las semillas se sembraron en medio agar al 0,8%/agua suplementado con BR sintéticos (24-*epi*BL, E1641 Sigma-Aldrich®, St Louis, MO) o inhibidores específicos (Brassinazole, SML1406, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO). Para las curvas de dosis de brassinazole (BZR), las semillas primero se sembraron sobre un papel de filtro húmedo, donde germinaron durante 24 h bajo luz blanca, y luego el papel de filtro se transfirió a las cajas de plástico con agar que contenían BZR en las concentraciones indicadas. En el quinto día de tratamiento, se fotografiaron las plántulas y se midió la longitud del hipocótilo utilizando el software ImageJ (Schneider et al., 2012). El número de réplicas utilizado para los experimentos fisiológicos fue de 3, y cada réplica es la media de 10 plántulas creciendo en la misma caja de plástico transparente.

### **Cuantificación de brasinoesteroides**

Las extracciones y cuantificaciones de BR se realizaron como está descrito en Oklestkova et al. (2017) y Tarkowská et al. (2016) en el laboratorio de Miroslav Strnad, en el Instituto de Botánica Experimental de la Academia Checa de Ciencias, en República Checa. Se

extrajeron tres réplicas de aproximadamente 5mg de peso seco de plántulas de *A. thaliana* en acetonitrilo al 60 % enfriado con hielo y se agregaron 25 pmol de estándares internos de BR marcados con deuterio a cada muestra (OlChemIm Ltd., Olomouc, República Checa). Después de 12 horas, las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se purificaron con cartuchos Discovery™ DPA-6S de 50 mg (Supelco®, Bellefonte, PA, EE. UU.). Después de la evaporación a sequedad, las muestras se resuspendieron en 40 µL de metanol y se analizaron por cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) utilizando un sistema ACQUITY UPLC® I-Class (Waters, Milford, MA, EE. UU.) con el uso de espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Xevo™ TQ-S MS (Waters MS Technologies, Manchester, Reino Unido).

### **Análisis transcriptómico**

Se compararon los transcriptomas de *bzr1-D* (número de acceso a la base de datos Gene Expression Omnibus GSE35408; Bai et al., 2012), *pif4* (número de acceso GEO GSE37160; Oh et al., 2012) y *bbx21-1* en sombra (Crocco et al., 2010), para encontrar genes corregulados por las proteínas BZR1, PIF4 y BBX21. Entre estos genes, se seleccionaron *PACLOBUTRAZOL RESISTANCE1 (PRE1)*, *PRE3*, *ARABIDOPSIS MYB-LIKE 2 (MYBL2)*, *BINDING BHLH 1 (IBH1)*, *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 (PIF4)*, *INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 1 (IAA1)*, *IAA4* y *EXPANSIN 11 (EXP11)* para validar la expresión diferencial entre la luz blanca y la sombra simulada en *bbx21-1* y WT mediante RT-qPCR. Las secuencias de primers utilizadas se enumeran en el Cuadro 1.

### **Cuantificación de expresión génica por RT-qPCR**

Para las mediciones de expresión génica mediante qPCR, se recolectaron 100 mg de plántulas frescas, que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. El ARN total se extrajo usando el kit Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Las preparaciones de ARN crudo se trataron con 1,5 unidades de ADNasa I libre de ARNasa (<http://www.promega.com>). El ADNc se sintetizó a partir de 2 µg de templado de ARN libre de ADN utilizando oligo(dT) como primer y la transcriptasa inversa M-MLV (<http://www.promega.com>). Los análisis de RT-qPCR se realizaron utilizando LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche, <https://www.roche.com/>) y el sistema de PCR en tiempo real LightCycler 480 II (<https://www.roche.com/>).

## **Sección II: Caracterización de la morfología y fisiología de plantas de *A. thaliana* y de *S. tuberosum* sobreexpresantes de *BBX21* creciendo en condiciones óptimas.**

### **Condiciones de crecimiento y diseño experimental**

Los experimentos con plantas de papa y *Arabidopsis* se realizaron en un invernáculo, ubicado en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (34° 35' S, 58° 29' O), con radiación natural (PAR= 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y temperaturas que oscilaron entre 18° y 22 °C. Los experimentos se realizaron entre los meses de marzo y noviembre, con un fotoperiodo de alrededor de 13,5 horas. Para los experimentos de papa se sembraron tubérculos brotados previamente, de tamaño similar entre sí, en macetas de 500 cm<sup>3</sup>. La mezcla de suelo consistió en vermiculita (1/6), turba (1/6), perlita (1/6) y tierra (3/6). Las macetas se regaron diariamente a capacidad de campo, entendiendo como capacidad de campo en esta tesis al contenido de agua retenido en el sustrato de la maceta luego de haber sido regado a saturación y drenado por gravedad hasta alcanzar un equilibrio, y se fertilizaron dos veces durante el experimento con triple 15 (15% de nitrógeno, 15% de fósforo y 15% de potasio). Para los experimentos de tamaño y peso de tubérculos, se utilizaron macetas de 4000 cm<sup>3</sup>, con la misma mezcla de suelo descrita anteriormente e igual riego y fertilización. Para los experimentos de *A. thaliana*, las semillas se sembraron en macetas de 110 cm<sup>3</sup>, en una mezcla de vermiculita (1/3), turba (1/3) y perlita (1/3).

En todos los casos se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Las comparaciones de medias entre las líneas de control y transgénicas se realizaron con la prueba *t* de Student o ANOVA según se indique. Los análisis se llevaron a cabo utilizando Prism (GraphPad Software).

### **Determinaciones anatómicas y morfológicas**

Las muestras de la parte central de la hoja se diafanizaron utilizando la técnica de Dizeo de Strittmatter (Dizeo de Strittmatter, 1973) y se tiñeron con safranina. Además, se incrustaron secciones transversales de hojas y tallos (apical, medio y basal) en parafina y se cortaron en serie de 10 a 12 mm con un micrótopo rotatorio tipo Minot. Las secciones se tiñeron con safranina-fast green (Johansen, 1940), se fotografiaron con un microscopio óptico Zeiss Axioplan, y se analizaron con el software Zeiss AxioCam ERc 5s (Jena). Las mediciones se

realizaron en tres réplicas biológicas con 10 réplicas técnicas para cada genotipo. Las fotos se tomaron con luz polarizada.

El largo y el ancho de las hojas de *A. thaliana* fueron medidos utilizando una regla en plantas de 35 días de edad. También se contabilizó el número de ramificaciones secundarias en floración.

### **Determinaciones de clorofila, antocianinas y fenoles**

Las determinaciones de clorofila se realizaron en las hojas basales de plantas de utilizando un SPAD 502 (Minolta) y calculando los niveles de clorofila según el método descrito por Moran (1982). Se recolectaron discos foliares (6 mm de diámetro) de la tercera hoja completamente expandida de plantas de 28 días de edad para cuantificaciones de antocianinas y fenoles por espectrofotometría. Cada muestra biológica estaba compuesta por dos discos independientes. La cuantificación de las antocianinas se realizó según lo descrito por Deikman y Hammer (1995). El contenido fenólico total se determinó según Waterman (1994). En los experimentos de restricción hídrica, las determinaciones de clorofila se realizaron en hojas basales de plantas de 42 días de edad, y para las cuantificaciones de antocianinas por espectrofotometría se recolectaron discos de hojas de la cuarta hoja completamente expandida de plantas de 42 días de edad. Cada muestra biológica fue el promedio de dos discos de hojas independientes.

Para las determinaciones por HPLC, se estimaron los fenólicos de las hojas individuales como describen Keinänen et al. (2001) y Demkura et al. (2010). Los fenólicos se separaron mediante HPLC (Knauer Euroline) en una columna Restek Pinnacle II C18 (5,0 mm, 4,6 3 150 mm). Se compararon los tiempos de retención y los espectros UV-visible del ácido clorogénico y la quercetina con los de los estándares verdaderos de Sigma-Aldrich.

### **Mediciones de fotosíntesis, transpiración y conductancia estomática**

La tasa neta de fotosíntesis, la conductancia estomática, la tasa de transpiración y la concentración de CO<sub>2</sub> de la cavidad estomática (C<sub>i</sub>) se midieron en plantas de 28 días de edad utilizando un sistema de análisis de gas infrarrojo abierto (Li-Cor 6400). Las funciones de luz se midieron a 0, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000, 1500 y 2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

La Densidad de Flujo de Fotones Fotosintéticos (PPFD) se realizó en hojas completamente expandidas utilizando la cámara de fuente de luz LED 6400-02B. El flujo de aire y la

concentración de CO<sub>2</sub> en la celda de referencia (CO<sub>2</sub>R) fueron controlados automáticamente por el equipo a 300 mmol s<sup>-1</sup> y 400 mmol s<sup>-1</sup> (ppm), respectivamente. La eficiencia de uso instantáneo del agua (EUA) se estimó como la proporción de asimilación y transpiración de carbono (tasa neta de fotosíntesis / tasa de transpiración).

### **Análisis de expresión génica**

Se recolectaron muestras de hojas de plantas de 21 días de edad y se molieron en nitrógeno líquido. El ARN total se extrajo de las muestras congeladas utilizando el kit RNeasy Plant Mini (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se sintetizó ADNc de cadena simple a partir de 1,5 mg de templado de ARN libre de ADN utilizando primer oligo(dT) y la transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen). El análisis de RT-qPCR se realizó en una placa óptica de 96 pocillos utilizando SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems) y el sistema de PCR en tiempo real ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). Los pares de primers específicos de genes se diseñaron utilizando Beacon Designer 7.0 (Premier Biosoft). Los primers utilizados en este trabajo se enumeran en el Cuadro 1. La expresión de cada gen se normalizó a la expresión de β-tubulina (*TUB*) en el caso de *S. tuberosum*, y a la expresión de poliubiquitina 10 (*UBQ10*) en el caso de *A. thaliana*. Cada tratamiento se estandarizó a la expresión del genotipo sin transformar (Spunta y Col-0, respectivamente).

### **Sección III: Estudio del comportamiento de las plantas de *S. tuberosum* sobreexpresantes de *BBX21* creciendo en ambientes con riegos restringidos.**

#### **Condiciones experimentales para evaluar el crecimiento vegetativo en restricción hídrica**

Los experimentos con plantas de papa y *A. thaliana* se realizaron en un invernáculo, ubicado en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, con radiación natural (PAR= 500 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y temperaturas que oscilaron entre 18° y 25 °C. Para cada experimento, se sembraron 16 tubérculos brotados de tamaño similar en macetas de 1000 cm<sup>3</sup>. La mezcla de suelo consistió en vermiculita (1/3), turba (1/3) y perlita (1/3). Las macetas se regaron diariamente por 28 días a capacidad de campo y se fertilizaron durante el experimento con HAKAPHOS® rojo. Después del día 28, el riego se restringió al 35% de la capacidad del campo durante 14 días. Para evaluar el nivel de restricción de agua, las macetas se pesaron todos los días durante el experimento y se regaron cuando fue

necesario. Se midió el potencial agua ( $\Psi_a$ ) de la cuarta hoja totalmente expandida en plantas de 42 días de edad después del tratamiento de restricción hídrica, utilizando un cámara de presión tipo Scholander (Bio-Control, Buenos Aires, Argentina).

### **Condiciones de crecimiento para evaluar el rendimiento de tubérculos en restricción hídrica**

Se realizaron cuatro experimentos independientes entre marzo y noviembre, con un fotoperiodo de alrededor de 13,5 h. Para cada experimento, se sembraron 16 tubérculos brotados de tamaño similar en macetas de 4000 cm<sup>3</sup>. La mezcla de suelo consistió en vermiculita (1/6), turba (1/6), perlita (1/6) y suelo (3/6). Las macetas se regaron diariamente a capacidad de campo y se fertilizaron durante el experimento con HAKAPHOS® rojo. Las plantas crecieron durante 96 días y luego fueron cosechadas. Para el tratamiento de estrés hídrico, las plantas se regaron diariamente a capacidad de campo durante 42 días. Después del día 42, el riego se restringió al 35% de la capacidad de campo durante 28 días, y luego las plantas se regaron nuevamente a la capacidad de campo hasta el día 96. Para evaluar el nivel de restricción hídrica, las macetas se pesaron todos los días durante el experimento y se regaron cuando fue necesario.

### **Determinaciones morfológicas en condiciones de restricción hídrica**

Se evaluaron la altura y el peso seco y fresco de las plantas. La altura del tallo principal se estimó antes del estrés hídrico (plantas de 28 días) y después del estrés hídrico (plantas de 42 días) con una regla. La parte aérea de plantas de 42 días se cosechó y se pesó con una balanza digital. El material se envolvió en un papel y se incubó a 60 °C durante 72 horas, y luego se volvió a pesar para obtener el peso seco.

### **Determinaciones de clorofila, antocianinas y fenoles**

Se utilizó la misma metodología descrita en la sección II de materiales y métodos de esta tesis.

### **Mediciones de fotosíntesis, transpiración y conductancia estomática**

Se utilizó una metodología similar a la descrita en la sección II de materiales y métodos de esta tesis, con las siguientes modificaciones.

Se determinaron las respuestas de la fotosíntesis neta y la tasa de transporte de electrones (J) a los niveles de CO<sub>2</sub> con la siguiente secuencia de concentraciones de CO<sub>2</sub> en la celda



de referencia (CO<sub>2</sub>R): 400, 300, 200, 100, 50, 400, 700, 1000 y 1500  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ , estableciendo PFD en 1500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  y el flujo de aire en 300  $\mu\text{mol seg}^{-1}$ . La concentración de C<sub>i</sub> y concentración de CO<sub>2</sub> en el cloroplasto (C<sub>c</sub>) se ajustaron al modelo de fotosíntesis basado en bioquímica de Farquhar et al. (1980). Por lo tanto, se estimó la tasa máxima de actividad carboxilasa de Rubisco (V<sub>cmax</sub>) y la tasa máxima de transporte de electrones fotosintéticos (J<sub>max</sub>) para cada tratamiento y genotipo. Las correcciones de temperatura para V<sub>cmax</sub> y J<sub>max</sub> se realizaron mediante las ecuaciones informadas por Bernacchi et al. (2002) y McMurtrie y Wang (1993), respectivamente, y también se ajustó el parámetro R<sub>d</sub> (respiración que ocurre durante el día, no relacionada con la fotorrespiración). J<sub>max</sub> también se estimó mediante el uso de mediciones de J empíricas realizadas por el analizador Li-6400 estableciendo la celda de referencia (CO<sub>2</sub>R) en 1500  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ .

### **Conductancia del mesófilo y parámetros no estomáticos**

La conductancia del mesófilo (g<sub>m</sub>) se estimó en ambos experimentos utilizando el método de la variable (Bongi y Loreto, 1989; Harley et al., 1992) mediante la siguiente ecuación:

$$g_m = \frac{\text{fotosíntesis neta}}{C_i - \Gamma^* \frac{\text{ETR} + 8 (\text{fotosíntesis neta} + R_d)}{\text{ETR} - 4 (\text{fotosíntesis neta} + R_d)}}$$

Donde R<sub>d</sub> es la respiración que ocurre durante el día, no relacionada con la fotorrespiración;  $\Gamma^*$  es el punto de compensación de CO<sub>2</sub> en ausencia de R<sub>d</sub>; y ETR es la tasa de transporte de electrones. La fotosíntesis neta, ETR y C<sub>i</sub> se midieron con el sistema Li-6400,  $\Gamma^*$  se obtuvo de la literatura a la temperatura de medición (25 °C; Bernacchi et al., 2002), y R<sub>d</sub> se estimó indirectamente para cada tratamiento con el método propuesto por Yin et al. (2011), basado en mediciones combinadas de fotosíntesis y fluorescencia en un rango de irradiancias bajas.

La concentración de CO<sub>2</sub> en el cloroplasto (C<sub>c</sub>) también se estimó mediante la siguiente ecuación (Sáez et al., 2018):

$$C_c = C_i - \frac{\text{Fotosíntesis neta}}{g_m}$$

Para evaluar otras limitaciones no estomáticas relacionadas con la afinidad bioquímica de la fotosíntesis por unidad de CO<sub>2</sub> disponible, se utilizó la relación entre la fotosíntesis neta y C<sub>c</sub> (fotosíntesis / C<sub>c</sub>).

### **Bioensayos de ABA en hojas cortadas y en planta entera**

Para los bioensayos con hojas cortadas, se tomaron muestras de la tercera a la quinta hoja expandida de plantas de papa de tres semanas de edad, que crecieron en una cámara de luz blanca (PAR= 200 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) con un fotoperiodo de 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad a 22 °C, para determinar el tamaño de las células de guarda y densidad estomática en la capa epidérmica abaxial. Las hojas escindidas se suspendieron en una solución de apertura de estomas (KCl 15 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM y MES-KOH 10 mM, pH 6,15), se incubaron en luz a 22 °C durante 3 horas, y luego se expusieron a una solución que contenía 1 μM o 10 μM de ABA, durante 1 hora. Se tomaron las capas epidérmicas abaxiales de las hojas y se colocaron en portaobjetos de microscopio. Se recolectaron un total de 15 hojas de cinco plantas de Spunta sin transformar y de *BBX21-OE* y se seleccionaron al azar más de 100 estomas de cada línea, que se midieron para calcular la apertura de los estomas (la relación entre el ancho y el largo).

Para los bioensayos de ABA con plantas enteras de 21 días de edad, se usaron plantas bien regadas, creciendo en un invernáculo bajo radiación natural. En esas condiciones, se rociaron hojas con diferentes diluciones de ABA al inicio del fotoperíodo. La solución con ABA (99% de pureza, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) se disolvió en un pequeño volumen de etanol al 96% para preparar soluciones de ABA de concentración 2, 5 y 100 μM que contenían un 0,01% de Silwet®. Como control, se preparó una solución sin ABA (0 μM). Se midió tasa de fotosíntesis, gs, gm y C<sub>c</sub> a los 90 minutos después de la aplicación de ABA.

### **Determinaciones de ABA**

Las determinaciones de ABA se realizaron en el Laboratorio de Fisiología Vegetal, Univ. Nacional de Rio Cuarto, Córdoba, Argentina.

El análisis de fitohormonas se realizó en tejido recogido en nitrógeno líquido, que posteriormente fue liofilizado y conservado a -20 °C. Las muestras se trituraron hasta convertirlas en polvo con un mortero, y se pesaron para trabajar con 100–200 mg por muestra. La extracción se realizó con 2 ml de agua desionizada (pH: 2,8) a 4 °C durante 30

minutos. Después de la centrifugación (15 minutos velocidad máxima), se recogió el *buffer* y luego se volvió a extraer el pellet con 2 ml de *buffer* nuevo (pH: 2,8). Se añadieron alícuotas de 50 ng de ABA deuterado (proporcionado por Olchelm Ltd, República Checa) como estándares internos. Los extractos se transfirieron a otros tubos, se mezclaron con acetato de etilo y se repartieron. Luego se extrajo la fase orgánica y se evaporó a 37 °C en Speed-Vac. Los extractos secos se disolvieron en 50 µL de metanol (100%) y se colocaron en viales.

Los análisis de cromatografía líquida se realizaron utilizando una bomba cuaternaria Alliance 2695 (Separation Module, Waters, EE. UU.) equipada con muestreador automático. Se utilizó una columna Restek C18 (Restek, EE. UU.) (2,1 x 100 mm, 5 µm) a 28 °C, con un volumen inyectado de 10 µL. El sistema de disolvente binario utilizado para el gradiente de elución consistió en ácido acético al 0,2% en H<sub>2</sub>O (disolvente B) y MeOH (disolvente A), a un caudal constante de 200 µL min<sup>-1</sup>. Se aplicó un perfil de gradiente lineal con las siguientes proporciones (v/v) de disolvente A [t(min), % A]: (0, 40), (25, 80), con 7 minutos para el reequilibrio.

Las mediciones de MS/MS se realizaron en un espectrofotómetro de masas de doble cuadrupolo Micromass Quatro Ultima<sup>TM</sup> PT (Micromass, Manchester City, Reino Unido). Todos los análisis se realizaron utilizando una fuente de pulverización de iones turbo (ESI) en modo de iones negativos con los siguientes ajustes: voltaje capilar -3250 V, cono de energía 35 V, RF Lens1 (20), RF Lens2 (0,3), T° 100 °C, T° de solvatación 350 °C, cono de gas 100 L h<sup>-1</sup>, de solvatación de gas 700 L h<sup>-1</sup>, potencial celda de colisión de 15 V y multiplicador (650). Los parámetros de MS/MS se optimizaron en experimentos de infusión utilizando soluciones estándar individuales de cada hormona. Los iones del producto MS/MS se produjeron por disociación activada por colisión de iones precursores seleccionados en la celda de colisión del espectrómetro de masas de doble cuadrupolo, y la masa se analizó utilizando el segundo analizador del instrumento. En modo negativo, el espectro de cada hormona dio una molécula desprotonada [M - H]. La cuantificación se realizó mediante inyección de muestras en modos de monitoreo de reacción múltiple (MRM), ya que muchos compuestos podrían presentar la misma masa molecular nominal. La combinación de masa parental e iones de fragmentos únicos se utilizó para controlar selectivamente las hormonas. Los datos se adquirieron y se analizaron usando el software

MassLynx<sup>TM</sup> 4.1 y QuanLynx<sup>TM</sup> 4.1 (Micromass, Manchester, Reino Unido). Para la cuantificación, los valores se obtuvieron a partir de una curva de calibración previamente construida utilizando cantidades conocidas de cada hormona y su estándar puro (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) / Relación estándar interno deuterado.

### **Preparación y secuenciación de la biblioteca de secuencias de ARNm**

Se realizó un RNA-Seq para identificar el transcriptoma regulado por *BBX21* asociado con una restricción hídrica en plantas de papa. Las plantas de la variedad Spunta y del genotipo sobreexpresante de *BBX21* de la línea CH2 se regaron diariamente a capacidad de campo durante 28 días y luego se restringió el agua al 35% de capacidad de campo durante 14 días adicionales. Se recolectó tejidos vegetales de plantas de 42 días. Las muestras que comprenden hojas combinadas de al menos 6 plantas independientes se recolectaron al mediodía. El ARN total de 3 réplicas biológicas independientes se extrajo con el kit Spectrum Plant Total RNA (Sigma-Aldrich). Las bibliotecas se prepararon utilizando el kit de preparación de muestras de ARNm trenzado TruSeq v2 (ref. RS-122-2101 / 2) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, se usó 1 µg de ARN total para la selección de ARNm con cola poli(A) usando perlas magnéticas Oligo(dT), y posteriormente los ARNm se fragmentaron hasta aproximadamente 300 pb. El ADNc se sintetizó usando transcriptasa reversa (SuperScript II, ref. 18064-014, Invitrogen) y primers aleatorios. La segunda hebra del ADNc incorporó dUTP en lugar de dTTP. Además, se utilizó ADN de doble hebra para la preparación de la biblioteca. El ADN de doble hebra se sometió a colas A y ligadura de los adaptadores Truseq con código de barras. Todos los pasos de purificación se realizaron usando AMPure XP Beads (ref. A63881). La amplificación de la biblioteca se realizó mediante PCR utilizando el cóctel de primers suministrado en el kit. Las bibliotecas finales se analizaron utilizando Fragment Analyzer (DNF-473) para estimar la cantidad y la distribución del tamaño de verificación y luego se cuantificaron mediante qPCR utilizando el kit de cuantificación de bibliotecas KAPA (ref. KK4835, KapaBiosystems) antes de la amplificación con cBot de Illumina. Las bibliotecas se secuenciaron 1 x 50 en HiSeq 2500 de Illumina. El RNAseq fue realizado por el Centro de Regulación Genómica (CGR), Barcelona, España.

### Análisis de RNA-seq y expresión de qRT-PCR

Para el análisis de datos de RNA-seq, en primer lugar se identificaron genes que están regulados positiva o negativamente por el estrés hídrico en los transcriptomas de Spunta sin transformar, mediante un análisis estadístico (*fold-changes* > 2). Luego, se contrastaron los niveles de expresión detectados en Spunta sin transformar con los detectados en los transcriptomas de plantas transgénicas *BBX21-OE* para identificar genes regulados por *BBX21* bajo restricción hídrica mediante análisis dCHIP. DNA-Chip Analyzer (dChip) es un paquete de software que implementa el análisis de expresión basado en modelos de matrices de oligonucleótidos y varios procedimientos de análisis de alto nivel. El análisis de alto nivel en dChip incluye análisis comparativo y agrupamiento jerárquico. El software está disponible gratuitamente para los usuarios académicos en [www.dchip.org](http://www.dchip.org). Se seleccionaron aquellos transcritos cuyos niveles de expresión disminuyeron por restricción hídrica en Spunta, pero fueron constitutivamente regulados de forma negativa en las plantas *BBX21-OE*, independientemente de la condición del agua. A partir de este grupo de genes, se buscaron homólogos entre *S. tuberosum* y *A. thaliana* para confirmar su expresión mediante qRT-PCR. Para la qRT-PCR, se recolectaron muestras de hojas de plantas de 42 días de edad y se procedió como fue descrito anteriormente en esta tesis. La expresión de cada gen se normalizó a actina (*ACT*) y cada tratamiento se normalizó a la expresión de Spunta sin transformar.

**Cuadro 1: Primers usados para genotipado por PCR y cuantificación de la expresión génica por qPCR en plantas de Arabidopsis y papa.**

Cuantificación de transcripción génica para cuantificación por qPCR en plantas de <i>A. thaliana</i> (sección I)	
Nombre	Secuencia
AtPRE1 sen	TTGACAATCTGAGCGAGCGT
AtPRE1 ant	TAATAACGGCGGCTTCAGGG
AtPRE3 sen	ACTCAGACACTGCACAAGCT
AtPRE3 ant	GACCCAAGCAGAAGTGACGA
AtMYBL2 sen	GGGAAGATTGCCAGGACGAA
AtMYBL2 ant	TTGGTGTGATGGTGGAGACG
AtIBH1 sen	AGTAACCAGAGAGCTCCGGT
AtIBH1 ant	TGCATGACCTTGACCTGCAT
AtPIF4 sen	ACTTCTCCTCCCCTTCTTCTCAAC

AtPIF4 ant	TGGACTTAGGCTTAACCGTCTCTG
AtIAA1 sen	ACAAGCGCAAGAACAACGAC
AtIAA1 ant	TGGAGCTCCGTCCATACTCA
AtIAA4 sen	GCAACAGAGCTGAGATTGGG
AtIAA4 ant	CCTTTGGAGGAGAAGCGGTT
AtEXP11 sen	GAGATCTTTACTCGGCGGGG
AtEXP11 ant	AGCATTCTCCGCAAGAAGCT
AtDWF4 sen	TTGGAGATGGCAACAGCA
AtDWF4 ant	CATAGCCTTGGCCCTCCT
AtBR6OX1 sen	ACGACAGGACGAACCACTC
AtBR6OX1 ant	TAGTTTTCCCTTAGGACCCCA
AtBR6OX2 sen	CTAATGAGAGGCTCGTTGCTTTC
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>
AtPRE5 sen	GGCGTCGTTCTGATAAGGTG
AtPRE5 ant	AACAGAGTCAAGAAGCTGCGA
AtBZR1 sen	TGGTGGCATTCTTCTTCTTCC
AtBZR1 ant	GGCAACGGTTTCGGGTTCTTAG
AtARL sen	GTCGCAGAACAGTCCAAGG
AtARL ant	TGAGACCAACAAGCACAACC
AtHFR1 sen	TGCCATCGCCGCTAATTCCG
AtHFR1 ant	ACCAAACCGTGAAGAGACTGAGG
AtATHB2 sen	TGAGCCCACCCACTACTTTGAC
AtATHB2 ant	AGGAGCCCACGCATTGACC
AtPIL1 sen	ATTCCCAAAGTCTGCGTCCG
AtPIL1 ant	TGGCGAGCGATAATAACTAAAACC
AtUBQ10 sen	GGCCTTGTATAATCCCTGATGAATAAG
AtUBQ10 ant	AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT
<b>Genotipado por PCR de plantas de <i>A. thaliana</i> (sección I)</b>	
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>
Atbbx21genotip sen	CGTGACTGCATGCCATGAA
Atbbx21genotip ant	TTGTGTGTTCGTTCCGAGC
LB1.3	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC
AtbZR1-D genotip sen	CCGAGTCCTTCTCGCGGTGAAC
AtbZR1-D genotip ant	GTTTCTCATATTCCAATGACATG
<b>Cuantificación de transcripción génica por qPCR en plantas de <i>S. tuberosum</i> (sección II)</b>	
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>

StTUB sen	AACCTCCATTCAGGAGATGTTT
StTUB ant	TCTGCTGTAGCATCCTGGTATT
StRCA1 sen	ACTGGGCACCAACCAGAGAA
StRCA1 ant	AGGGAAGGCATCGACAAGCC
StLHCB1 sen	TCTTGGCCATCTGGGCTTGC
StLHCB1 ant	TGGGTCAAAGCTGCCACCAG
StFtsz1 sen	CAGTCTGCTGCCGAGAACCC
StFtsz1 ant	GACTCCTCCGCTGCCTGTTC
StPAL1 sen	CATCTCCACAATGGCTTGG
StPAL1 ant	TTGGAAGTTGCCACCATGT
StCHS sen	CTATGGCAATATGTCAAGT
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>
StCHI A sen	TGCCCTTGACGGGTAAGCAA
StCHI A ant	GGCACCAGGTGGGAAGGTTT
StF3H sen	ACATTCGGATCCTGGTGGCA
StF3H ant	GTTGTTGCGTCCGACCTGAA
<b>Cuantificación de transcripción génica por qPCR en plantas de <i>A. thaliana</i> (sección II)</b>	
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>
AtFD1sen	AAGAGGTCTGAATGCGAAGAA
AtFD1ant	GTCGGATAAGCCACACAGGT
AtRCA sen	TCGTTGAGAGCCTTGGAGTT
AtRCA ant	CTGAGGTAGGTCTCGGCAAG
AtLHCA1 sen	CGCTTATGAGCTGTGGCATA
AtLHCA1 ant	CGCTGGAACCTTCTTCAAGTC
AtCHS sen	CGGCGTCGACATGCCTGGTG
AtCHS ant	AGTACCGCCGGCGAAGCAAC
AtCHI sen	CGGGATCGCTGTGATCGAGA
AtCHI ant	GCCAGGTGACACACCGTTCT
AtF3H sen	AAGGTTGGGTGAAAGTGACG
AtF3H ant	TCAGTGTGACGCTTGAGTCC
<b>Cuantificación de transcripción génica por qPCR en plantas de <i>S. tuberosum</i> (sección III)</b>	
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>
StACTIN sen	AGGAGCATCCTGTCCTCCTAA
StACTIN ant	CACCATCACCAGAGTCCAACA
StMYB73 sen	CATGCCCCGATTCGGTAAC
StMYB73 ant	TTGATCGGCGAGTTCGTT

StSLAH3 sen	TGCTGTTGGATTGGCTCA
StSLAH3 ant	CGACCCTTGGATCGTTGT
StDREB2 sen	CGGGCGGTGCAAGTATAG
StDREB2 ant	ACATTGCCCTTGCAGCTT
StEGY1 sen	TGCTGCTTTTGTGGCTGA
StEGY1 ant	AGGCAGCACATTCCCAAG
StSAP12 sen	TGCAAGGGGATTTTGACC
StSAP12 ant	CCAACGGCTGTGATGATG
StTIP2-1 sen	ATGGCGAAAATTGCTATTGG
StTIP2-1 ant	AGGGTTGAGATGACCACCAG

**Cuadro 2: Gen ID de los genes usados en esta tesis.**

<b>Gen</b>	<b>ID</b>
<i>BBX21</i>	AT1G75540
<i>DWF4</i>	AT3G50660
<i>BR6OX1</i>	AT5G38970
<i>BR6OX2</i>	AT3G30180
<i>PRE1</i>	AT5G39860
<i>PRE3</i>	AT1G74500
<i>MYBL2</i>	AT1G71030
<i>IBH1</i>	AT2G43060
<i>PIF4</i>	AT2G43010
<i>IAA1</i>	AT4G14560
<i>IAA4</i>	AT5G43700
<i>EXP11</i>	AT1G20190
<i>BZR1</i>	AT1G75080
<i>PRE5</i>	AT3G28857
<i>ARL1</i>	AT2G44080
<i>PIL1</i>	AT2G46970
<i>ATHB2</i>	AT4G16780
<i>HFR1</i>	AT1G02340
<i>UBQ10</i>	AT4G05320
<i>SlLHCB1</i>	PGSC0003DMG400008299
<i>SlRCA</i>	PGSC0003DMT400049256
<i>SlFTSZ1</i>	PGSC0003DMG400022200
<i>SlCHS</i>	PGSC0003DMT400022261
<i>SlFLS1</i>	PGSC0003DMT400036565
<i>SlF3H</i>	PGSC0003DMT400031149
<i>SlCHI</i>	PGSC0003DMG400028325



<i>StPAL1</i>	PGSC0003DMT400080765
<i>AtF3H</i>	AT3G51240
<i>AtFLS1</i>	AT5G08640
<i>AtCHI</i>	AT3G55120
<i>AtCHS</i>	AT5G13930
<i>AtRCA1</i>	AT2G39730
<i>ATFD1</i>	AT1G10960
<i>AtLHCA1</i>	AT3G54890
<i>MYB73</i>	PGSC0003DMT400064306
<i>DREB2</i>	PGSC0003DMT400069733
<i>EGY1</i>	PGSC0003DMT400066123
<i>SAP12</i>	PGSC0003DMT400001376
<i>RCA</i>	PGSC0003DMT400049256
<b>Gen</b>	<b>ID</b>
<i>ACTIN</i>	PGSC0003DMT400023429

## CAPITULO 3: RESULTADOS

El objetivo principal de esta tesis es poder elucidar el rol de las proteínas BBX21 en la regulación del crecimiento, tanto en el estadio de plántula como en plantas adultas, en respuesta a diferentes condiciones ambientales como el sombreado y el estrés hídrico.

Para facilitar la presentación de los resultados, este capítulo está separado en tres secciones, siguiendo cada uno de los objetivos particulares planteados.

Sección I: Evaluar la respuesta de BBX21 al agregado de hormonas en la red de señales que promueve el crecimiento en ambientes sombreados en plantas de *A. thaliana*.

Sección II: Caracterizar la morfología y fisiología de plantas de *A. thaliana* y de *S. tuberosum* sobreexpresantes de *BBX21* creciendo en condiciones óptimas.

Sección III: Estudiar el comportamiento de las plantas de *S. tuberosum* sobreexpresantes de *BBX21* creciendo en ambientes con riegos restringidos.

Sección I: BBX21 inhibe el crecimiento en sombra en plántulas de *A. thaliana* a través de la vía de señalización de brasinoesteroides.

La relación entre algunos miembros de la familia de BBXs, los BR y la sombra ha sido documentada previamente. Por ejemplo, BBX32, un represor de la fotomorfogénesis de las plántulas, interactúa con BZR1 y PIF3 para promover el cierre del cotiledón mediado por BR, sugiriendo que BBX32 puede integrar señales de luz y BR para el ajuste del desarrollo de las plántulas (Ravindran et al., 2021). Muy recientemente, se ha demostrado que BBX28 y BBX29 suprimen la fotomorfogénesis de las plántulas mediante la interacción física con BR-ENHANCED EXPRESSION 1 (BEE1), BEE2 y BEE3 aumenta los niveles de BZR1 para promover el alargamiento celular (Cao et al., 2022). En un estudio pionero conducido en nuestro laboratorio se seleccionaron plántulas de *A. thaliana* con hipocótilos largos cuando fueron cultivadas en condiciones de invernáculo con radiación natural o bajo un canopeo de pastos de raigrás por 4 días. La caracterización de una de esas líneas permitió identificar al mutante *lhus/bbx21-101*. La caracterización molecular y funcional de dos alelos de *bbx21-1* y *bbx21-2* en fondo Col-0 y Ler, respectivamente, demostró que BBX21 actúa en la señalización mediada por COP1 en sombra. Mediante arrays de Affymetrix ATH1 se observó que genes de la vía de biosíntesis y señalización de las auxinas, etileno y BR tenían su expresión significativamente aumentada en la mutante *bbx21-2* comparado

con el genotipo salvaje Ler, sugiriendo que BBX21 podría estar inhibiendo la expresión de los genes asociados a esas vías hormonales en las respuestas de elongación asociadas al SAS (Crocco et al., 2010).

En esta tesis se evalúan los mecanismos de BBX21 asociados a las vías hormonales que inhiben el crecimiento en plántulas de *A. thaliana* cultivadas en luz blanca y sombra simulada. Para esto, se llevaron a cabo experimentos fisiológicos y hormonales en plántulas de los ecotipos Col-0 y Ler, mutantes nulos *bbx21-1* y *bbx21-2*, y la línea sobreexpresante 35S:BBX21-YFP, junto con estudios comparativos de transcriptomas para identificar componentes moleculares asociados con BBX21 en el contexto de la señalización de escape al sombreado y los brasinoesteroides.

### **El mutante *bbx21* imita el fenotipo Ler en sombra con el inhibidor de BR**

En un trabajo previo de nuestro laboratorio, se demostró que BBX21 inhibe el crecimiento del hipocótilo de las plántulas de *Arabidopsis* bajo sombra simulada en parte a través de la señalización de COP1 (Crocco et al., 2010), pero también existen otros mecanismos adicionales. Dada la importancia de las hormonas en la promoción de la elongación del hipocótilo (particularmente en sombra) se decidió examinar los efectos de la aplicación de inhibidores sintéticos de hormonas: ácido naftil-talámico (NPA, inhibidor de auxinas), paclobutrazol (PAC, inhibidor de GA) y brassinazole (BRZ, inhibidor de BR), sobre la elongación del hipocótilo de plántulas Ler y *bbx21-2* bajo luz blanca y sombra. La longitud del hipocótilo fue corta y similar entre los genotipos bajo luz blanca (Fig. 3.1), mientras que el mutante *bbx21-2* tuvo hipocótilos más largos que Ler cuando las plántulas se cultivaron en un medio con PAC y NPA bajo sombra. Sin embargo, el inhibidor de BRZ (1  $\mu$ M) inhibió el alargamiento del hipocótilo de las plántulas *bbx21-2* para alcanzar los niveles de Ler bajo sombra (Fig. 3.1). El fenotipo *bbx21-2* imita el fenotipo de Ler bajo la sombra con el inhibidor de BRZ, lo que sugiere que los BR pueden mediar en el crecimiento del hipocótilo dependiente de BBX21.

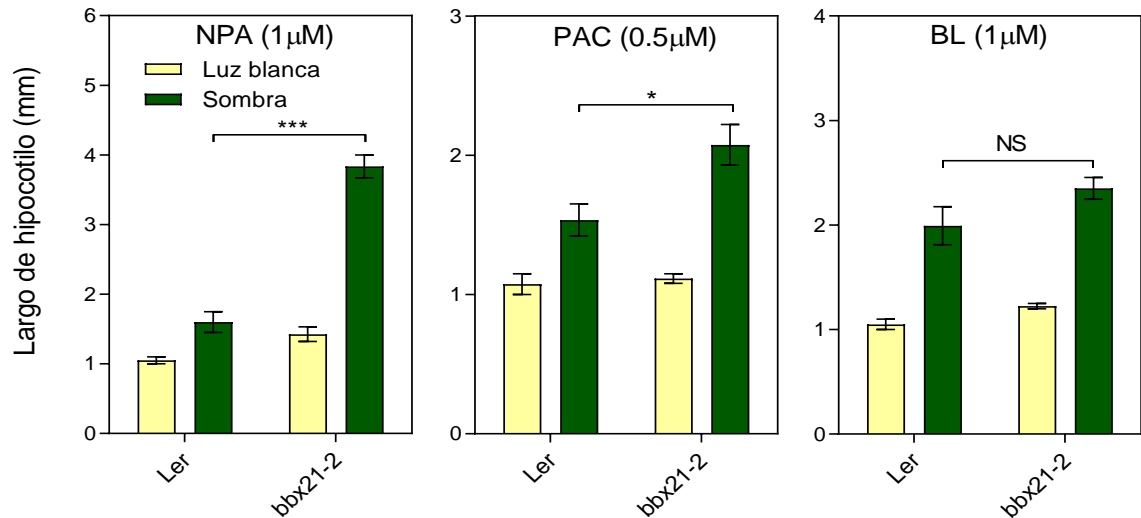


Figura 3.1: Largo del hipocótilo para plántulas Ler y *bbx21-2* en luz blanca y sombra con inhibidores sintéticos de auxina (NPA), giberelina (PAC) y brasinoesteroides (BZR). Las barras representan media  $\pm$  ES (n= 3). Los asteriscos indican que los genotipos difieren significativamente (prueba *t* de Student; \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; NS, sin diferencia significativa). Datos obtenidos por el Dr. Carlos Crocco.

### Col-0 y Ler imitan el fenotipo de hipocótilo del mutante *bbx21-1* y *bbx21-2* con agregado de 24-*epiBL* exógeno bajo condiciones de sombra

Para poder entender mejor la participación de los BR en el alargamiento del hipocótilo dependiente de BBX21, se compararon los fenotipos de Col-0, Ler y sus mutantes nulos *bbx21-1* y *bbx21-2*, respectivamente, con diferentes dosis del BR brassinolide (24-*epiBL*) y del inhibidor BRZ bajo luz blanca y sombra (Fig. 3.2). La adición de BR aumentó el alargamiento del hipocótilo independientemente del genotipo bajo luz blanca (Fig. 3.2). Sin embargo, los efectos del 24-*epiBL* fueron diferentes entre los genotipos bajo sombra (Fig. 3.2 y Fig. 3.3). En los dos genotipos salvajes, la elongación del hipocótilo aumentó y se saturó en concentraciones de 24-*epiBL* entre 0,5 y 1  $\mu\text{M}$ , mientras que los mutantes *bbx21-1* y *bbx21-2* mostraron hipocótilos constitutivamente más altos independientemente de las dosis de 24-*epiBL*. Por el contrario, dosis bajas de BZR (0,1  $\mu\text{M}$ ) suprimieron el alargamiento del hipocótilo de ambos mutantes *bbx21* con respecto a los de tipo salvaje bajo sombra (Fig. 3.2 y Fig. 3.3).

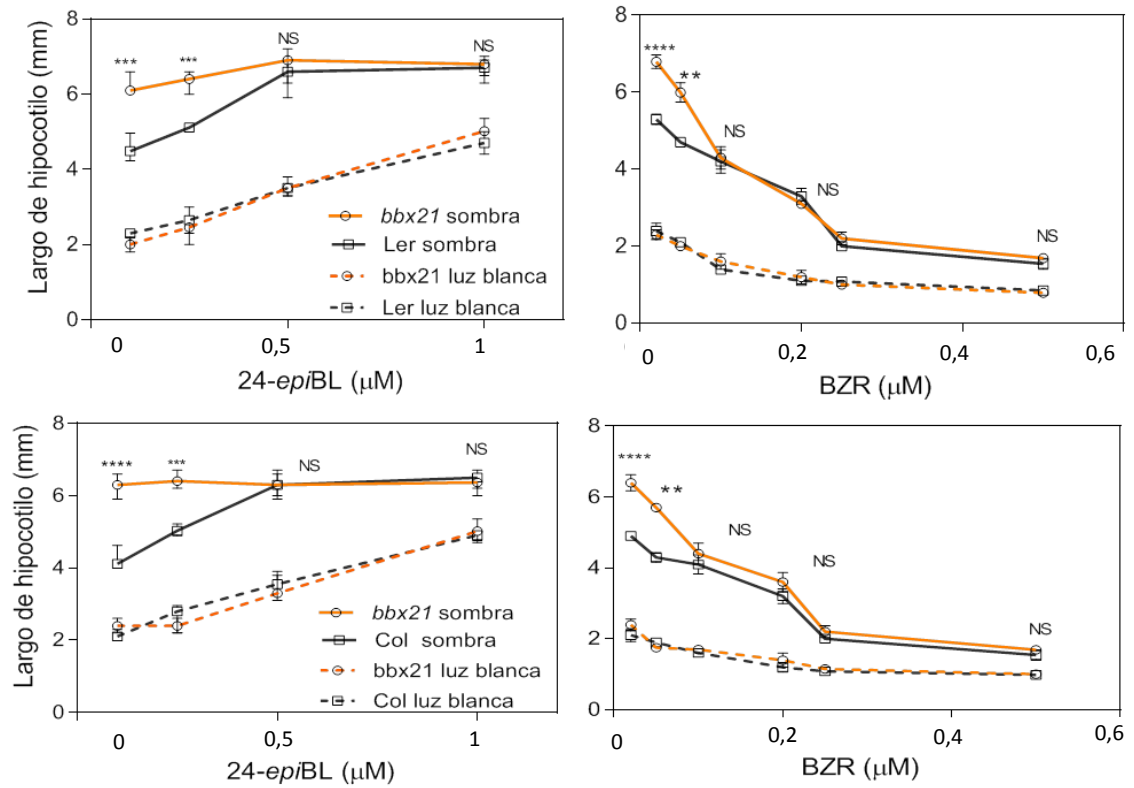


Figura 3.2: Curvas de respuesta a diferentes dosis de BZR y 24-epiBL en plántulas de Ler y *bbx21-2* y de Col-0 y *bbx21-1* creciendo durante 5 días en luz blanca y sombra. Cada punto indica media  $\pm$  ES (n= 3). ANOVA seguido de la prueba de Tukey para comparaciones entre medias. Los asteriscos indican diferencias significativas entre genotipos en sombra (\*\*\*\* P< 0,0001; \*\*\* P< 0,001; \*\* P< 0,01; NS, diferencia no significativa).

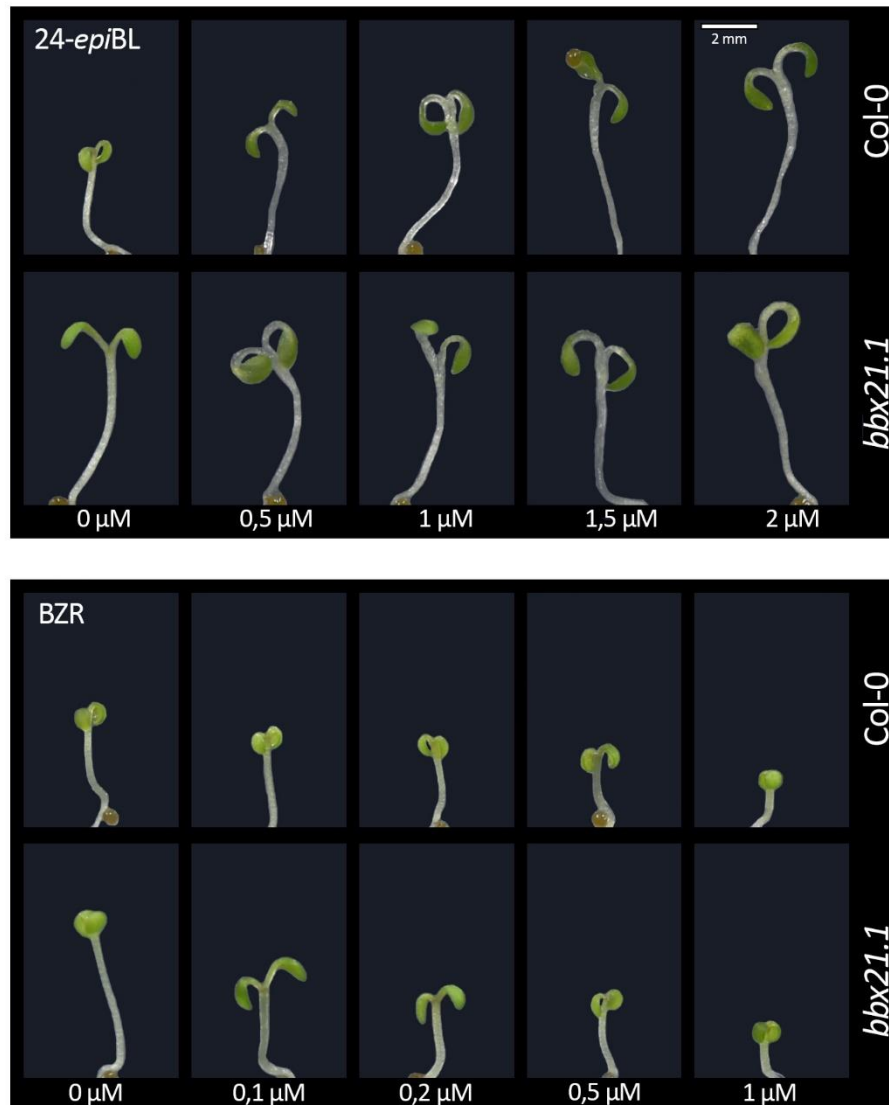


Figura 3.3: Fotografías de plántulas de Col-0 y *bbx21-1* expuestas a diferentes dosis de 24-*epiBL* y BZR, y crecidas en sombra durante 5 días. Barra de referencia 2mm.

Para confirmar estos resultados, se decidió evaluar el fenotipo de hipocótilo en plántulas Col-0 y la línea sobreexpresante constitutiva 35S:BBX21-YFP en un medio de agar suplementado con 24-*epiBL* 1 μM. La longitud del hipocótilo fue similar entre los genotipos bajo luz blanca. Sin embargo, la sobreexpresión de *BBX21* redujo significativamente el alargamiento del hipocótilo bajo la sombra (Fig. 3.4). La adición de 24-*epiBL* promovió la longitud del hipocótilo en Col-0, pero no tuvo efecto en la línea

35S:BBX21-YFP. Estos resultados sugieren que BBX21 actúa inhibiendo la respuesta de crecimiento del hipocótilo a través de la respuesta a los BR (Fig. 3.4).

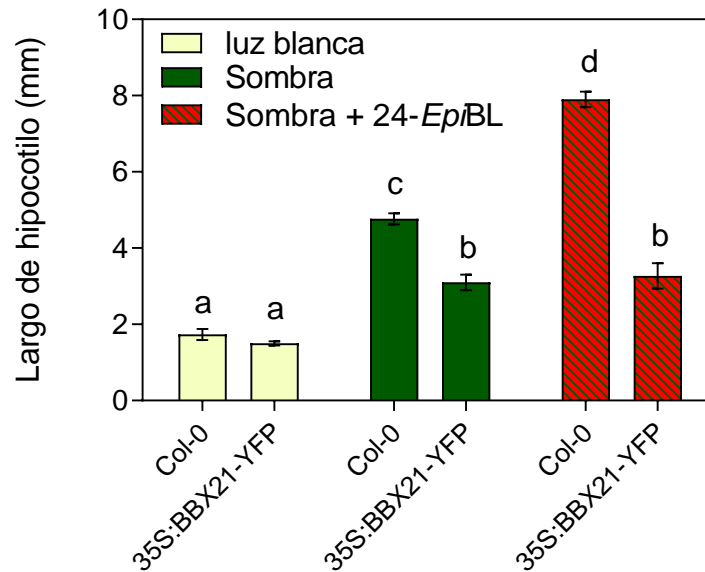


Figura 3.4: Largo de hipocótilo de Col-0 y la línea sobreexpresante 35S:BBX21-YFP bajo luz blanca, sombra y sombra + 24-*epiBL* 1  $\mu$ M. Las barras indican media  $\pm$  ES (n= 3). ANOVA seguido de la prueba de Tukey para comparaciones entre medias. Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias ( $P < 0,05$ ).

### **BBX21 inhibe la síntesis de BR activos e intermediarios, bajo luz blanca y sombra**

La respuesta a los BR en las plantas puede estar afectada por la vías de biosíntesis de BR activos (Fig. supl 1) o por la vía de la señalización mediada por los factores de transcripción BZR1 o su homólogo BES1 (Fig. 1.5) (Wang et al., 2012; Wang et al., 2014). Para comprender los mecanismos de acción de BBX21 en las respuestas a la sombra, se decidió investigar la síntesis de productos intermedios y finales de la ruta biosintética de BR en plántulas de Col-0 y *bbx21-1* crecidas por 5 días en luz blanca o sombra. Se cuantificó el contenido de 13 BR, incluidos 11 intermedios y 2 BR activos, brasinolide (BL) y su análogo menos activo 28-homobrasinolide (homoBL). El BL activo fue 3 veces mayor en *bbx21-1* que en Col-0 bajo luz blanca, y el homoBL fue 5 veces mayor en el mutante con respecto a Col-0 en ambas condiciones de luz (Fig. 3.5).

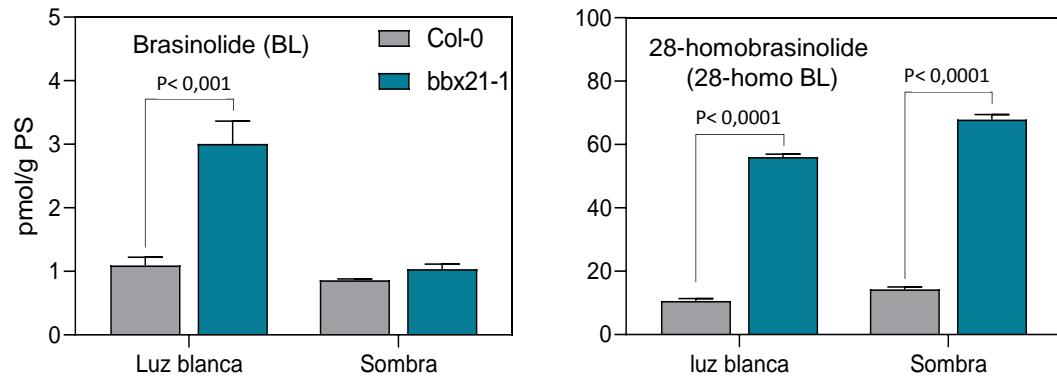


Figura 3.5: Contenido de BR activo en plántulas Col-0 y *bbx21-1* creciendo bajo luz blanca y sombra durante 5 días.

Cada barra indica media  $\pm$  ES (n= 3). ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey para comparaciones entre medias. Se indican las diferencias significativas entre genotipos en cada condición de luz (P < 0,05). PS, peso seco.

Cuatro intermediarios pertenecientes a la vía de biosíntesis C<sub>28</sub>-BR, que incluyen teasterona (TS), tifasterol (TY) y castasterona (CS), y dos intermediarios pertenecientes a las vías de biosíntesis C<sub>27</sub>-BR y C<sub>29</sub>-BR, como 28-nor castasterona (28-norCS) y 28-homo castasterona (28-homoCS), respectivamente, fueron significativamente más altos en el mutante *bbx21-1* que en Col-0 en ambas condiciones de luz (Fig. 3.6).



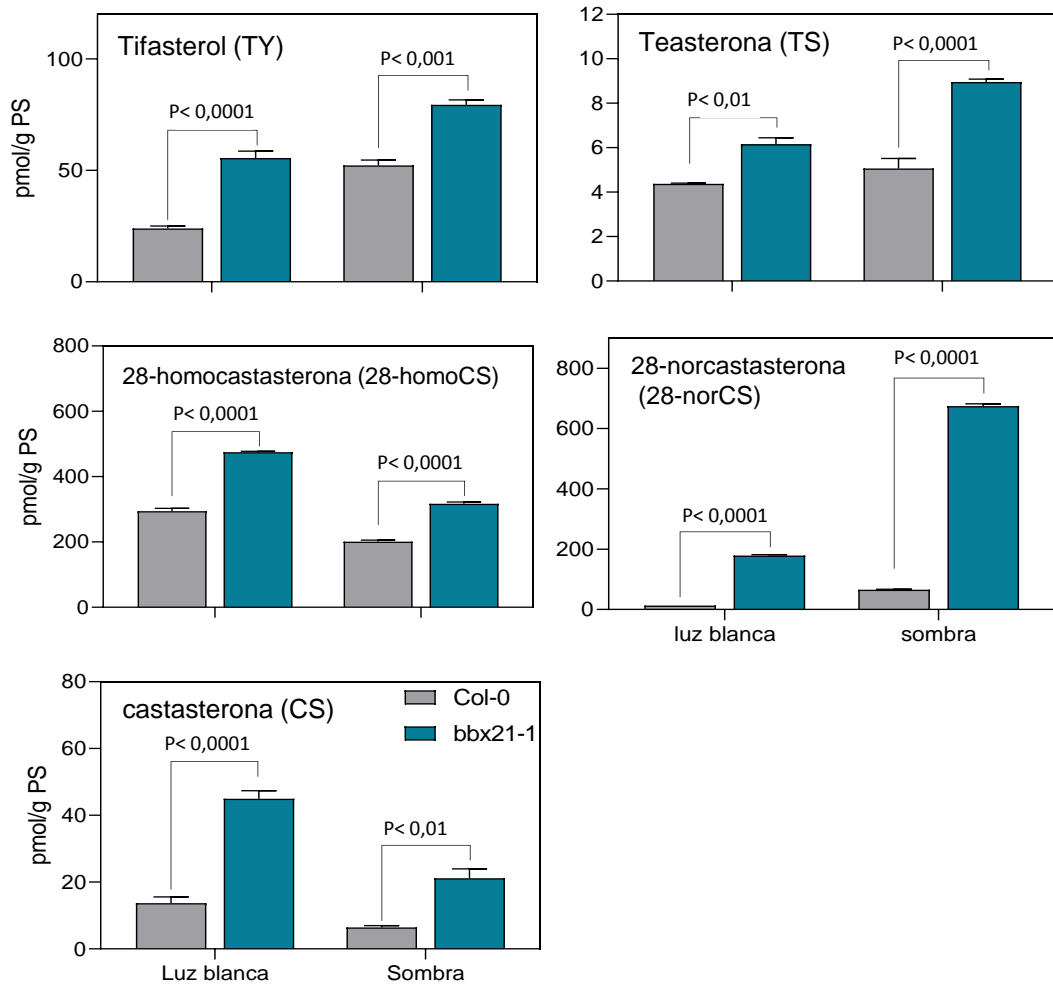


Figura 3.6: Precursores de la síntesis de BR en plántulas *Col-0* y *bbx21-1* creciendo bajo luz blanca y sombra durante 5 días.

Cada barra indica media  $\pm$  ES (n= 3). ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey para comparaciones entre medias. Se indican las diferencias significativas entre genotipos en cada condición de luz ( $P < 0,05$ ). PS, peso seco.

Además, campesterol (CR) y campestanol (CN) (dos esteroides importantes que son los precursores de la ruta de la oxidación de C6 para la síntesis de BR), fueron diferencialmente sintetizados entre *Col-0* y *bbx21-1*. El mutante *bbx21-1* presentó mayores niveles de CR que *Col-0* en luz blanca. Por otra parte, los niveles de CN fueron significativamente más altos en el mutante con respecto al genotipo salvaje (Fig. 3.7). Los niveles del compuesto intermediario 6-oxo campestanol (6-oxoCN) no se vieron afectados por BBX21, mientras que dos intermediarios de la biosíntesis de BR, 3-deshidro-6-deoxoteasterona (6-deoxo-3-DT) y 6-deoxotifasterol (6-deoxoTY), se vieron

disminuidos en el mutante *bbx21* bajo luz blanca y bajo sombra, respectivamente (Fig. 3.7). En conjunto, estos resultados sugieren que BBX21 regula la biosíntesis *de novo* de BR, reprimiendo bajo luz blanca y sombra la síntesis de precursores y de BR activos.

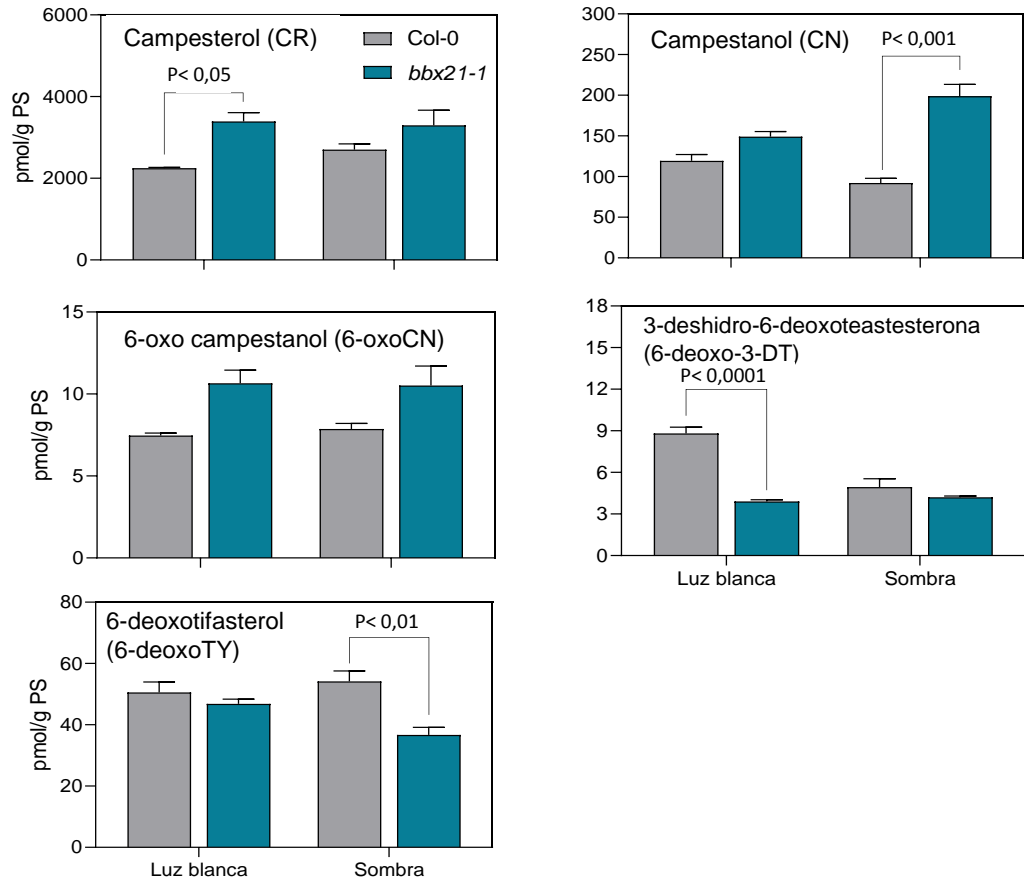


Figura 3.7: Precursores de la síntesis de BR en plántulas *Col-0* y *bbx21-1* creciendo bajo luz blanca y sombra durante 5 días.

Cada barra indica media  $\pm$  ES ( $n=3$ ). ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey para comparaciones entre medias. Se indican las diferencias significativas entre genotipos en cada condición de luz ( $P < 0,05$ ). PS, peso seco.

### BBX21 inhibe los genes de biosíntesis *DWF4*, *BR6OX1* y *BR6OX2*

Para comprender mejor el control de BBX21 en la biosíntesis de BR, se cuantificaron los niveles de expresión de tres genes involucrados en dicha vía, *DWF4* (que codifica para una enzima limitante de la velocidad de reacción entre los esteroides y los intermediarios de la ruta de oxidación de C6), y *BR6OX1* y *BR6OX2* (genes codificantes de dos enzimas de la ruta oxidación de C6 centrales que catalizan varias etapas metabólicas de los intermediarios BR; Shimada et al., 2001; Katsumata et al., 2008). La expresión de los tres genes aumentó

bajo luz blanca en el mutante *bbx21-1* en comparación con Col-0 (Fig. 3.8). Bajo la sombra, la expresión de *DWF4* fue significativamente menor en *bbx21-1* que en WT, mientras que la expresión de *BR6OX1* y *BR6OX2* fue similar entre ambos genotipos (Fig. 3.9). Estos resultados sugieren que BBX21 controla la expresión de enzimas críticas de las vías biosintéticas de BR bajo luz blanca y, por lo tanto, regula reprimiendo la síntesis de varios intermediarios y BR activos (Fig. 3.5, 3.6, 3.7).

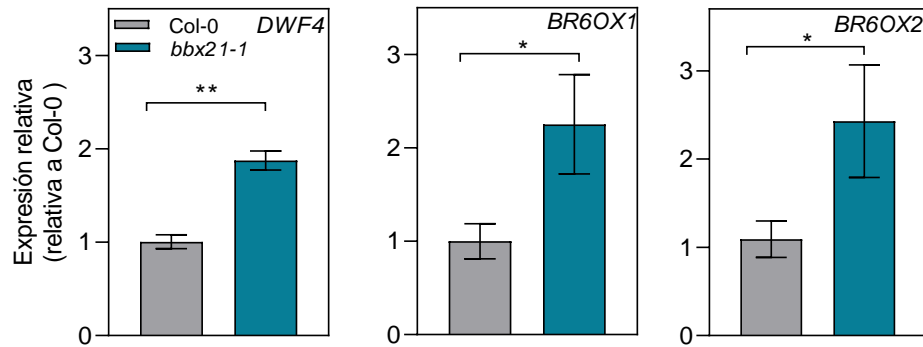


Figura 3.8: Expresión génica relativa medida por qRT-PCR de *DWF4*, *BR6OX1* y *BR6OX2*. Plántulas de Col-0 y *bbx21-1* creciendo bajo luz blanca durante 5 días. Cada barra indica media  $\pm$  ES (n= 3). Prueba *t* de Student para comparación entre dos medias (\*\* P< 0,01; \* P< 0,05).

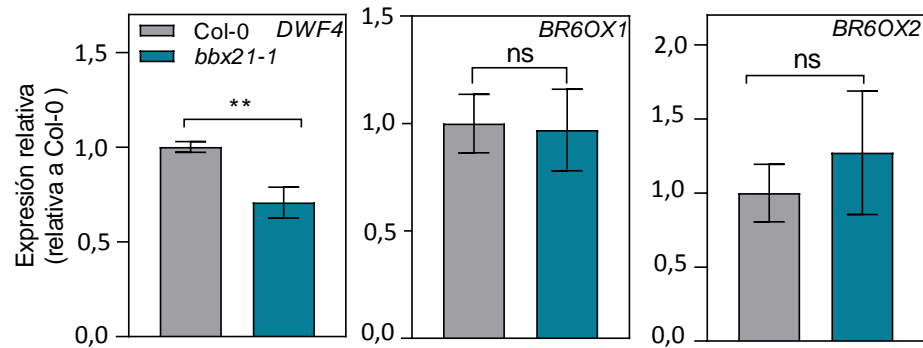


Figura 3.9: Expresión génica relativa medida por qRT-PCR de *DWF4*, *BR6OX1* y *BR6OX2*. Plántulas de Col-0 y *bbx21-1* creciendo bajo luz blanca suplementada con 1 hora de rojo lejano (RL) al final del fotoperíodo durante 5 días. Cada barra indica media  $\pm$  ES (n= 3). Prueba *t* de Student para comparación entre dos medias (\*\* P< 0,01; ns: diferencias no significativas).

### **La señalización de BBX21, BZR1 y PIF4 corregula la expresión génica bajo sombra**

En conjunto, todos estos resultados demuestran que BBX21 regula reprimiendo la expresión de *DWF4*, *BR6OX1* y *BR6OX2* bajo luz blanca (Fig. 3.8) y en consecuencia la biosíntesis de BR es fuertemente inhibida por BBX21 (Fig. 3.5). Sin embargo, estos resultados no explican completamente los mecanismos de acción de BBX21 en la inhibición del crecimiento de los hipocótilos en ambientes sombreados (Fig. 3.2 y 3.3). Para tener una mejor comprensión de la función BBX21 bajo la sombra en relación con las vías de los brasinosteroides, se revisaron tres transcriptomas publicados anteriormente con el fin de identificar genes corregulados entre los factores de transcripción BBX21, BZR1 y PIF4. Los PIFs son una familia de factores de transcripción de la familia bHLH (basic helix-loop-helix) que promueven la elongación del hipocotilo por crecimiento celular, dado principalmente, a través de la activación transcripcional de genes de señalización y síntesis de auxinas (Casal, 2013). Una baja relación R:RL provocado por los ambientes sombreados trae aparejado la foto-conversión de phyB a su forma inactiva Pr. Esto lleva a una relocalización en el núcleo de COP1 (Pacin et al., 2013) y a una rápida estabilización en la acumulación nuclear de PIF3, PIF4 y PIF5 (Lorrain et al, 2008; Pucciarello et al, 2018). Por otra parte, BZR1 es un factor de transcripción de la familia bHLH que promueve respuestas de crecimiento. BZR1 promueve la expresión de PRE1, un represor de HFR1 y PAR1. BZR1 y PIF4 heterodimerizan formando un complejo que se une a regiones promotoras de genes que co-regulan, relacionados a la síntesis y señalización de auxinas y remodelado de la pared celular (de Lucas & Prat, 2014; Oh, Zhu, & Wang, 2012).

En este análisis se compararon los 576 genes regulados por BBX21 bajo la sombra (Crocco et al., 2010) con los genes diana de BZR1 y PIF4 (3412 y 1538, respectivamente) que promueven el alargamiento del hipocótilo (Bai et al., 2012; Oh et al., 2012). Se identificaron 128 genes corregulados por BBX21, BZR1 y PIF4 que fueron ordenados en un análisis de Dchip en cinco grupos (Fig. 3.10). El grupo (a) incluye genes que son regulados por BBX21 y también son diana de BZR1 con regulación por BR, como *ARABIDOPSIS PIN-FORMED 7 (PIN7)*, *LEUCINE-RICH REPEAT/EXTENSIN 3 (LRX3)* y *ARABIDOPSIS MYB-LIKE 2 (MYBL2)*. El grupo (b) incluye genes regulados por BBX21 que también tienen sitios de unión a BZR1 con regulación BR y a PIF4, como *III BINDING BHLH 1 (IBH1)* y *OBF BINDING PROTEIN 4 (OBP4)*. El grupo (c) está

representado por genes corregulados por BBX21 y BZR1 sin regulación BR, incluidos *JASMONATE RESISTANT 1 (JAR1)*, *CYTOKININ RESPONSE FACTOR 2 (CRF2)* y *IAA-LEUCINE RESISTANT 1 (ILR1)*. El grupo (d) está representado por genes regulados por BBX21, que además poseen sitios de unión a BZR1 sin regulación BR y a PIF4, incluidos *ROOT PHOTOTROPISM 2 (RPT2)* y *NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 4 (NCED4)*. Finalmente, el grupo (e) incluye los genes regulados por BBX21 y que son diana de PIF4 como *PIF4*, *INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 1 (IAA1)* y *GAST1 PROTEIN HOMOLOG 4 (GASA4)*, entre otros (Fig. 3.10, Cuadros suplementarios 3.1 a 3.5).

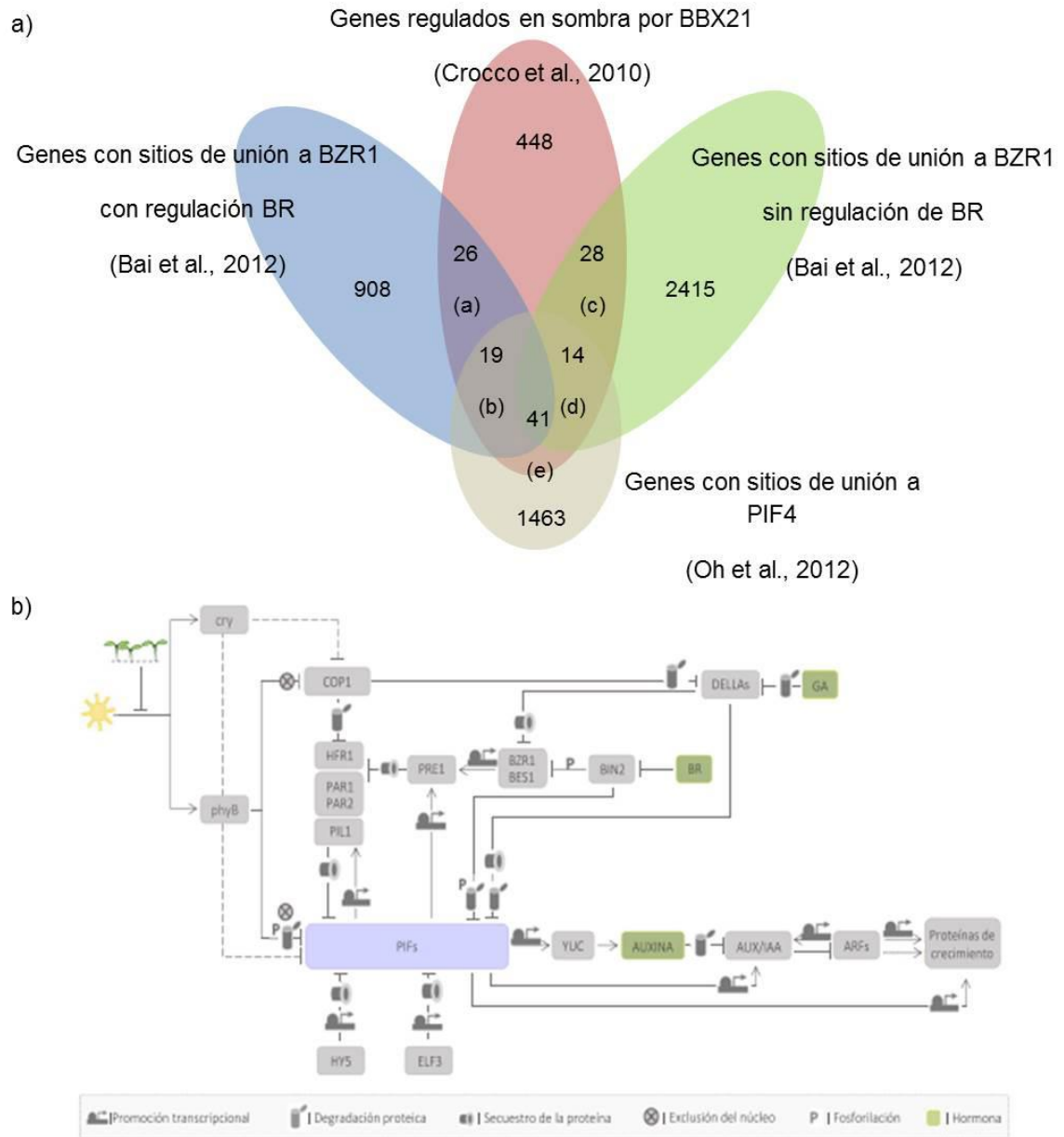


Figura 3.10: a) Análisis comparativo entre los transcriptomas de BZR1 (Bai et al., 2012), BBX21 en sombra (Crocco et al., 2010) y PIF4 (Oh et al., 2012).

Diagrama realizado por el Dr. Carlos Crocco.

b) Vía central de señalización de la respuesta de escape al sombreado, donde se visualiza la participación de BZR1 y de PIF4 en la regulación de los genes y proteínas involucradas en este proceso. (Adaptado de Semmoloni 2020)

Para confirmar los resultados del análisis comparativo entre los transcriptomas en nuestras condiciones experimentales, se evaluó la expresión de *MYBL2* (grupo a), *IBH1* (grupo b), y *PRE1* y *PRE3*, dos genes clave que promueven el alargamiento celular aguas abajo de la

señalización de BR en plántulas Col-0 y *bbx21-1* creciendo bajo luz blanca y sombra durante 5 días. La expresión génica de *MYBL2*, *PRE1* y *PRE3* fue fuertemente inducida bajo sombra pero no bajo luz blanca en el mutante *bbx21-1*. Sin embargo, la expresión del gen *IBH1* no mostró diferencias entre genotipos en ninguna condición de luz (Fig. 11a). También evaluamos la expresión de genes aguas abajo de PIF4 pertenecientes al grupo (e), incluidos *PIF4* e *IAA1*, y dos genes relacionados con la señalización inducida por la sombra (*IAA4* y *EXP11*). Los resultados indican que BBX21 inhibe fuertemente la expresión de *IAA1*, *IAA4* y *EXP11* pero no de *PIF4* bajo sombra (Fig. 11b). En conjunto, estos resultados sugieren que BBX21 reprime el alargamiento del hipocótilo bajo sombra continua al regular la expresión de genes aguas abajo de la señalización de BZR1 y PIF4.

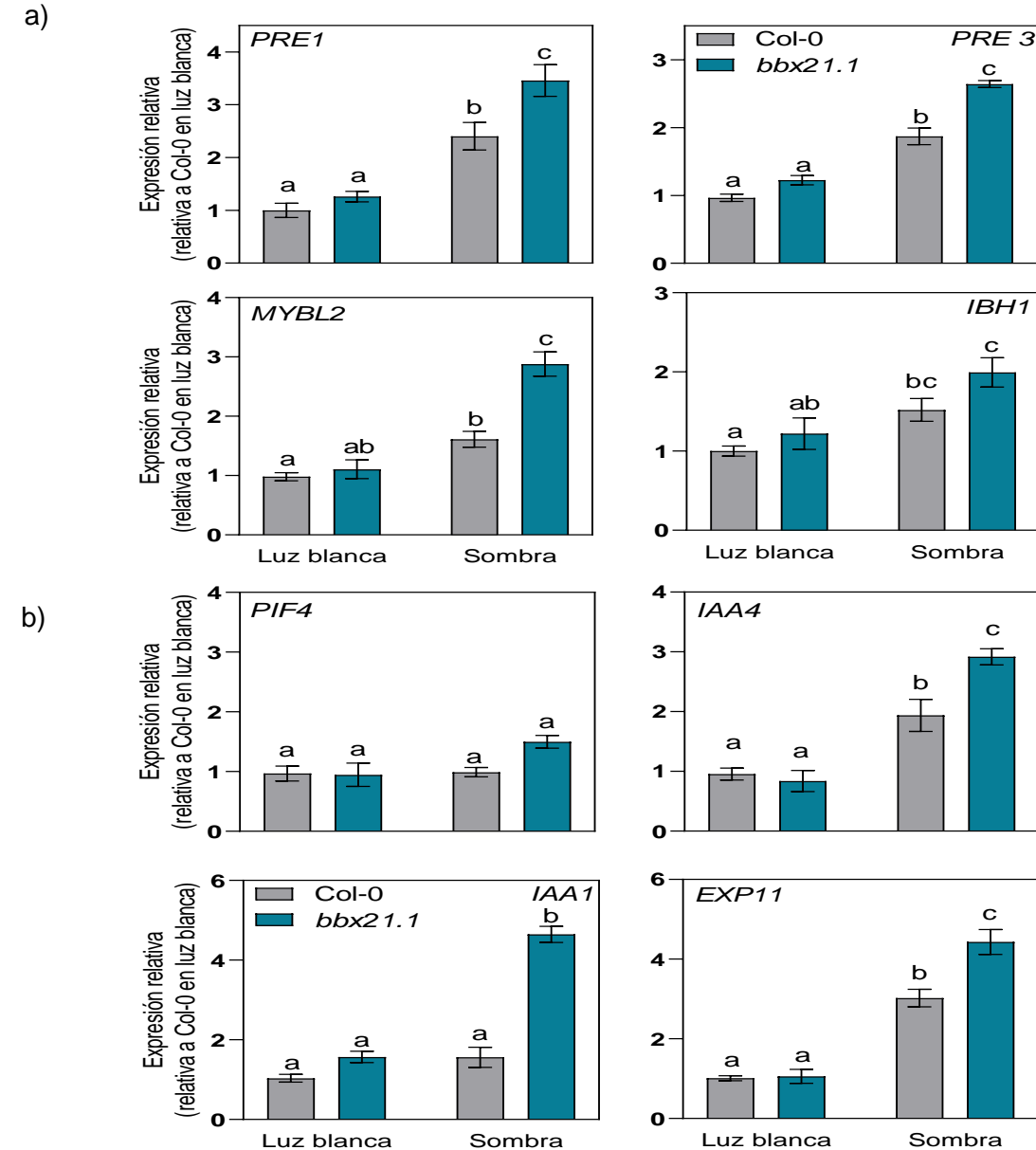


Figura 3.11: Expresión de genes coregulados por BBX21 en sombra, BZR y/o PIF4.

a) Expresión relativa de genes coregulados por BBX21 y la vía de señalización por BRs. b) Expresión relativa de genes coregulados por BBX21 y PIF4 y señalización de auxinas. Cada barra indica media  $\pm$  ES (n= 3). ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey para comparaciones entre medias. Letras diferentes indican diferencias significativas en la expresión de cada gen (P< 0,05). Datos obtenidos por el Dr. Carlos Crocco.

### La expresión de genes de señalización de BR no es controlada por BBX21 en tiempos cortos de exposición a la sombra

A nivel molecular, la reducción de la relación R/RL del ambiente provoca cambios en los niveles de expresión de numerosos genes (Devlin et al., 2003; Sessa et al., 2005). Los



productos de estos genes están involucrados en la señalización y/o regulación transcripcional de las vías de transducción que se activan rápidamente en respuesta a la percepción de plantas vecinas. Además, la regulación de la expresión génica en condiciones de sombra está fuertemente regulada por el tiempo de exposición (Ciolfi et al., 2013). En esta tesis surge la pregunta si BBX21 controla diferencialmente la expresión de genes asociados a la señalización de BRs en tiempos cortos de exposición a bajas relaciones de luz R/RL. Para esto se diseñó un experimento donde se crecieron plántulas de Col-0 y *bbx21-1* bajo luz blanca o luz blanca suplementada con 1 hora de RL al final del fotoperíodo del quinto día (luz blanca+RL). Se midió la expresión de *BZR1* y de dos genes de señalización BR, *PRE5* y *ARGOS-LIKE* (*ARL*). Los resultados indican que BBX21 reprime la expresión de *BZR1* y de *PRE5* bajo luz blanca, y que también reprime la expresión de *PRE5* y *ARL* bajo luz blanca+RL (Fig. 3.12). Los efectos inhibitorios de BBX21 fueron levemente más fuertes para los genes *PRE5* y *ARL* bajo sombra a corto plazo aunque no hubo diferencias significativas (Fig. 3.12, luz blanca frente a luz blanca+RL en *bbx21-1*,  $P=0,0518$  y  $P=0,0764$ , respectivamente).

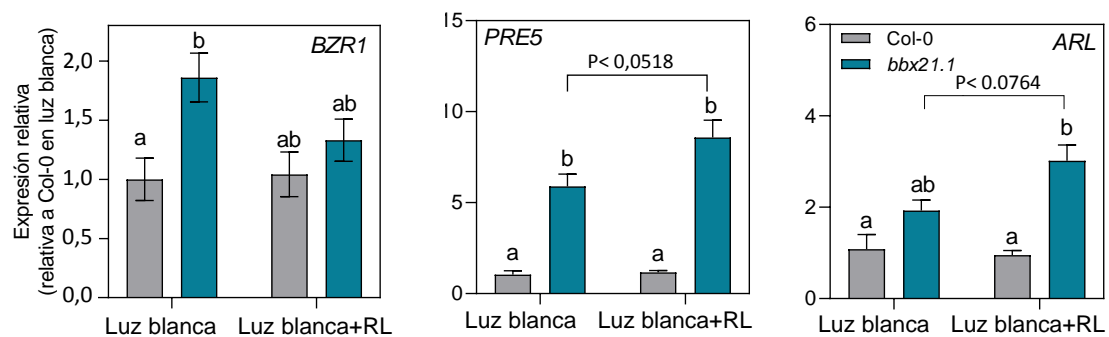


Figura 3.12: Expresión génica medida por qRT-PCR de *BZR1*, *PRE5* y *ARL*.

Plántulas de 5 días de edad creciendo bajo luz blanca o luz blanca + 1-h-RL al final del fotoperíodo. Media  $\pm$  error ES ( $n=3$ ). ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey para comparaciones entre medias. Letras diferentes indican diferencias significativas en la expresión de cada gen ( $P<0,05$ ).

### **BBX21 y BZR1 actúan de manera interdependiente en el control del largo del hipocótilo bajo sombra**

Los resultados anteriores demostraron que BBX21 inhibe el alargamiento del hipocótilo, en parte al controlar la expresión de los genes aguas abajo de *BZR1* y *PIF4* bajo sombra a

corto y largo plazo. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que BBX21 podría interactuar genéticamente con BZR1 para inhibir el alargamiento del hipocótilo bajo la sombra. Se cruzaron los mutantes simples *bbx21-1* y *bzr1-1D* y se seleccionó el doble mutante *bbx21-1 bzr1-1D*. Las plántulas de *bzr1-1D*, *bbx21-1* y *bbx21-1 bzr1-1D* mostraron hipocótilos más grandes que Col-0 bajo sombra, pero no bajo luz blanca (Fig. 3.13). La adición del inhibidor de BRZ redujo la longitud del hipocótilo de las plántulas *bbx21-1* a los niveles de Col, y las plántulas de *bzr1-1D* y *bbx21-1 bzr1-1D* mostraron hipocótilos significativamente más largos que las plántulas Col-0 y *bbx21-1* (Fig. 3.13). Estos resultados sugieren que los efectos de BBX21 y BZR no son aditivos y podrían actuar en forma parcialmente independiente en el control de la elongación del hipocótilo bajo la sombra.

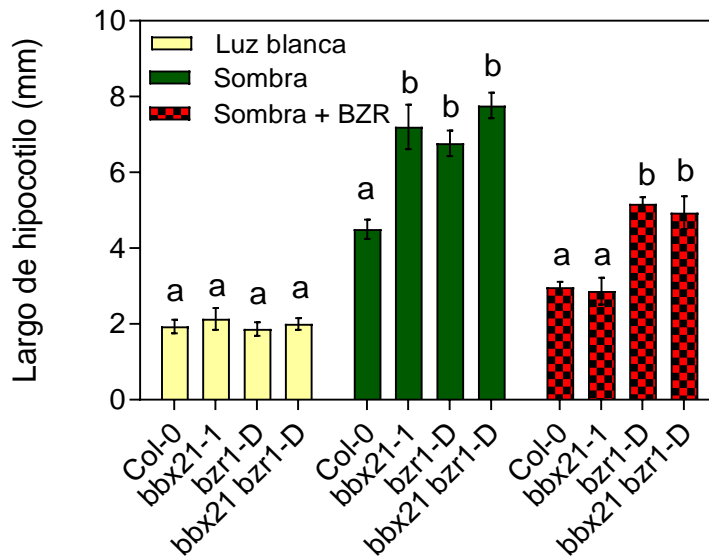


Figura 3.13: Largo del hipocótilo de plántulas Col, *bbx21-1*, *bzr1-1D* y *bbx21-1 bzr1-1D*. Plántulas creciendo en luz blanca, sombra y sombra + BZR 0,5  $\mu$ M durante 5 d. Las barras indican media  $\pm$  ES (n= 3). ANOVA seguido de la prueba de Tukey para comparaciones entre medias. Letras diferentes indican diferencias significativas en el largo de hipocótilo ( $P < 0,05$ ).

Para evaluar si BBX21 y BZR1 actúan juntos o de forma independiente en la regulación transcripcional, se midió la expresión de tres genes regulados tempranamente por sombra bajo luz blanca y luz blanca+RL (Fig. 3.14). Como era de esperar por la bibliografía, los tres genes se regularon positivamente en plántulas Col-0 en sombra a corto plazo. La expresión génica de *ATHB2* y *PIL1* aumentó en los mutantes *bbx21-1* y *bbx21-1 bzr1-1D*,

pero no en el mutante *bzr1-1D*. Por el contrario, la expresión del gen *HFR1* aumentó en *bzr1-1D* y *bbx21-1 bzr1-1D*, pero no en el mutante *bbx21-1*. Juntos, estos resultados confirman que BBX21 y BZR1 pueden controlar la expresión de diferentes genes tempranos inducidos por la sombra.

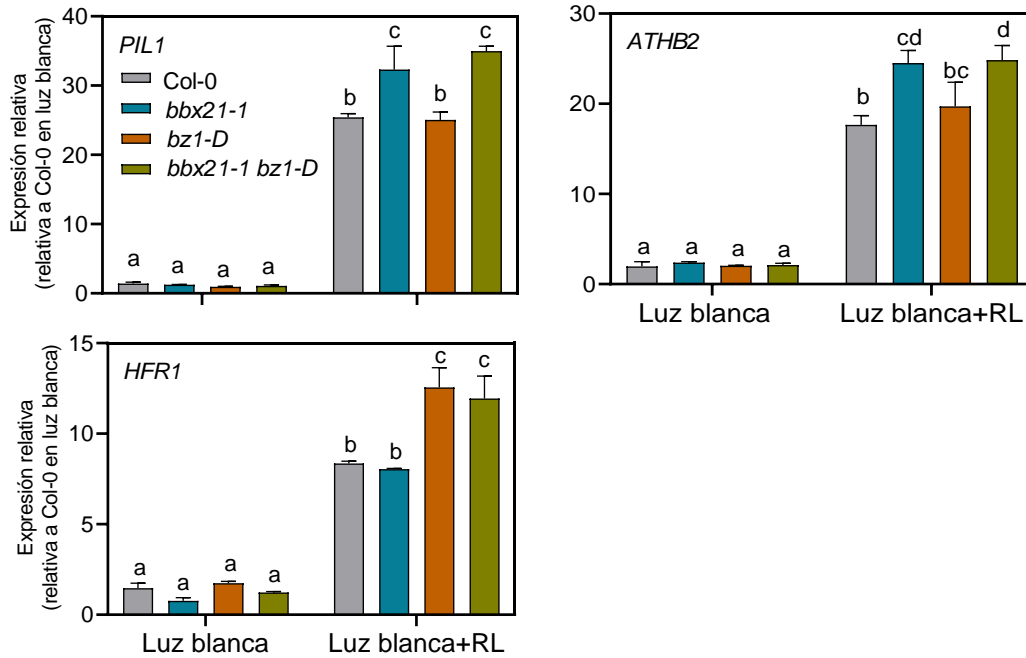


Figura 3.14: Expresión génica medida por qRT-PCR de *PIL1*, *ATHB2* y *HFR1*. Plántulas de 5 días de edad creciendo bajo luz blanca o luz blanca + 1-h-RL al final del fotoperíodo. Las barras indican media  $\pm$  ES (n= 3). ANOVA seguido de la prueba de Tukey para comparaciones entre medias. Letras diferentes indican diferencias significativas en el largo de hipocótilo (P< 0,05).

## Sección II: Efecto de la sobreexpresión del gen *BBX21* en plantas de *A. thaliana* y papa

En la segunda sección de resultados de esta tesis, se presentarán los resultados asociados al objetivo 2 planteado en la introducción. En esta sección, se va a analizar el efecto de la sobreexpresión del gen *BBX21* en plantas de *A. thaliana* y *S. tuberosum* creciendo en condiciones óptimas de riego y nutrientes bajo radiación natural en condiciones de invernáculo. Se incorporó a este estudio *S. tuberosum* (papa) como especie modelo por su relevancia económica y por la facilidad para mantener las líneas transgénicas a través de clones de reproducción asexual. Al comenzar esta tesis las plantas de papas transformadas ya habían sido seleccionadas con éxito y los resultados preliminares indicaban que las plantas sobreexpresantes de *BBX21* eran más petisas y tenían un diámetro del tallo basal significativamente más ancho que las plantas sin transformar. Además, las plantas sobreexpresantes de *BBX21* mostraban una reducción significativa en la relación peso fresco/peso seco en comparación a las plantas Spunta sin transformar, y en consecuencia tenían un mayor peso seco (Gómez-Ocampo, 2015).

### **Caracterización morfológica de plantas mutantes nulas y sobreexpresantes del gen *BBX21* en plantas de *A. thaliana*.**

El primer experimento consistió en la caracterización morfológica de plantas adultas de *A. thaliana* en condiciones de invernáculo bajo radiación natural. Se evaluó el tamaño en ancho y largo de la hoja y el número de ramificaciones florales entre el genotipo salvaje Col-0 y la línea mutante *bbx21-1*. El largo y ancho de la cuarta hoja totalmente expandida en plantas de 35 días de edad no mostró diferencias entre genotipos (Fig. 3.15). Tampoco se observaron diferencias en el número de ejes florales secundarios en plantas de 35 días de edad (Fig. 3.15). Probablemente el genotipo mutante nulo del gen *BBX21* no mostró efectos morfológicos visibles en planta adulta debido a efectos redundantes con otros miembros de la familia BBX homólogos, como *BBX22* (Bursch et al., 2020; Podolec et al., 2022; Gangappa y Botto, 2014).

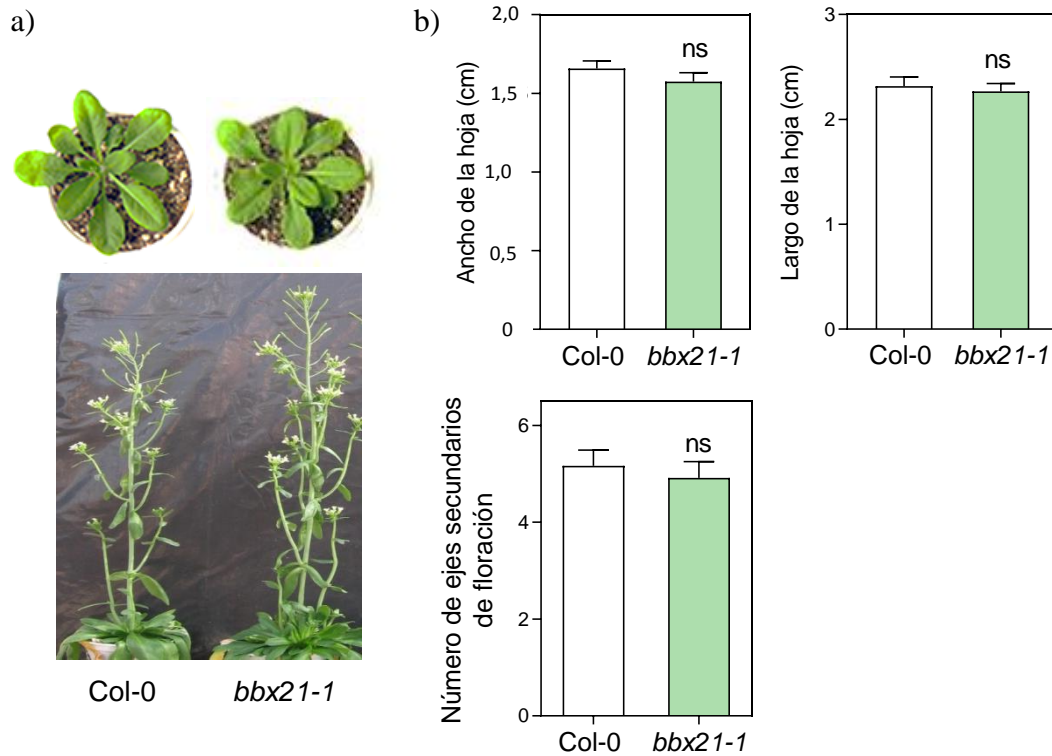


Figura 3.15: Características fenotípicas de plantas mutantes *bbx21-1* en *A. thaliana*.

a) Fotos representativas de rosetas de plantas de 35 días de edad de Col-0 y *bbx21-1* creciendo en invernáculo con luz natural, y de ramificaciones secundarias de floración. b) Largo y ancho de la cuarta hoja totalmente expandida, y número de ejes secundarios de floración (n= 12). Las barras indican media  $\pm$  ES. ANOVA seguido de la prueba de Tukey para comparaciones entre medias. ns, diferencias no significativas.

Además, en el mismo experimento, se evaluó los mismos caracteres morfológicos en plantas adultas de dos líneas de *A. thaliana* que sobreexpresan *BBX21* (*OE#1* y *OE#2*). Se observó que las plantas de las dos líneas *BBX21-OE* producían rosetas de mayor tamaño con hojas más largas y anchas que las plantas de Col-0 (Fig. 3.16). Además, las plantas de las dos líneas *BBX21-OE* mostraron una floración profusa con un número significativamente mayor de ejes secundarios (Fig. 3.16). Estos datos sugieren que la sobreexpresión de *BBX21* puede contribuir a obtener plantas de mayor tamaño y rendimiento.

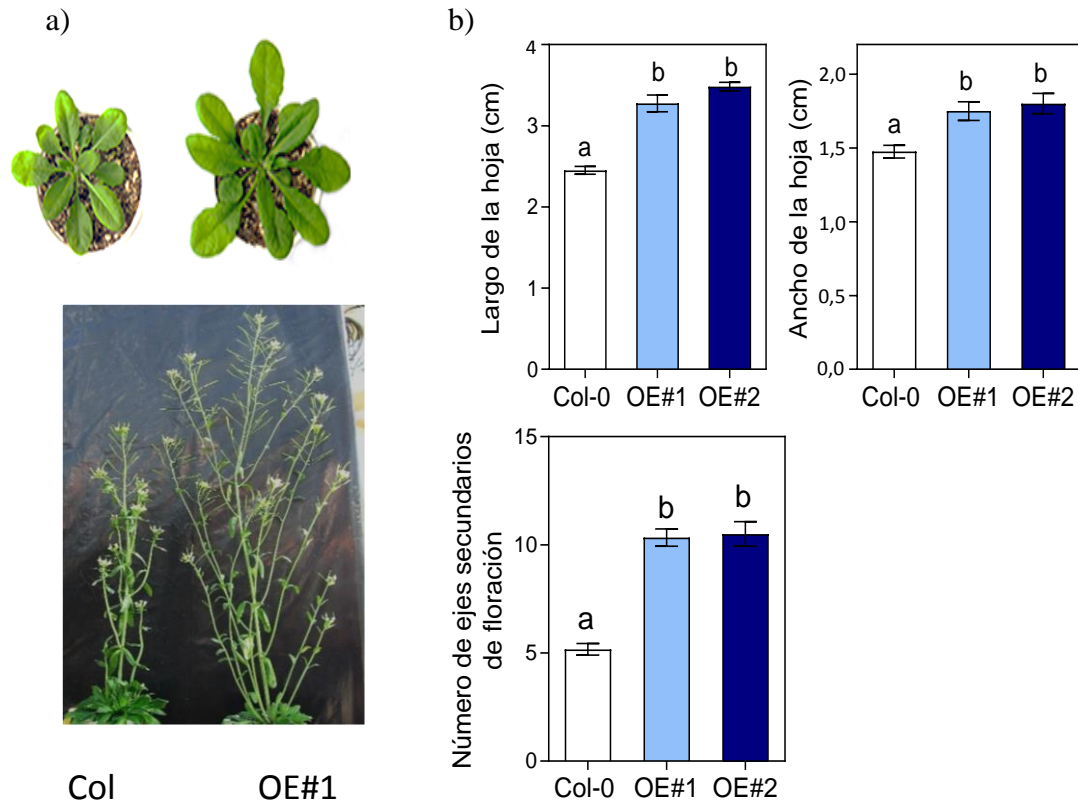


Figura 3.16: Características fenotípicas de plantas sobreexpresantes de *BBX21* en *A. thaliana*.

a) Fotos representativas que muestran rosetas en estado vegetativo y ramificaciones secundarias de floración en plantas de 35 días de edad. b) Largo y ancho de la cuarta hoja totalmente expandida, y número de ejes secundarios de floración ( $n = 12$ ). Las barras indican media  $\pm$  ES. ANOVA seguido de la prueba de Tukey para comparaciones entre medias. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

### La sobreexpresión de *BBX21* promueve la acumulación de antocianinas y fenoles en *Arabidopsis*

Además de la caracterización morfológica, se decidió evaluar los niveles de antocianinas y fenoles en plantas de *Arabidopsis* de 35 días de edad. Se sabe que la expresión de *HY5* depende de *BBX21*, y que *HY5* regula la biosíntesis de antocianinas (Shin et al., 2013). Como era de esperar, el contenido de antocianinas en el mutante nulo *bbx21-1* fue menor que en las plantas Col-0, mientras que en el contenido de fenoles totales no se observaron diferencias entre estos dos genotipos. También se pudo observar que las plantas *BBX21-OE* producían niveles mayores de antocianinas y fenoles (Fig. 3.17).

Además, se evaluó la expresión de genes involucrados en la vía de la síntesis de antocianinas y fenoles. Se evaluó la expresión *CHS* (*CHALCONA SINTASA*), *CHI*

(*CHALCONA ISOMERASA*) y *F3H* (*FLAVANONE 3-HIDROXILASA*) mediante la técnica de RT-qPCR. Se observó que la expresión de los transcritos *CHS*, *CHI* y *F3H* fue significativamente mayor en las plantas *BBX21-OE* comparadas con las plantas Col-0; mientras que en las plantas mutantes *bbx21-1*, la expresión del gen *CHS* fue menor que las plantas Col-0 (Fig. 3.17b). En las plantas mutantes *bbx21-1* se midió solamente la expresión de *CHS*, ya que esta proteína es una enzima clave que proporciona los materiales de partida para la biosíntesis de flavonoides y antocianinas (Dao et al., 2011).

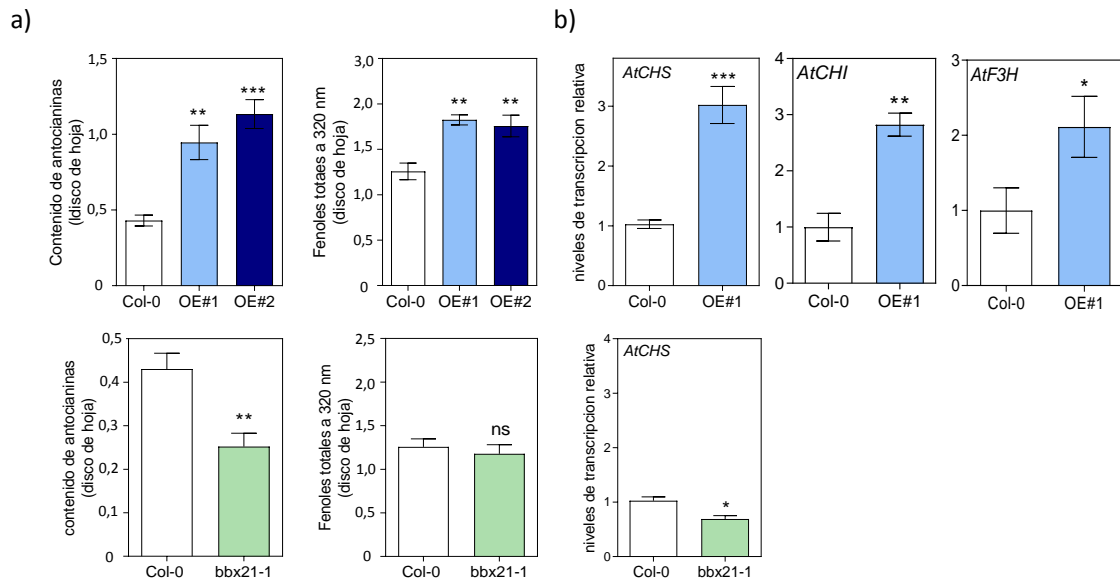


Figura 3.17: Contenido de metabolitos y expresión de genes asociados a su síntesis en plantas *BBX21-OE* y mutante *bbx21-1*.

a) Contenido de antocianinas y fenoles en hojas de plantas de 35 días de edad (n= 5 réplicas biológicas) y b) niveles de transcripción de los genes *CHS*, *CHI* y *F3H* (n= 3 réplicas biológicas). Las medias se muestran con barras de error que indican ES. Prueba *t* de Student para comparación entre dos medias. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las plantas Col-0 y *BBX21-OE*, y entre las plantas Col-0 y *bbx21-1* (\* P< 0,05; \*\* P<0, 01; y \*\*\* P< 0,001).

### La sobreexpresión de *BBX21* promueve la fotosíntesis en *Arabidopsis*

Los resultados previos indican que las plantas sobreexpresantes de *BBX21* son más robustas y sintetizan más pigmentos y fenoles. Además, las plantas sobreexpresantes sintetizan más clorofila (Gómez-Ocampo, 2015). El mayor tamaño y contenido de clorofila de las plantas sobreexpresantes de *BBX21* sugieren que las tasas de fotosíntesis pueden ser distintas entre genotipos. Se diseñó un nuevo experimento para evaluar parámetros fotosintéticos en plantas de *BBX21-OE* y Col-0 creciendo en invernáculo con radiación

natural. Plantas de Col-0 y *BBX21-OE* de 35 días de edad fueron expuestas a diferentes PPFD para evaluar las tasas de fotosíntesis neta y los rasgos fotosintéticos relacionados. Se encontró que las plantas *BBX21-OE* mostraron tasas de fotosíntesis, tasas de transpiración y conductancia estomática más altas que las plantas Col-0 a altas irradiancias ( $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Fig. 3.18a). Con estos datos, se estimó la EUA como tasa neta de fotosíntesis (asimilación de carbono) / tasa de transpiración (transpiración de carbono). No se observaron diferencias significativas en EUA entre genotipos (Fig. 18a). Además, se decidió medir la expresión de algunos genes fotosintéticos como *FDI* (*FERRODOXIN-1*) y *RCA* (*Rubisco ACTIVASA*) y *LHCA* (*LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL A*). Las plantas *BBX21-OE* mostraron mayores niveles en la expresión de *FDI* y *RCA* con respecto al control Col-0, como era de esperarse debido a la mayor actividad del aparato fotosintético de este genotipo (Fig. 3.18b). No se observaron diferencias significativas en la expresión de *LHCA* entre genotipos (Fig. 18b).



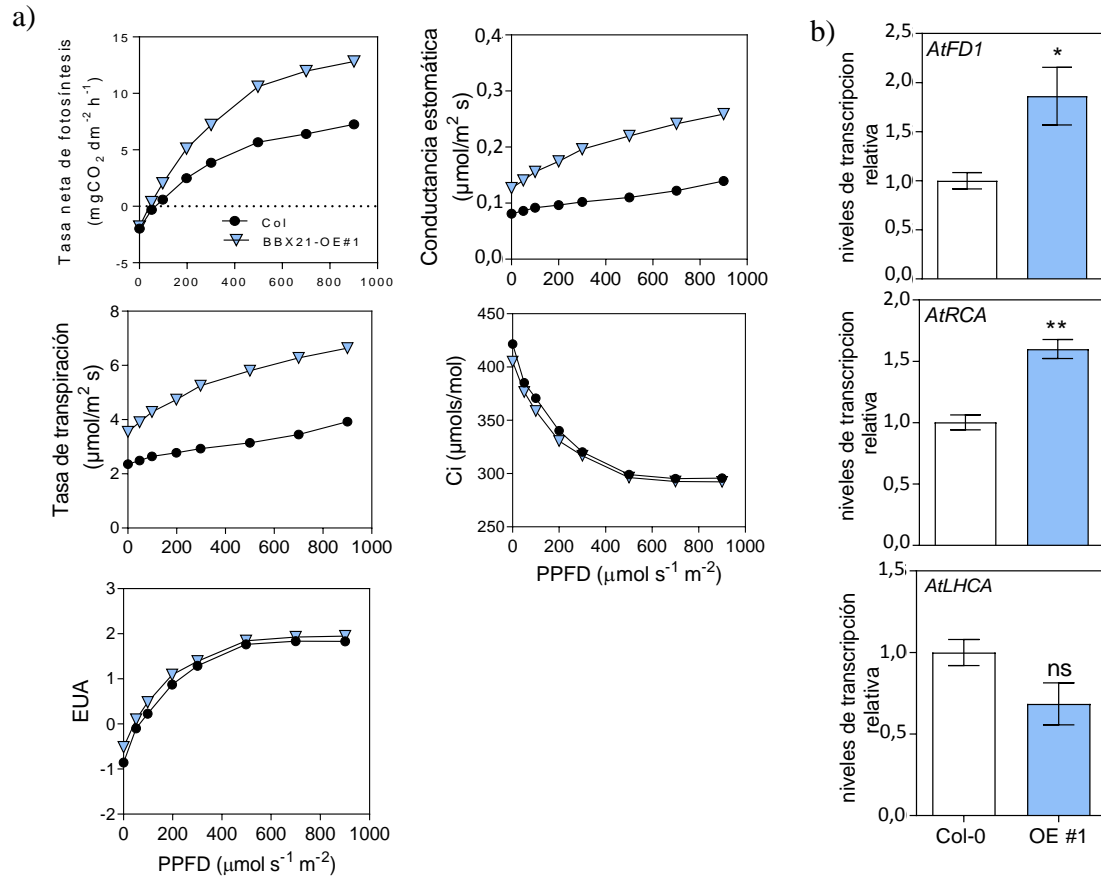


Figura 3.18: Medición de parámetros relacionados con la fotosíntesis y genes asociados en plantas *BBX21-OE* de *A. thaliana*.

a) Tasa de fotosíntesis, conductancia estomática, tasa de transpiración, concentración interna de  $\text{CO}_2$  (Ci) y eficiencia del uso del agua (EUA), en función de la densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD;  $n = 4$  réplicas biológicas). b) Niveles de transcripción de los genes *FDI*, *RCA* y *LHCA* ( $n = 3$  réplicas biológicas). Las medias se muestran con barras de error que indican ES. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las plantas Col-0 y *BBX21-OE* (prueba *t* de Student; \*  $P < 0,05$  y \*\*  $P < 0,01$ ).

### La sobreexpresión de *BBX21* promueve la vasculatura del tallo y el engrosamiento de las hojas de papa

Al comenzar esta tesis, nuestro laboratorio había documentado que las plantas sobreexpresantes de *BBX21* de papa son más robustas que las plantas control Spunta (Gómez-Ocampo, 2015). Las líneas sobreexpresantes (CH1, CH2 y CH13) expresan al menos 4 veces más el transcriptos de *BBX21* que Spunta. Las tres líneas sobreexpresantes de *BBX21* producen plantas más achaparradas con tallos de diámetro mayor y mayores contenidos de clorofila en sus hojas que las plantas sin transformar Spunta (Gómez-

Ocampo, 2015). Por otra parte, los resultados previos en plantas de *A. thaliana* obtenidos en el marco de esta tesis indican que la sobreexpresión de la proteína BBX21 confiere mayor tamaño de roseta, mayor contenido de pigmentos y fenoles y mayor tasa de fotosíntesis. Todas estas evidencias sugieren que la sobreexpresión de *BBX21* podría conferir características beneficiosas para aumentar los rendimientos en las plantas de papa.

Para poner a prueba esta hipótesis, se decidió evaluar primero las características anatómicas de tallos y hojas en plantas de papa Spunta y dos líneas sobreexpresantes de *BBX21* (CH2 y CH13). Para ello se hicieron cortes histológicos transversales del tallo a tres alturas: basal, media y apical. También se realizaron cortes histológicos de hojas de plantas adultas. Se pudo observar que las plantas transgénicas mostraron una vasculatura mayor, y un mayor número de capas de células de parénquima comparadas con las plantas Spunta sin transformar (Fig. 3.19). Además, las plantas transgénicas mostraron láminas foliares ligeramente más gruesas que las plantas sin transformar (Fig. 3.20).

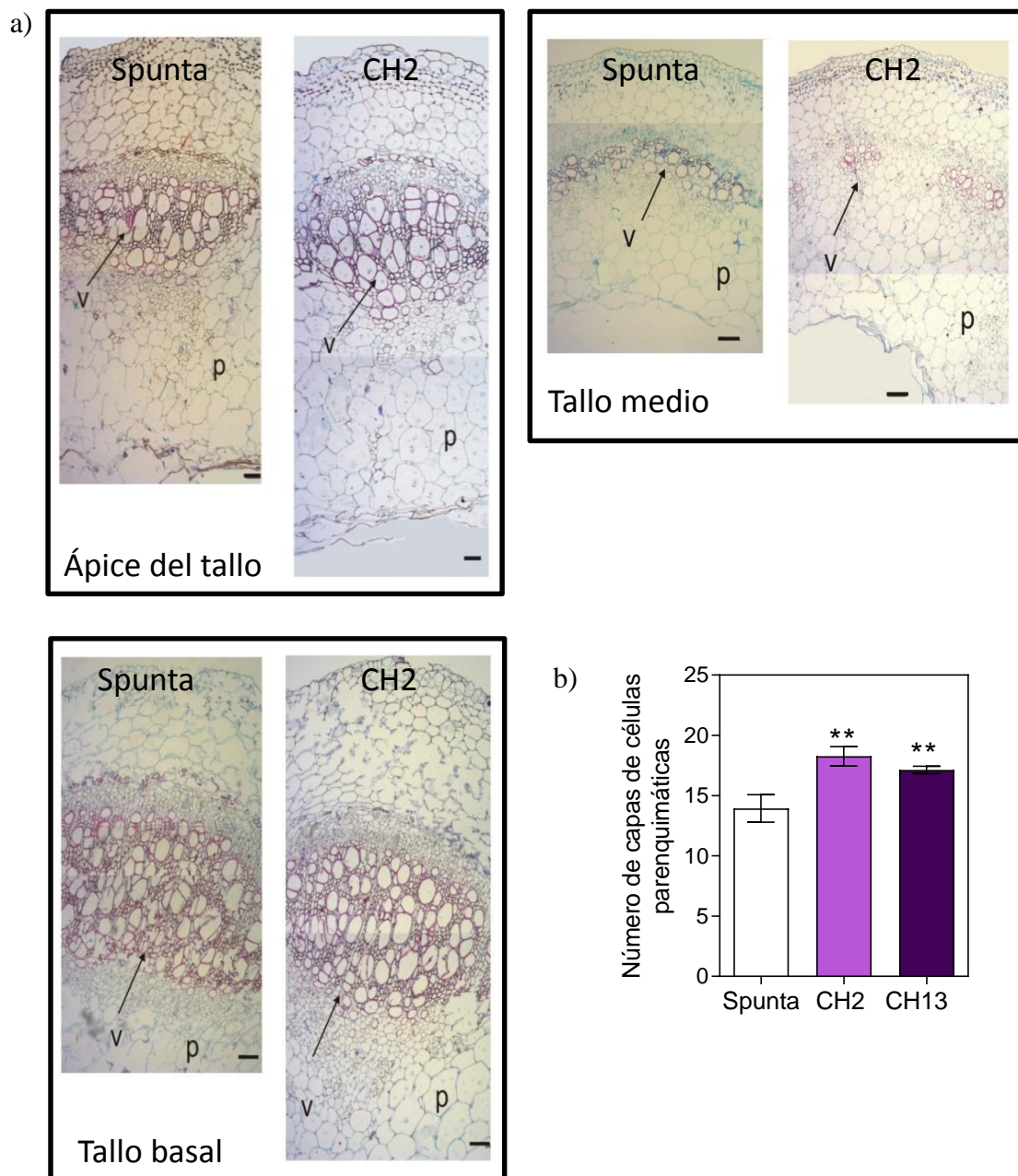


Figura 3.19: Caracterización anatómica del tallo de las líneas CH2 y CH13.

a) Fotos de los cortes transversales de tallo en el ápice, medio y base de la planta. Abreviaturas: p, parénquima; v, haz vascular. Escala: 50  $\mu$ m. b) Número de capas de células parenquimáticas (n= 3 réplicas biológicas). Las medias se muestran con barras de error que indican ES. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las plantas Spunta y las dos líneas transgénicas CH2 y CH13 (prueba *t* de Student; \*\*  $P < 0,01$ ).

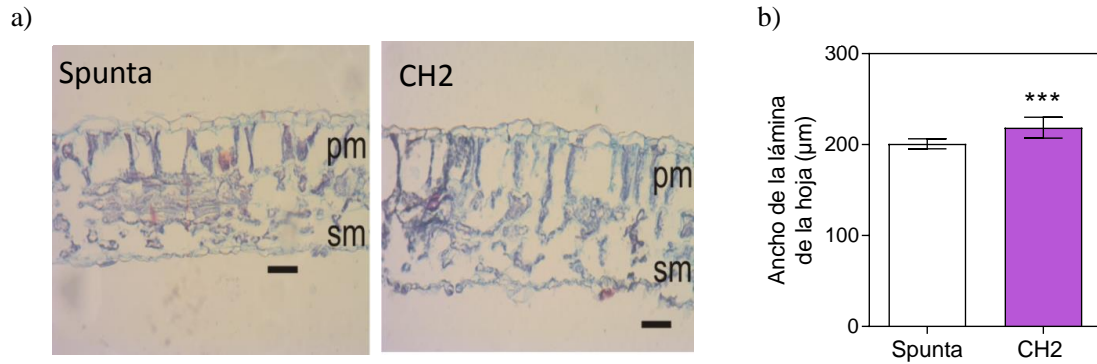


Figura 3.20: Caracterización anatómica de la hoja de la línea CH2.

a) Fotos de los cortes transversales de la lámina de hoja. Abreviaturas: pm, células en empalizada del mesófilo; sm, células esponjosas del mesófilo. Escala: 50 µm. b) Ancho de la lámina de la hoja (n= 3 réplicas biológicas). Las medias se muestran con barras de error que indican ES. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las plantas Spunta y CH2 (prueba *t* de Student; \*\*\*  $P < 0,001$ ).

### **La sobreexpresión de *BBX21* aumenta el rendimiento de tubérculos de papa**

Teniendo en cuenta las evidencias previas, se estudiaron parámetros de rendimiento en las plantas Spunta y en la línea sobreexpresante CH2. Se evaluó el número y el peso de tubérculos en las plantas transgénicas y las plantas sin transformar, al momento de la cosecha a los 96 días. Se encontró que las plantas transgénicas tenían un rendimiento de tubérculos un 15% mayor y tubérculos de un tamaño menor en comparación con las plantas Spunta. Sin embargo, la calidad de los tubérculos en términos de contenido de almidón fue similar entre los genotipos (Fig. 3.21).

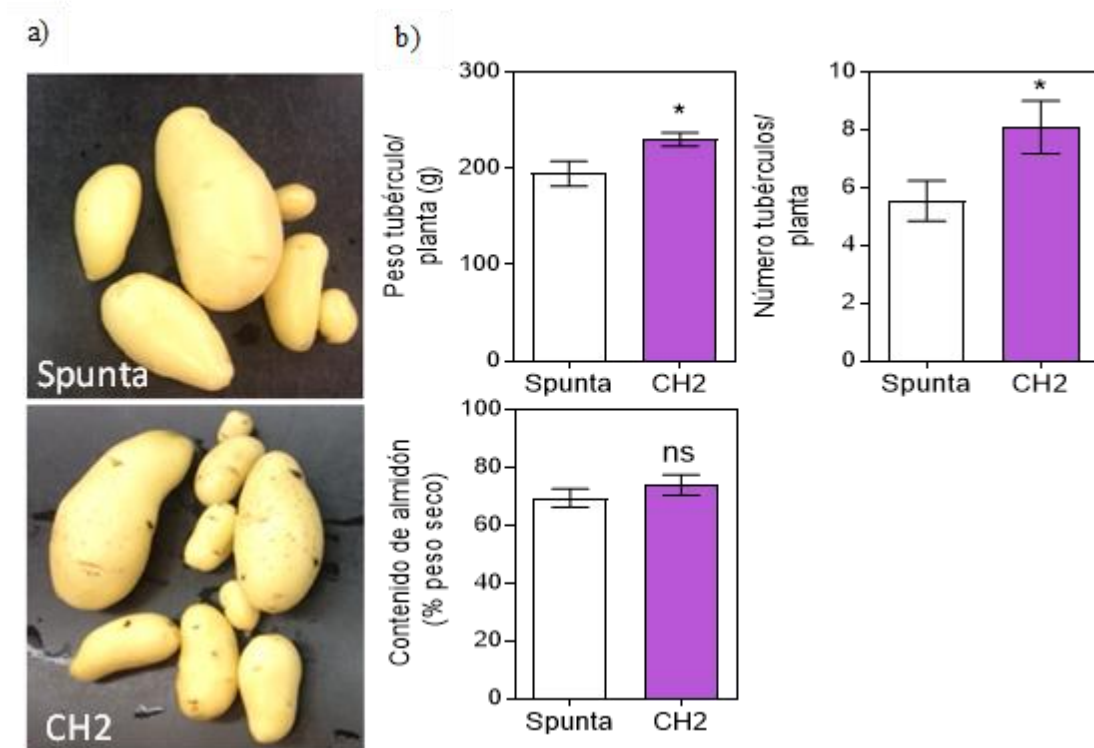


Figura 3.21: Caracterización del rendimiento de las plantas de la línea CH2.

a) Fotos representativas de tubérculos de plantas sin transformar y plantas sobreexpresantes de *BBX21* cosechados al final del experimento. b) Peso y número de tubérculos cosechados por planta ( $n= 12$  réplicas biológicas) y contenido de almidón ( $n= 5$  réplicas biológicas). Las medias se muestran con barras de error que indican ES. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las plantas Spunta y CH2 (prueba  $t$  de Student; \*  $P < 0,05$ ).

Además, se analizó la anatomía de los tubérculos haciendo cortes histológicos. Se pudo observar que el número de amiloplastos en los tubérculos de las líneas transgénicas fue menor que en las plantas Spunta, aunque el largo y el ancho de los amiloplastos fue mayor en las plantas transgénicas que en las plantas sin transformar (Fig. 3.22). El tamaño de los amiloplastos puede traer aparejado cambios en la calidad para ser usados a nivel industrial, como la textura, color y el grado de harinosidad después de la cocción (de Pater et al. 2006)

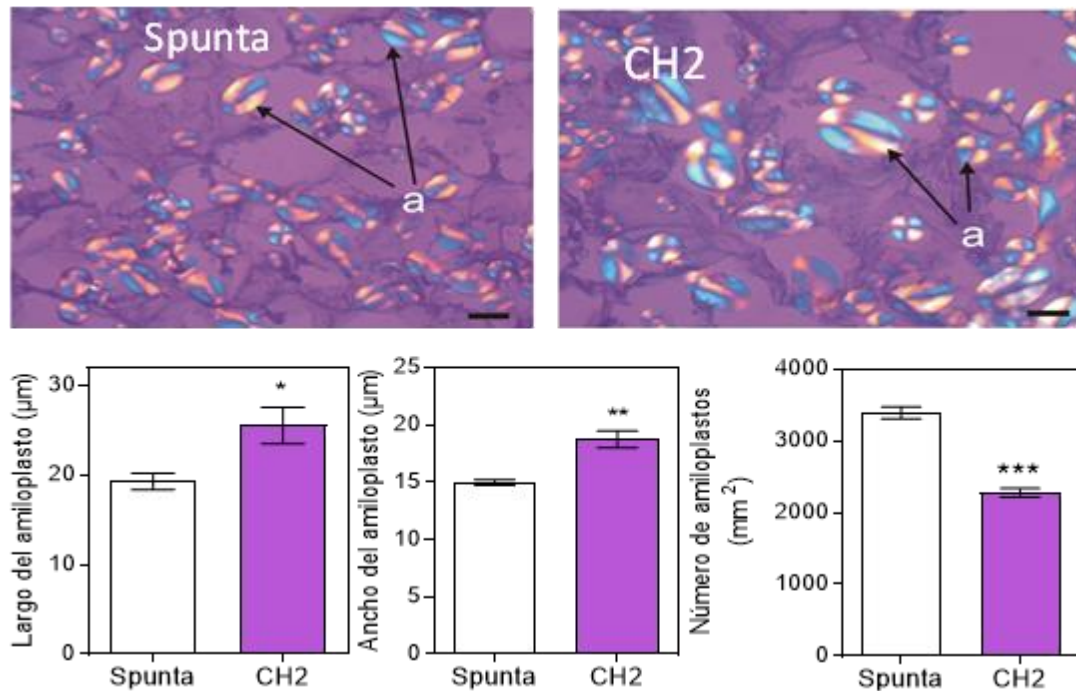


Figura 3.22: Fotos representativas de cortes transversales de tubérculos.

Abreviatura: a, amiloplastos. Escala: 10 µm. Largo, ancho y número de amiloplastos (n= 3 réplicas biológicas). Las medias se muestran con barras de error que indican ES. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las plantas Spunta y CH2 (prueba *t* de Student; \* P< 0,05; \*\* P< 0,01; \*\*\* P< 0,001).

### La sobreexpresión de *BBX21* aumenta la tasa de fotosíntesis en plantas de papa

Los resultados previos demuestran que las plantas sobreexpresantes de *BBX21* de *A. thaliana* hacen más fotosíntesis y tienen rosetas más grandes (Fig. 3.18). Además, sabemos que las plantas de papa sobreexpresantes de *BBX21* tienen más clorofila que las plantas sin transformar (Gómez Ocampo, 2015). Con estos antecedentes se razonó que las plantas de papa que sobreexpresan *BBX21* deberían tener una mayor tasa de fotosíntesis. Para poner a prueba esta idea, se midió la tasa neta de fotosíntesis y otros parámetros fisiológicos en plantas de papa de 28 días de edad. Se encontró que las líneas transgénicas tenían tasas fotosintéticas mayores que las plantas control Spunta entre los 400 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y 2000 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PPFD. A PPFD menores y no saturantes no se encontraron diferencias entre los genotipos. Además, las plantas transgénicas mostraron mayores tasas de transpiración y conductancia estomática (Fig. 3.23). Curiosamente, la EUA fue similar entre los genotipos,

lo que indica que las tasas de fotosíntesis mayores de las líneas transgénicas no afectan la EUA. Por otra parte, a nivel de expresión génica, se observó una relación positiva entre las mayores tasas de fotosíntesis y un aumento en la expresión del gen fotosintético *RCA*, pero no en los genes *LHCB* (*light-harvesting chlorophyll-B*) y *FTSZ1* (*PLASTID-DIVIDING RING*). La expresión del gen *RCA1* promovida por *BBX21* en plantas de papa confirman las observaciones realizadas en plantas de *Arabidopsis* (Fig. 3.18).

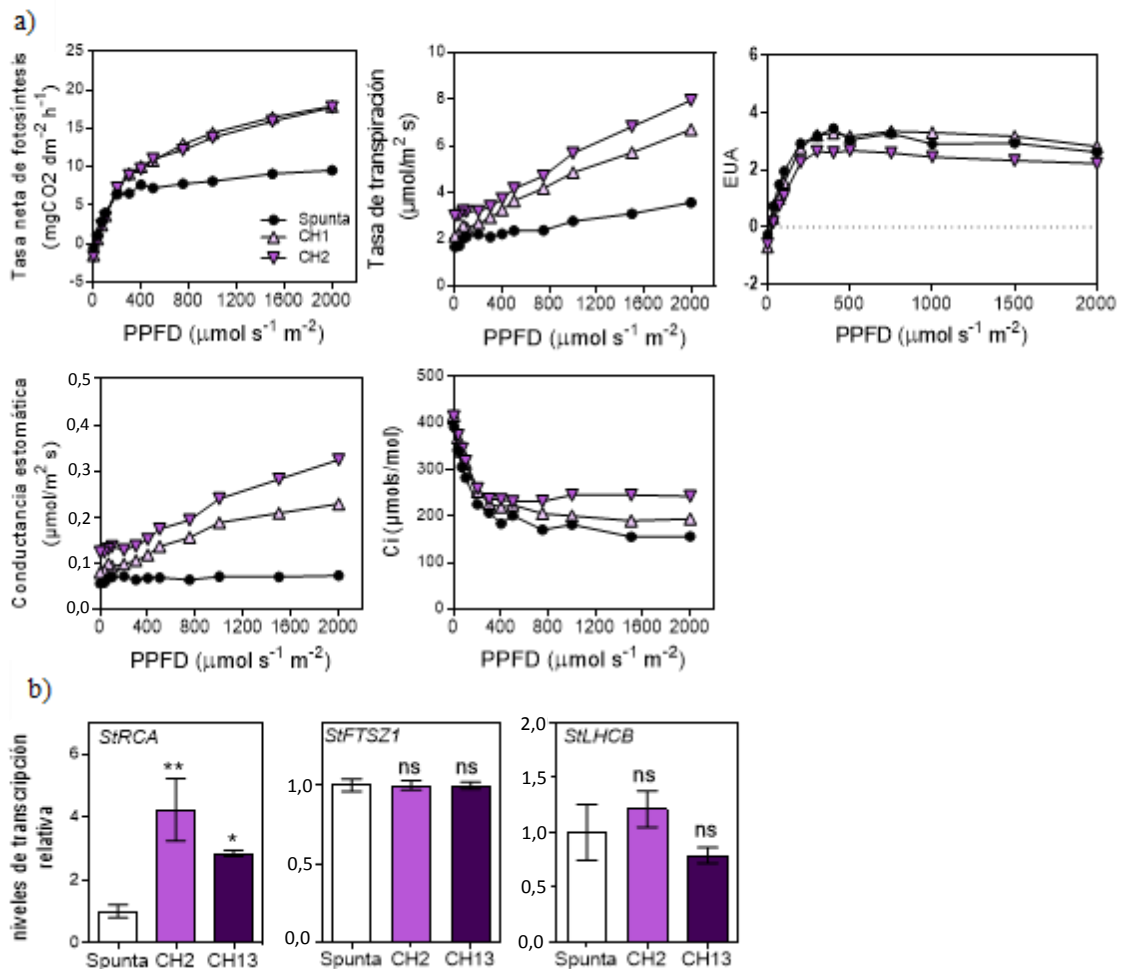


Figura 3.23: Medición de parámetros relacionados con la fotosíntesis y de la expresión de genes asociados en plantas de las líneas CH2 y CH13.

a) Tasa de fotosíntesis y de transpiración, eficiencia del uso del agua (EUA), conductancia estomática y concentración interna de  $\text{CO}_2$  (Ci) en función del PPFD ( $n = 4$ ). b) Niveles de transcripción de los genes *StRCA*, *StFTSZ1* y *StLHCB* ( $n = 4$ ). Las medias se muestran con barras de error que indican ES. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las plantas Spunta, CH2 y CH13 (prueba *t* de Student; \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ).



**La sobreexpresión de *BBX21* aumenta la apertura estomática en hojas de papa**

Teniendo en cuenta los resultados experimentales previos, se razonó que el aumento de la actividad fotosintética en las líneas transgénicas en comparación con las plantas sin transformar podría estar asociado con diferencias en la apertura estomática y/o número y distribución de estomas en las hojas. Mediante el análisis de los cortes histológicos de las hojas, se pudo observar que, si bien el número de estomas fue similar entre los genotipos, se encontraron diferencias significativas en la distribución de estomas en la hoja. El índice estomático, calculado como la densidad de los estomas abaxiales/estomas adaxiales fue menor en las plantas sobreexpresantes de *BBX21* comparado a las plantas sin transformar Spunta. Un dato más interesante fue que el área de apertura los estomas fue significativamente mayor en las plantas transgénicas que las plantas sin transformar. El aumento en el grado de apertura de los estomas se correlacionó con una mayor longitud, pero no con el ancho de los estomas. (Fig. 3.24). El conjunto de estas observaciones sugiere que una mayor área y apertura estomática de las plantas sobreexpresantes de *BBX21* probablemente contribuyó al aumento de la actividad fotosintética.



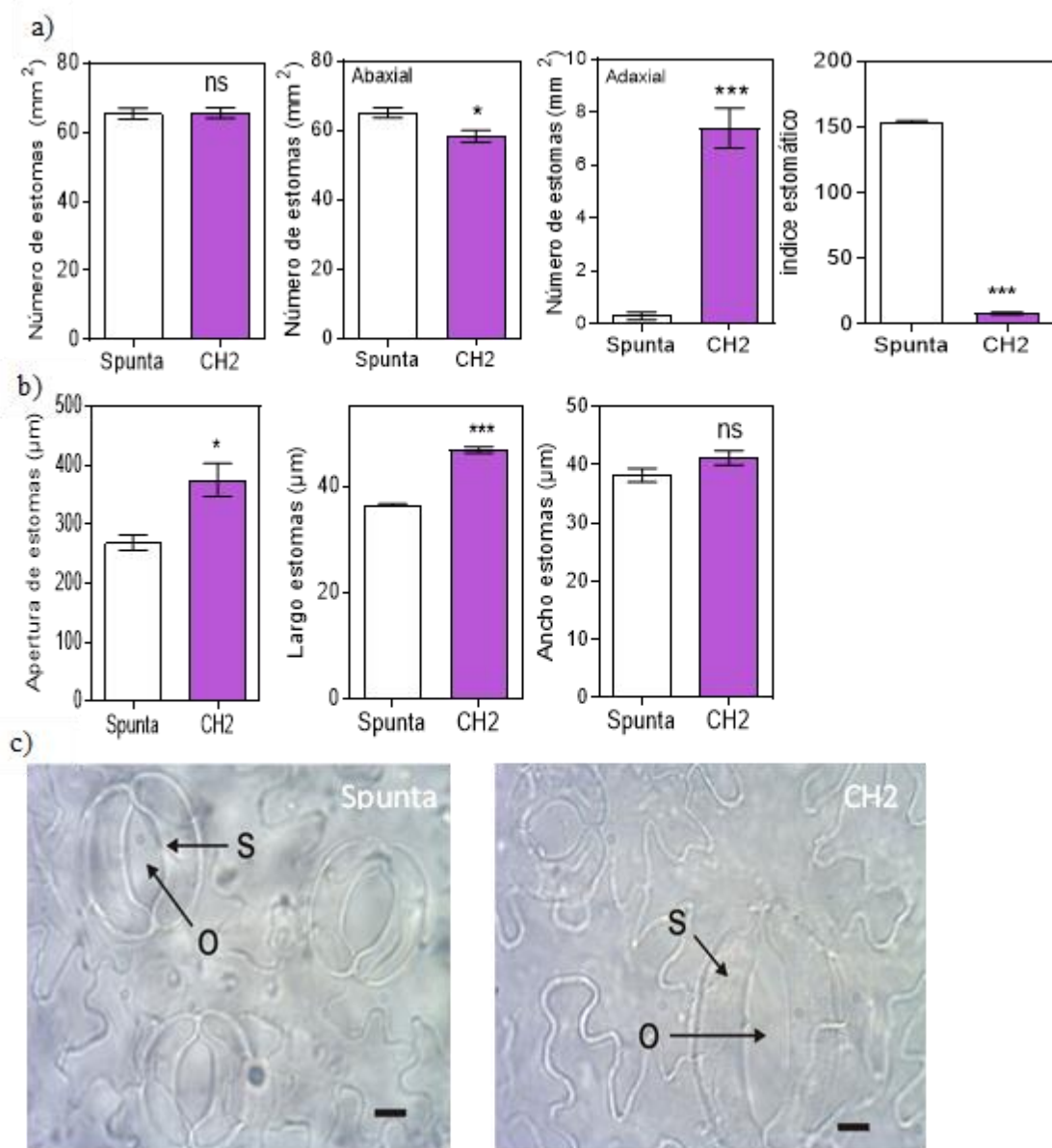


Figura 3.24: Caracterización de los estomas de las plantas de la línea CH2.

a) Densidad estomática total, densidad de estomas en la cara abaxial y en la adaxial, e índice estomático estimado como el número de estomas abaxiales/número de estomas adaxiales de las líneas sobreexpresantes de *BBX21* y las líneas sin transformar (n= 3 réplicas biológicas). b) Apertura estomática, largo y ancho de los estomas de las líneas sobreexpresantes de *BBX21* y las líneas sin transformar. c) Fotos representativas de estomas de las líneas sin transformar y las sobreexpresantes de *BBX21*. Abreviaturas: S, estomas; O, opérculo. Escala: 10 μm. Las medias se muestran con barras de error que indican ES. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las plantas Spunta y CH2 (prueba *t* de Student; \* P< 0,05; \*\*\* P< 0,001).

### **La sobreexpresión de *BBX21* promueve la expresión génica y los metabolitos de la vía de los fenilpropanoides en plantas de papa.**

Al iniciarse esta tesis, nuestro laboratorio tenía documentado que la sobreexpresión de *BBX21* en plantas de papa aumenta la abundancia de antocianinas y compuestos fenólicos (Gómez-Ocampo, 2015). Por otra parte, en esta tesis demostramos que estos compuestos también están aumentados en plantas de *A. thaliana* sobreexpresantes de *BBX21* (Fig. 3.17). Por bibliografía se sabe que la vía de los fenilpropanoides induce la acumulación de glicósidos flavonoides, derivados de antocianinas y ácido clorogénico mediante la activación de la expresión de enzimas específicas (Vogt, 2010). Con estos antecedentes, se decidió evaluar mediante la técnica de RT-qPCR la expresión génica de *PAL1* (*PHE AMMONIA LYASE1*), *CHS* (*CHALCONA SINTASA*), *CHI* (*CHALCONA ISOMERASA*) y *F3H* (*FLAVANONE 3 HIDROXILASA*) que codifican enzimas de la vía de fenilpropanoide, así como la síntesis de dos ácidos clorogénicos y los glucósidos de quercetina mediante la técnica de HPLC, para estudiar su correlación con los mayores niveles de antocianinas observados en las plantas transgénicas que sobreexpresan *BBX21* en papa (Fig. 3.25). *PAL1* cataliza la reacción que convierte a la fenilalanina en ácido cinámico, que luego va a dar lugar al precursor fenilpropanoide 4-cumaroil coenzima A (Deikman y Hammer, 1995). Este precursor es sustrato de la *CHS*, que cataliza entonces la primera reacción en la biosíntesis de compuestos flavonoides/isoflavonoides. Mediante la acción de *CHI*, la naringenina chalcona se puede convertir rápidamente en el isómero estereoespecífico naringenina flavona, que es hidroxilado por *F3H* para producir dihidrokaempferol (Sunil y Shetty, 2022). En general, los genes y los metabolitos medidos fueron más altos en hojas de plantas transgénicas que en hojas de plantas sin transformar, con la excepción de la expresión de *CHI* (Fig. 3.25). Estos resultados correlacionan con los niveles más altos de antocianinas y compuestos fenólicos observados en plantas de papa transgénicas en comparación con las plantas sin transformar.

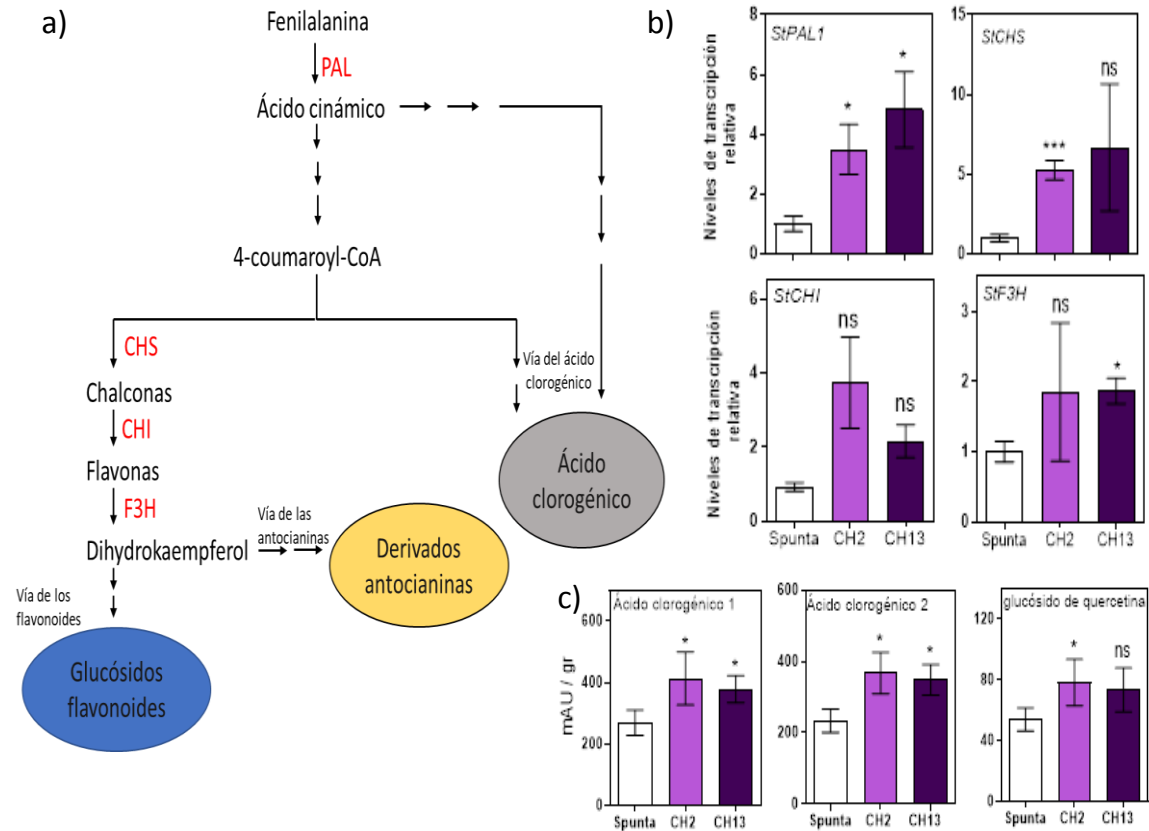


Figura 3.25: Caracterización de los genes y metabolitos de la vía de los fenilpropanoides en hojas de plantas de papa de las líneas CH2 y CH13.

a) Diagrama de la vía fenilpropanoide y enzimas clave de la ruta. b) Niveles de transcripción de *PAL*, *CHS*, *CHI* y *F3H* (n= 4 réplicas biológicas). c) Metabolitos de ácido clorogénico 1, ácido clorogénico 2 y glucósido de quercetina medidos por HPLC (n= 5 réplicas biológicas). Las medias se muestran con barras de error que indican ES. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las plantas Spunta, CH2 y CH13 (prueba *t* de Student; \* P< 0,05).

### La sobreexpresión de *BBX21* reduce la fotoinhibición del fotosistema II en plantas de papa

Por otra parte, estudios previos demostraron que el aumento de los niveles de antocianinas y fenoles en las hojas mejora la fotoprotección a alta irradiancia (Gould et al., 1995; Manetas et al., 2002; Steyn et al., 2002; Harvaux y Kloppstech, 2001). Para evaluar esta posibilidad, se diseñó un experimento con plantas de 14 días de edad que estaban aclimatadas a baja irradiancia ( $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y luego fueron expuestas a alta irradiancia ( $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) por 2 horas. La fotoinhibición del fotosistema II se estimó midiendo la eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II (Fv/Fm) en ambos niveles de irradiancia. Se encontró que Fv/Fm fue similar entre genotipos a baja irradiancia, pero la fotoinhibición

del fotosistema II fue mayor en plantas no transformadas que en plantas transgénicas expuestas a alta irradiancia (Fig. 3.26). En promedio, el  $F_v/F_m$  se redujo aproximadamente un 25% en las plantas de control y solo un 10% en promedio para las tres líneas transgénicas. Estos resultados sugieren un papel de BBX21 en la protección contra la alta irradiancia, probablemente al inducir la acumulación de antocianina y compuestos fenólicos en sus hojas.

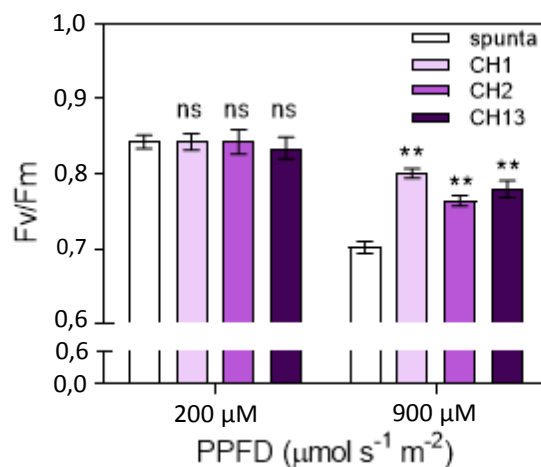


Figura 3.26: Eficiencia fotoquímica máxima ( $F_v/F_m$ ).

Plantas de 14 días de edad aclimatadas a bajas irradiancias ( $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y luego expuestas a alta irradiancia ( $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durante 2 horas ( $n=6$ ). Las medias se muestran con barras de error que indican ES. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las plantas Spunta, CH1, CH2 y CH13 (prueba  $t$  de Student; \*\*  $P < 0,01$ ). Datos obtenidos por el Dr. Carlos Crocco.

### Sección III: Efecto de la sobreexpresión de *BBX21* en plantas de papa creciendo bajo restricción hídrica

En la sección II de resultados de esta tesis, se demostró que las plantas de papa sobreexpresantes de *BBX21* son más robustas y tienen tasas de fotosíntesis mayores a irradiancias saturantes asociadas con una menor fotoinhibición, que aumenta la producción de tubérculos en condiciones óptimas de agua. En la sección III de resultados se evaluará el comportamiento de las plantas de *S. tuberosum* sobreexpresantes de *BBX21* creciendo en ambientes hídricos restringidos. El cultivo de papa es susceptible al estrés hídrico, ya que un déficit hídrico en plantas en activo crecimiento limita marcadamente el rendimiento a través de una reducción en el número y tamaño de los tubérculos que se forman (Hill et al., 2021). Durante la tuberización, los productos fotosintéticos en exceso son traslocados para el rápido desarrollo de los tubérculos. El estadio de tuberización es considerado el período crítico del cultivo, por los efectos en la reducción del crecimiento potencial de la planta (Dwelle, 1985; Gawronska y Dwelle, 1989).

#### **Las plantas de papa *BBX21-OE* son tolerantes a la sequía**

Para caracterizar el comportamiento de las plantas sobreexpresantes de *BBX21* a la sequía, se cultivaron plantas de papa creciendo a capacidad de campo durante 28 días después de la emergencia y luego se redujo el riego para mantener el 35% del agua a capacidad de campo durante 14 días (Fig. 3.27a). Las mediciones se hicieron a los 42 días de edad de las plantas de papa del genotipo sin transformar spunta y dos líneas sobreexpresantes de *BBX21* (CH2 y CH13).

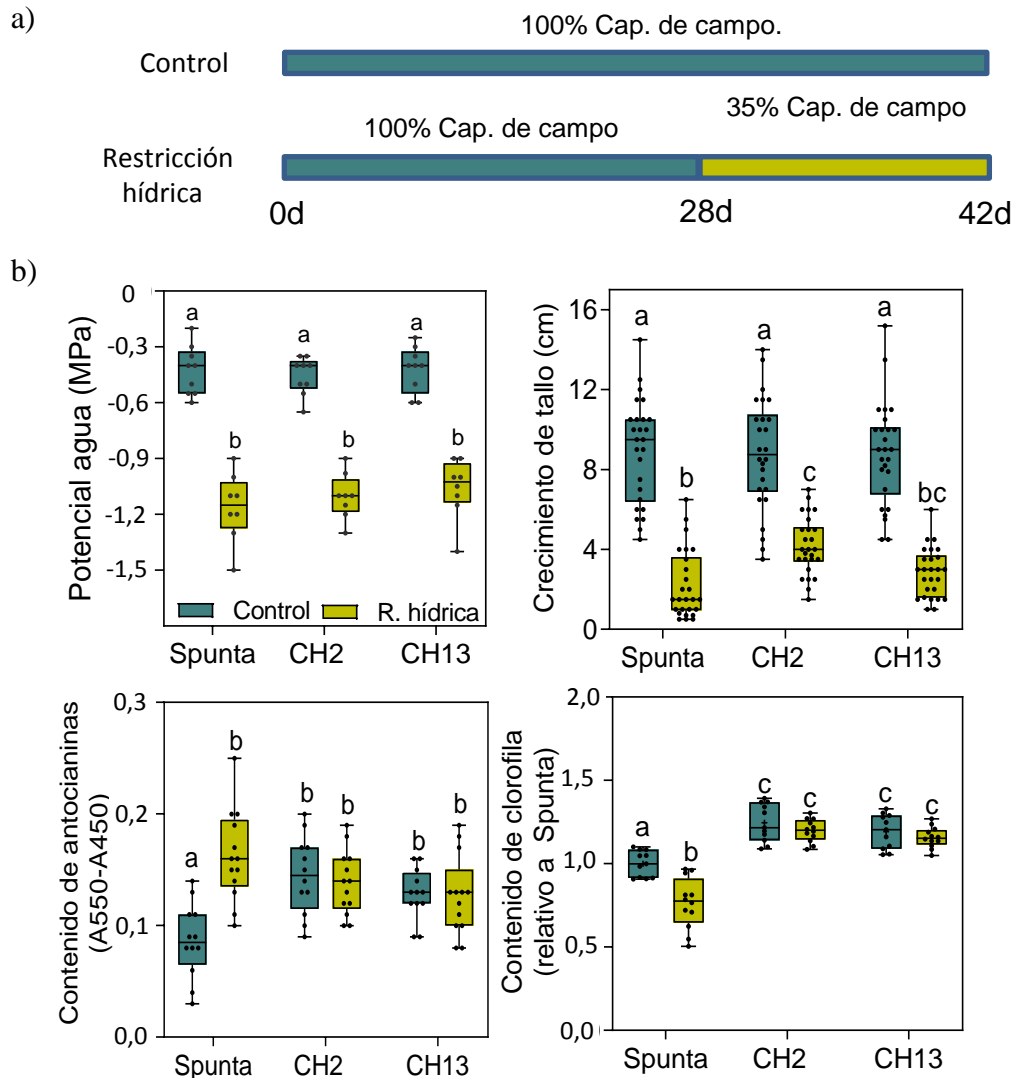


Figura 3.27: Diagrama del diseño experimental y caracterización morfológica y de pigmentos en plantas de las líneas CH2 y CH13 creciendo bajo distintos regímenes hídricos.

a) Las plantas Spunta sin transformar y las transgénicas CH2 y CH13 se cultivaron durante 28 días a capacidad de campo y luego se expusieron a restricción hídrica moderada durante 14 días adicionales (con buen riego = 100% y restricción hídrica = 35% de disponibilidad de agua). b) Potencial agua foliar a las 10 am en un día soleado ( $n=9$ ), crecimiento del tallo ( $n=26$ ), contenido de antocianinas ( $n=16$ ) y niveles de clorofila de las hojas basales ( $n=12$ ) en plantas de 42 días de edad cultivadas bajo tratamiento control (bien regadas) o restricción hídrica moderada. Las cajas muestran los cuartiles y los bigotes los máximos y mínimos. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre las medias analizadas mediante una prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Las plantas cultivadas en un suelo a capacidad de campo (bien regado) mostraron un potencial agua en sus hojas de -0,4 Mpa mientras que el tratamiento de restricción hídrica redujo el potencial agua a -1,2 Mpa (Fig. 3.27b). Se observó que las plantas Spunta sin transformar redujeron drásticamente el crecimiento en altura de 9 cm a 2 cm. La inhibición

del crecimiento por sequía fue menor en las plantas *BBX21-OE* que en las plantas sin transformar (Fig. 3.27b y 3.28). Los niveles de antocianinas aumentaron significativamente en las plantas Spunta en el tratamiento de sequía, mientras que los niveles fueron constitutivamente elevados en las plantas *BBX21-OE* independientemente de la condición hídrica. La restricción hídrica redujo el contenido de clorofila en las hojas basales de las plantas Spunta sin transformar, pero se encontraron niveles de clorofila constitutivamente elevados en las hojas de *BBX21-OE* (Fig. 3.27).

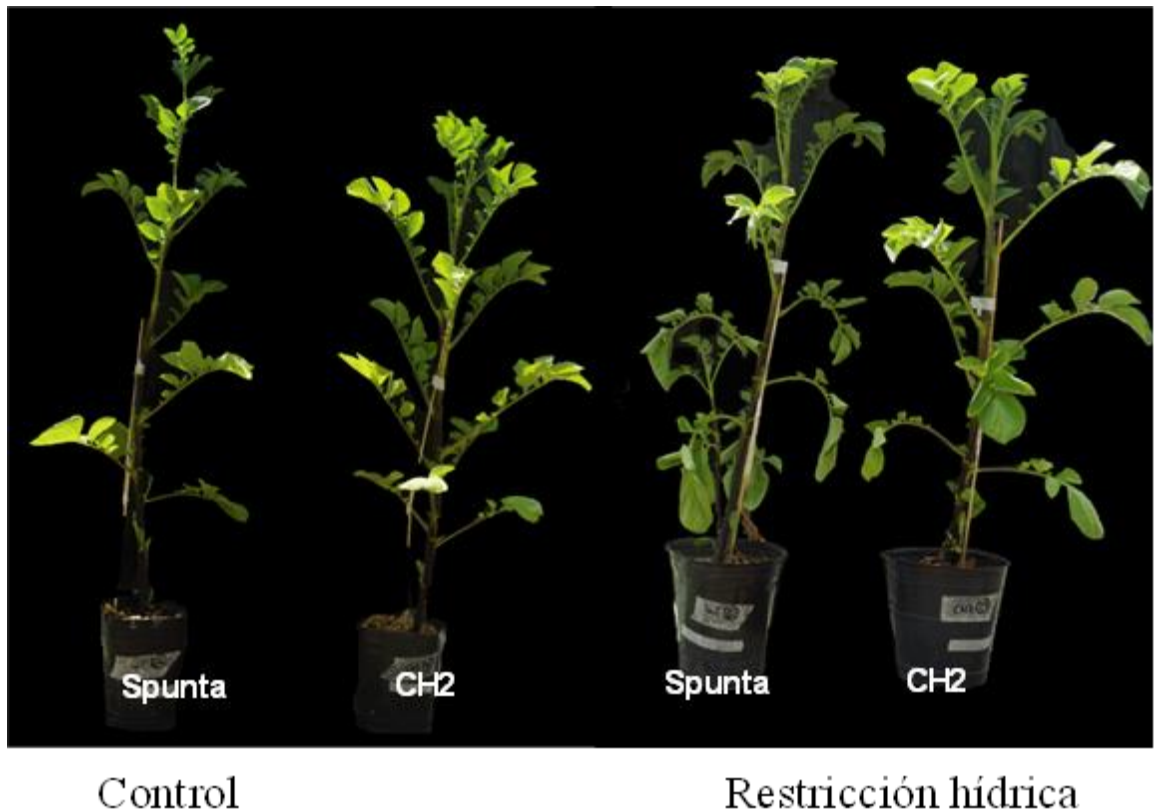


Figura 3.28: Fotos representativas de plantas de papa Spunta y *BBX21-OE* (CH2) de 42 días de edad bien regadas y en restricción hídrica moderada.

**Las plantas de papa *BBX21-OE* producen mayor fotosíntesis bajo restricción hídrica**  
 Con estos resultados, surge como pregunta si los mayores niveles de clorofila de las plantas *BBX21-OE* que crecen en sequía moderada pueden inducir un mejor comportamiento fotosintético. Para poder comprobar esta idea, se midió la tasa de fotosíntesis, la conductancia estomática (gs), la tasa de transpiración y la concentración de CO<sub>2</sub> de la cámara estomática (Ci) en plantas de 42 días de edad. Se siguió el mismo protocolo experimental expuesto en la sección anterior para el tratamiento de restricción hídrica (Fig.

3.29). Se observó que las plantas de las dos líneas de *BBX21-OE* produjeron tasas de fotosíntesis más altas que las plantas Spunta sin transformar, entre los  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPF, independientemente del tratamiento hídrico. Con irradiancias saturantes, las plantas *BBX21-OE* tuvieron una tasa de fotosíntesis 64% mayor que las plantas Spunta sin transformar en condiciones de capacidad de campo, aumentando las diferencias fotosintéticas a 240% entre genotipos en el tratamiento de restricción hídrica. En el tratamiento de capacidad de campo, la conductancia estomática ( $g_s$ ) y la tasa de transpiración fueron más altas en *BBX21-OE* que en las plantas Spunta sin transformar, mientras que  $E_{UA}$  y  $C_i$  fueron similares entre genotipos. Por el contrario, en condiciones de restricción hídrica, la  $g_s$  y la tasa de transpiración fueron similares entre los genotipos y  $C_i$  fue mayor en las plantas Spunta sin transformar comparadas con *BBX21-OE*. La  $E_{UA}$  fue 245% mayor en las plantas *BBX21-OE* comparadas con las plantas Spunta sin transformar a irradiancias superiores a  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 3.29). Estos resultados indican que las diferencias en la tasa de fotosíntesis entre las plantas *BBX21-OE* y Spunta sin transformar se correlacionan con la  $E_{UA}$  y no con  $g_s$ . En consecuencia, bajo condiciones de restricción hídrica, la  $E_{UA}$  mayor de las plantas sobreexpresantes sugiere que el factor de transcripción *BBX21* le confiere una mayor eficiencia para producir una mayor biomasa por unidad de agua utilizada, manteniendo tasas de fotosíntesis más altas.



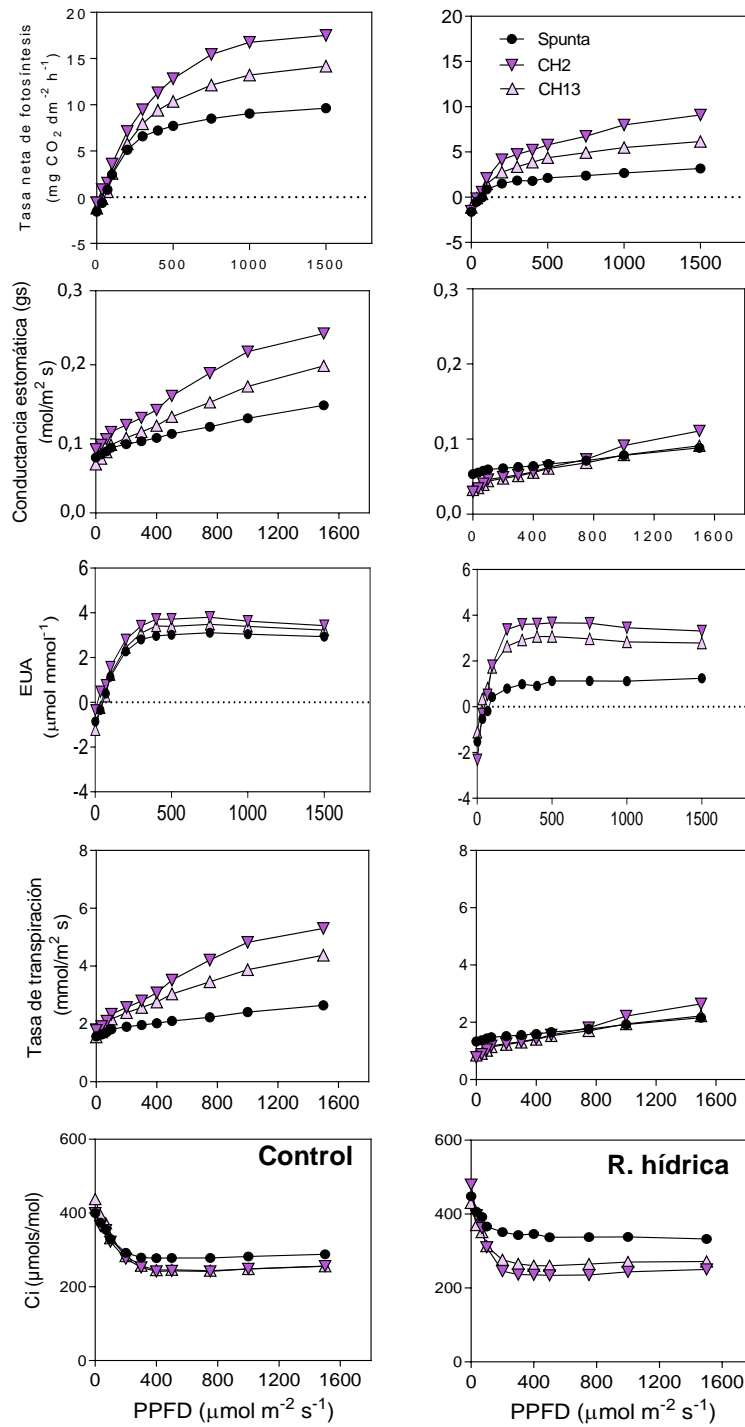


Figura 3.29: Medición de parámetros relacionados con la fotosíntesis y de expresión de genes asociados en plantas de las líneas CH2 y CH13 creciendo bajo distintos regímenes hídricos. Fotosíntesis neta, conductancia estomática (gs), EUA, tasa de transpiración y concentración de  $\text{CO}_2$  de la cámara estomática (Ci) en función de PPFD en plantas de 42 días de edad (Spunta, CH2 y CH13) cultivadas bajo tratamiento control (bien regadas) o con restricción hídrica moderada ( $n=4$ ). Las mediciones se realizaron entre las 10 am y las 15:30 pm.

**Las plantas de papa *BBX21-OE* son menos sensibles a la fotoinhibición durante las primeras horas de la mañana bajo restricción hídrica**

Para entender mejor las respuestas en la fotosíntesis de las plantas *BBX21-OE* bajo condiciones de restricción hídrica, se diseñó un experimento para evaluar la cinética diurna de los parámetros fotosintéticos en cuatro momentos de un día soleado: 7 am, 9 am, 14 pm y 19:30 pm. Las mediciones se hicieron en plantas de ambos genotipos de 42 días de edad bajo idénticas condiciones experimentales establecidas previamente (Fig. 3.30). A las 7 am, minutos después del amanecer, la tasa de fotosíntesis fue similar para los dos genotipos y tratamientos debido a que los estomas comienzan a abrirse con la aparición de la luz solar. A las 9 am, en el tratamiento de capacidad de campo, la tasa de fotosíntesis fue 20% más baja en las plantas Spunta sin transformar que en las sobreexpresantes *BBX21-OE*. En el tratamiento de restricción hídrica, las diferencias entre genotipos en fotosíntesis y conductancia del mesófilo ( $g_m$ ) fueron mayores comparado con el tratamiento bien regado. Por ejemplo, a las 9 am, la tasa de fotosíntesis, medida a una saturación de  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPF, fue aproximadamente de  $20 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en *BBX21-OE* y de aproximadamente  $10 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en plantas Spunta sin transformar cultivadas bajo restricción hídrica. Las diferencias de fotosíntesis observadas, entre los genotipos *BBX21-OE* y Spunta sin transformar, se correlacionaron con una mayor conductancia del mesófilo ( $g_m = \sim 0,8$  vs  $\sim 0,4 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), una mayor conductancia estomática ( $g_s = \sim 0,2$  vs  $\sim 0,13 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y una EUA más alta ( $\sim 0,13$  vs  $\sim 0,08 \mu\text{mol mmol}^{-1}$ ). El mayor contraste entre tratamientos hídricos se encontró a las 14 pm, donde la tasa neta de fotosíntesis fue casi nula para las plantas del tratamiento de restricción hídrica, independientemente de los genotipos. A las 19 pm la tasa de fotosíntesis de ambos genotipos creció en las dos condiciones hídricas fue casi nula, debido a la ausencia de luz debido a la puesta del sol (Fig. 3.30).

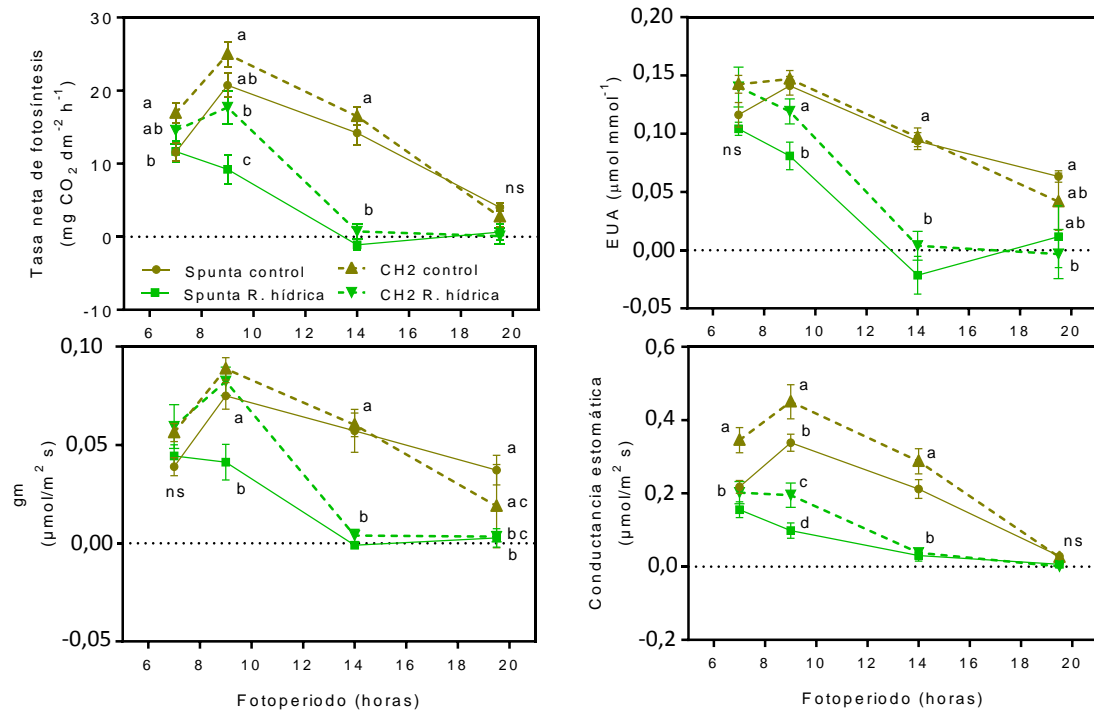


Figura 3.30: Marcha diaria de los parámetros relacionados con la fotosíntesis en plantas de la línea CH2 creciendo bajo distintos regímenes hídricos.

Marcha diaria de la tasa neta de fotosíntesis, EUA, conductancia del mesófilo (gm) y conductancia estomática en plantas de 42 d de edad (Spunta y CH2) cultivadas bajo tratamiento control (bien regadas) o restricción hídrica moderada (n= 6 réplicas biológicas). Los datos son medias  $\pm$  ES. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre las medias. Tukey (P < 0,05).

### Las plantas *BBX21-OE* tienen mayor difusión de CO<sub>2</sub> al cloroplasto bajo restricción hídrica.

Con el objetivo de tener una mejor comprensión de los mecanismos fisiológicos que subyacen en un mejor comportamiento fotosintético de las plantas sobreexpresantes de *BBX21* bajo restricción hídrica, se graficó la tasa de fotosíntesis neta en función de la concentración de CO<sub>2</sub> en el cloroplasto (Cc) y la relación Cc/Ci. Se encontró una asociación lineal positiva con Cc y la relación Cc / Ci ( $R^2 = 0,79$  y  $R^2 = 0,75$ , respectivamente; Fig. 3.31). La variabilidad de la fotosíntesis a la misma disponibilidad de Cc (eficiencia fotosintética) se cuantificó mediante el análisis de la relación Fotosíntesis/Cc. No se observaron diferencias significativas en la relación Fotosíntesis/Cc entre plantas de ambos genotipos cultivadas a capacidad de campo. Sin embargo, la relación Fotosíntesis/Cc fue 50% más alta en *BBX21-OE* que en plantas Spunta sin

transformar bajo una restricción hídrica ( $P= 0,0484$ ; Fig. 3.31). Además, se observaron diferencias significativas en la relación  $C_c/C_i$  entre genotipos bajo restricción hídrica moderada ( $P < 0,0001$ ; Fig. 3.31).

En resumen, los resultados obtenidos demuestran que bajo restricción hídrica, el  $CO_2$  que difunde desde la cámara subestomática al interior del cloroplasto, es mayor en las plantas *BBX21-OE* (Fig. 3.31,  $C_c/C_i$ ), y que a una misma concentración de  $CO_2$  en el cloroplasto la tasa de fotosíntesis es mayor en las plantas *BBX21-OE* (Fig. 3.31).

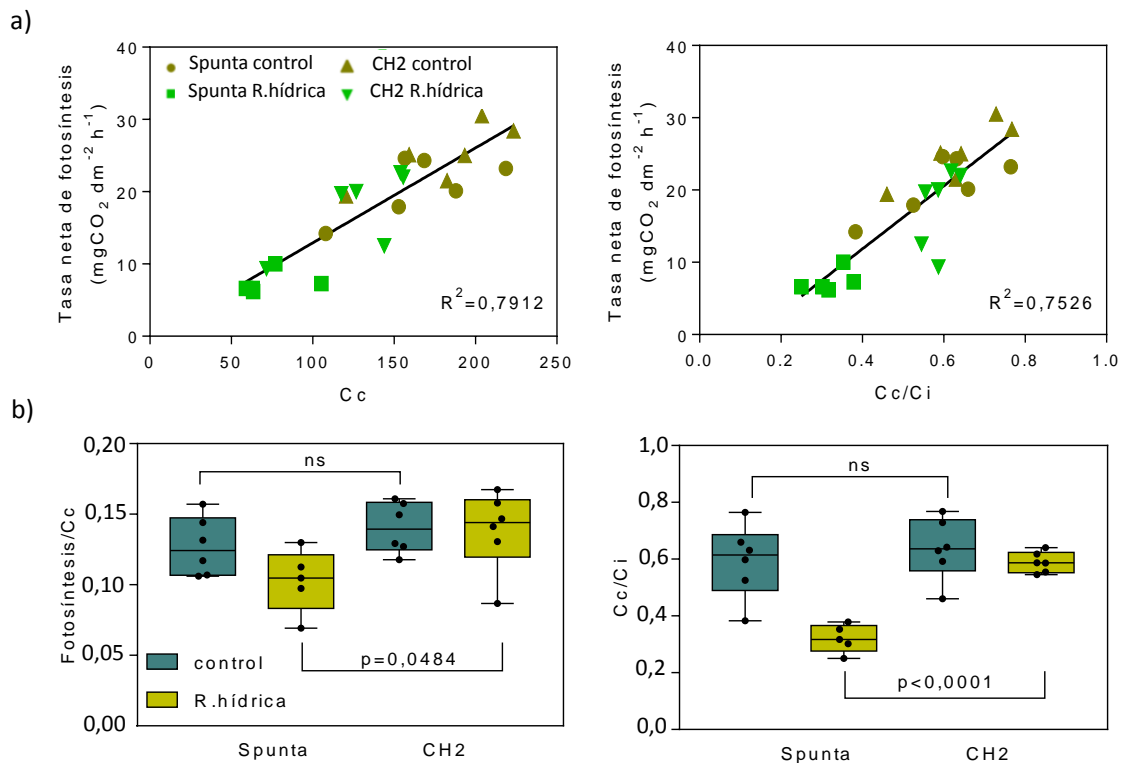


Figura 3.31: Tasa de fotosíntesis en función de  $C_c$  en plantas de la línea CH2 creciendo bajo distintos regímenes hídricos.

a) Tasa de fotosíntesis neta representada en función de  $C_c$  (concentración de  $CO_2$  en el cloroplasto) y con la relación  $C_c/C_i$  (concentración de  $CO_2$  en la concentración de cloroplasto/ $CO_2$  en la cámara estomática). Se indican los  $R^2$  del análisis de regresión lineal. B) Fotosíntesis neta por unidad de  $C_c$  (Fotosíntesis/ $C_c$ ) y relación  $C_c/C_i$  entre plantas Spunta y *BBX21-OE* cultivadas bajo tratamiento control (bien regado) o restricción hídrica moderada. Los datos corresponden a las medidas realizadas a las 9 am (ver Fig. 3.30). Las cajas muestran los cuartiles y los bigotes los máximos y mínimos. Ns no significativo y los valores p fueron analizados mediante una prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

**Las plantas *BBX21-OE* tienen mayor afinidad bioquímica para la fotosíntesis bajo restricción hídrica**

Para tener una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en las relaciones Fotosíntesis/ $C_c$  más altas observadas en las líneas *BBX21-OE* bajo sequía, se realizaron curvas de fotosíntesis neta en función de  $C_c$  mediante la manipulación de las concentraciones de  $CO_2$  (Fig. 3.32). La mayor eficiencia fotosintética (Fotosíntesis/ $C_c$ ) de las líneas *BBX21-OE* se asoció con una tasa máxima de transporte de electrones fotosintéticos ( $J_{max}$ ) en lugar de diferencias en la máxima tasa de actividad carboxilasa de Rubisco ( $V_{cmax}$ ) bajo estrés hídrico moderado (Fig. 3.32c). Con el fin de fortalecer los análisis de  $J_{max}$  estimados a través del modelo de fotosíntesis desarrollado por Farquhar et al. (1980), se estimó este parámetro mediante el uso de mediciones empíricas de  $J_{max}$  realizadas por el analizador Li-6400 estableciendo la celda de referencia ( $CO_2R$ ) en  $1500 \mu mol mol^{-1}$ . Los resultados obtenidos en forma empírica e independientemente mostraron el mismo patrón (Fig. 3.33). Se obtuvieron diferencias significativas en los valores de  $g_m$  entre genotipos estimados bajo concentraciones normales de  $CO_2$  de 400 ppm (Fig. 3.32b), lo que confirma los resultados del experimento de mediciones diurnas de la fotosíntesis a las 9 am (Fig. 3.30). Además, no se encontró ninguna asociación entre la tasa de fotosíntesis neta y  $C_i$  (Fig. 3.34), lo que sugiere que este último parámetro no explica las diferencias observadas en la tasa de fotosíntesis entre genotipos bajo sequía moderada.

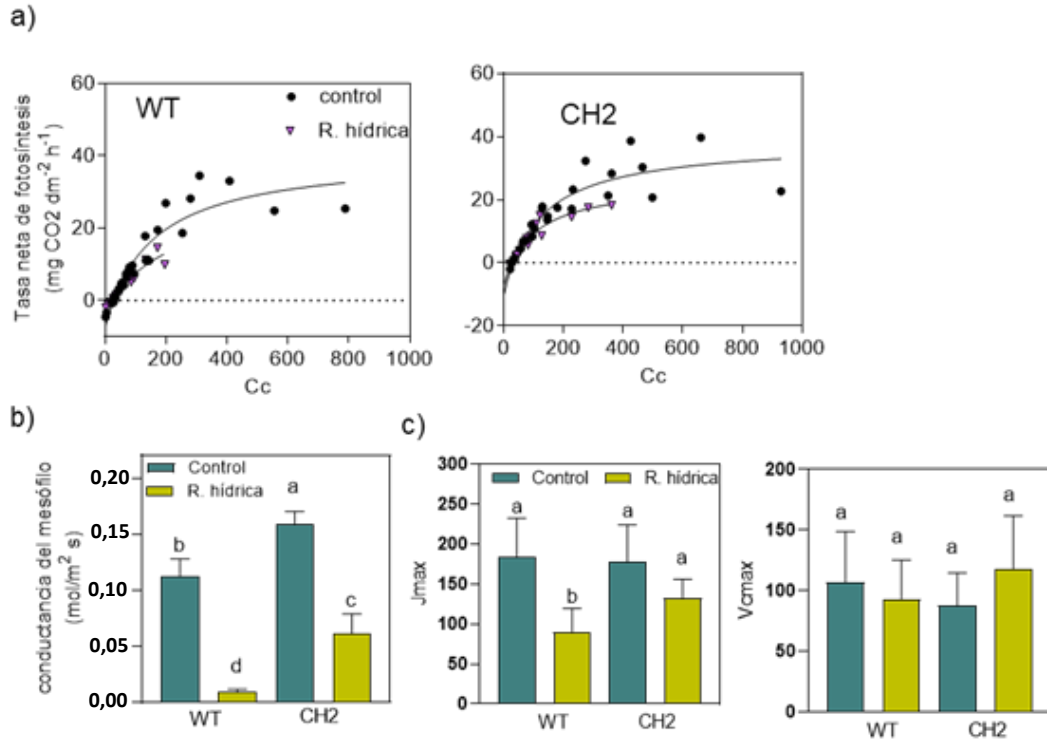


Figura 3.32: Medición de la fotosíntesis neta en función de la concentración de  $\text{CO}_2$  en el cloroplasto y estimación de la conductancia del mesófilo en plantas de la línea CH2 creciendo bajo distintos regímenes hídricos.

a) Fotosíntesis neta en función de la concentración de  $\text{CO}_2$  en el cloroplasto ( $C_c$ ) en plantas de 42 días de edad de los genotipos Spunta (WT) y *BBX21-OE* (CH2) creciendo en condiciones control o con restricción hídrica moderada ( $n=4$ ). b) Estimación de la conductancia del mesófilo ( $g_m$ ) a partir de las mediciones realizadas en condiciones normales de  $\text{CO}_2$  (400 ppm). c) Estimación de  $J_{\text{max}}$  y  $V_{\text{cmax}}$ . Las medias se muestran con barras de error que indican ES. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre las medias (prueba de Tukey;  $P < 0,05$ ).

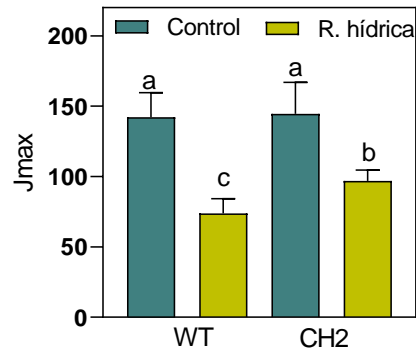
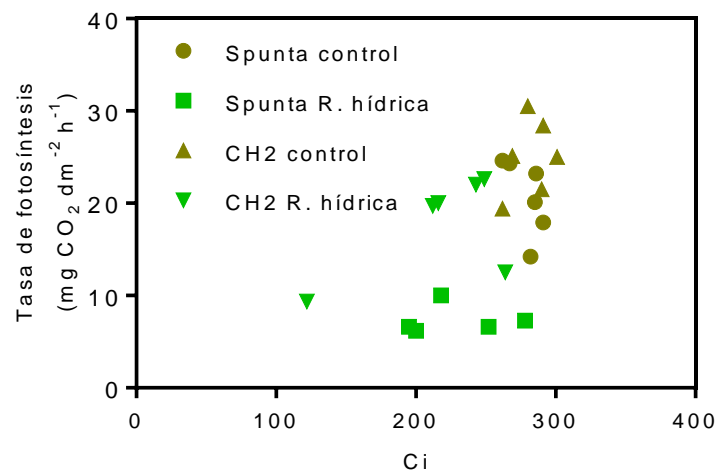


Figura 3.33: Mediciones empíricas de la tasa máxima de transporte de electrones fotosintéticos ( $J_{max}$ ).

Las mediciones fueron realizadas por el analizador Li-6400, estableciendo la celda de referencia ( $\text{CO}_2\text{R}$ ) en  $1500 \mu\text{mol mol}^{-1}$ . Las medias se muestran con barras de error que indican ES. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre las medias (prueba de Tukey;  $P < 0,05$ ).

Resumiendo, los resultados de esta tesis sugieren que las líneas *BBX21-OE* cultivadas bajo sequía moderada tienen una tasa de fotosíntesis más alta debido a dos razones. Primero, el gm más alto en la mañana (Fig. 3.30) es una consecuencia de una mayor difusión de  $\text{CO}_2$  al cloroplasto (por ejemplo, relación  $C_c / C_i$ ; Fig. 3.31b). En segundo lugar, el  $J_{max}$  más alto (Fig. 3.33) contribuye a una mayor eficiencia fotosintética al mismo  $C_c$  (por ejemplo, relación Fotosíntesis/ $C_c$ ; Fig. 3.31b).



Plantas Spunta sin transformar (círculos) y *BBX21-OE* (triángulos) en condiciones bajo buen riego (control) y restricción hídrica moderada. Los datos corresponden al experimento de la Fig. 3.30.

**Las plantas de papa *BBX21-OE* son menos sensibles al ABA bajo restricción hídrica**

Por bibliografía se sabe que el ABA es la principal hormona implicada en la respuesta al estrés mediada por hormonas en las plantas (Nakashima y Yamaguchi-Shinozaki, 2013; Kuromori et al., 2018; Lee y Luan, 2012). Se evaluó el contenido de ABA en hojas de 42 días de edad de plantas Spunta sin transformar y *BBX21-OE* cultivadas en condiciones control o restricción hídrica. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de la hormona entre los genotipos bajo un mismo tratamiento (Fig. 3.35). Para evaluar la respuesta a la sensibilidad de ABA asociada con la apertura de los estomas, se diseñó un bioensayo con hojas cortadas de plantas de 21 días de edad colocadas durante 1 hora en un medio con diferentes soluciones de ABA (1 y 10  $\mu\text{M}$ ). Se pudo observar que la apertura de los estomas fue similar entre las hojas de Spunta y de *BBX21-OE* a 0 y 10  $\mu\text{M}$  de ABA, pero se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos en hojas expuestas a 1  $\mu\text{M}$  de ABA (Fig. 3.35)



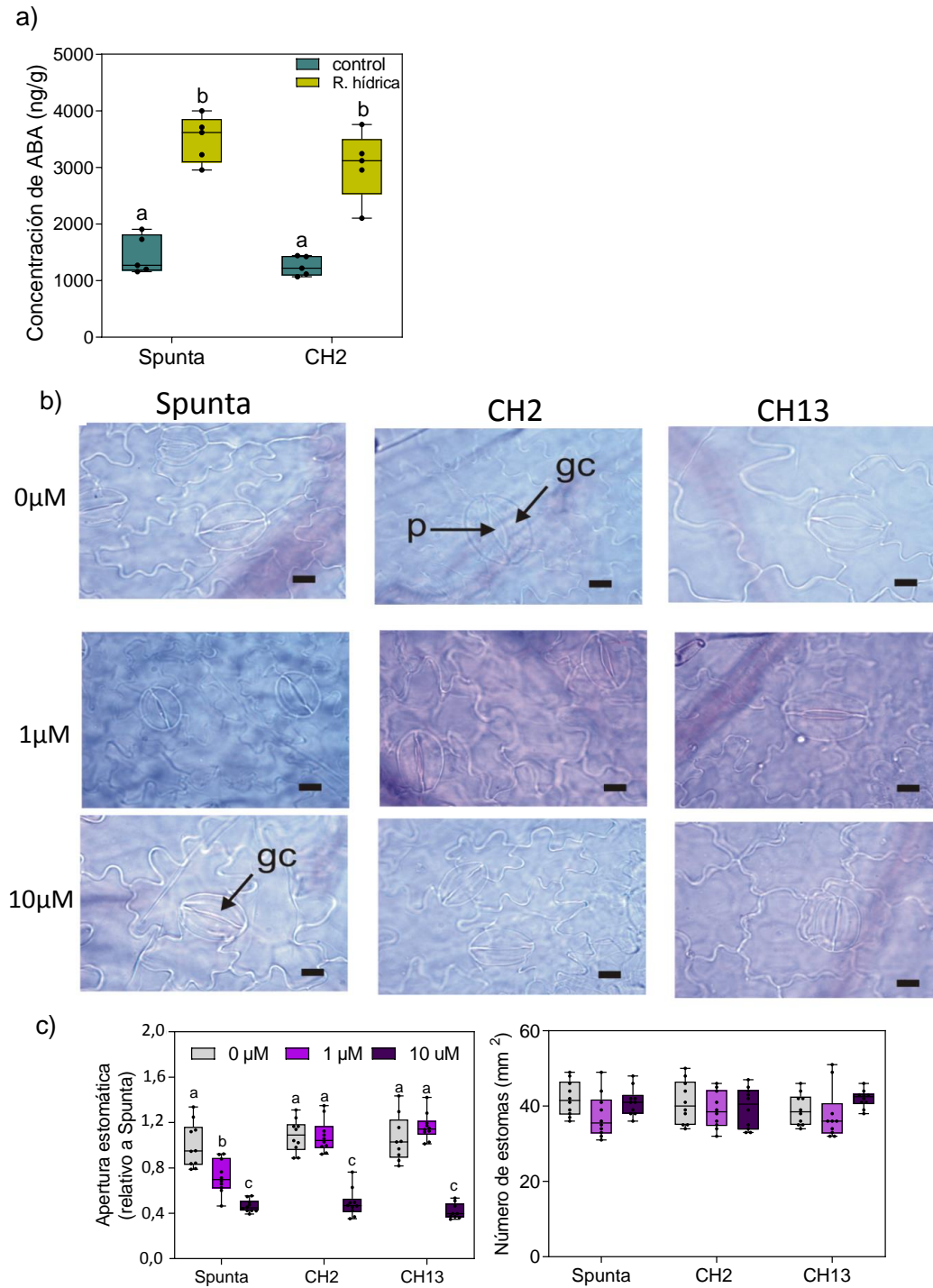


Figura 3.35: Bioensayo de sensibilidad al ácido abscísico (ABA) en hoja cortada en plantas de la línea CH2 y CH13, contenido de ABA en plantas de la línea CH2 creciendo bajo distintos regímenes hídricos.

a) Contenido de ABA en plantas de 42 días de edad (Spunta y CH2) cultivadas en condiciones control (bien regadas) o con restricción hídrica moderada (n= 5). b) Fotos representativas que muestran la apertura de los estomas en hojas de Spunta sin transformar y de *BBX21-OE* (CH2 y CH13) embebidas con 0, 1 y 10  $\mu$ M de ABA. Abreviaturas: gc, células de guarda del estoma yp,

poro estomático. Escala: 10  $\mu\text{m}$ . b) Apertura y número de estomas en hojas separadas expuestas a diferentes niveles de ABA ( $n=10$ ). Las cajas muestran los cuartiles y los bigotes los máximos y mínimos. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre las medias analizadas mediante una prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Para confirmar estos resultados en forma independiente y bajo una condición más real, se diseñó un nuevo experimento donde se aplicó ABA en forma de spray en diferentes concentraciones (0, 2,5 y 100  $\mu\text{mol}$  de ABA) en hojas de plantas de 42 días de edad bien regadas. A las plantas control se le aplicó un spray de una solución de agua (Fig. 3.36). En este experimento se encontraron diferencias significativas en la tasa de fotosíntesis,  $g_s$  y  $C_c$  en las plantas *BBX21-OE* comparadas con las plantas Spunta, cuando les aplicó 2,5  $\mu\text{mol}$  pero no al aplicar 100  $\mu\text{mol}$  de ABA. Estos resultados confirman los resultados de hoja cortada y sugieren que las plantas de las líneas *BBX21-OE* son más tolerantes a una restricción hídrica moderada porque son menos sensible al ABA.

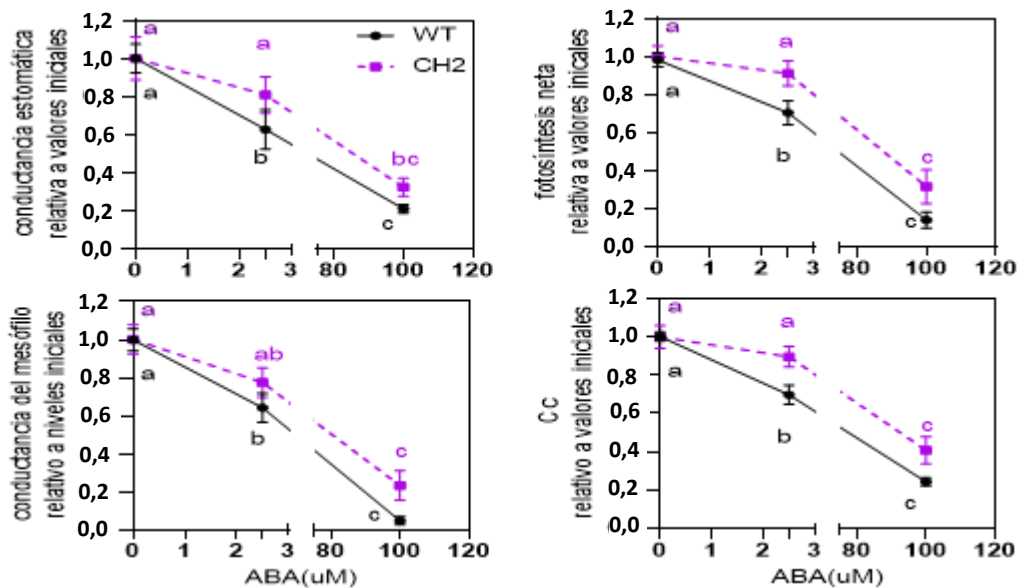


Figura 3.36: Bioensayo de sensibilidad al ABA en planta entera en plantas de la línea CH2 y CH13. Conductancia estomática ( $g_s$ ), fotosíntesis neta, conductancia del mesófilo ( $g_m$ ), y concentración de  $\text{CO}_2$  en el cloroplasto ( $C_c$ ), medidos en plantas de 21 días de edad bien regadas (WT y CH2) a las que se les aplicó un spray con agua o con ABA 2,5 y 100  $\mu\text{M}$ . Los datos son medias  $\pm$  ES, relativos al tiempo inicial ( $n=10$ ). Letras diferentes denotan diferencias significativas entre las medias (Tukey;  $P < 0,05$ ).

**Las plantas de papa *BBX21-OE* tienen mayor rendimiento de tubérculos bajo restricción hídrica**

Para comprender mejor el efecto de la restricción hídrica en el rendimiento de tubérculos, se diseñó un experimento en el que se cultivaron las plantas durante 42 días a capacidad de campo y luego se redujo el agua en las macetas al 35% de capacidad de campo durante 28 días adicionales. En el día 70, las macetas se volvieron a regar a capacidad de campo hasta el final del experimento en el día 96, cuando se midió el peso seco de las plantas y el número y peso de los tubérculos por planta. La biomasa seca total fue ligeramente mayor, pero no se encontraron diferencias significativas entre las plantas *BBX21-OE* y Spunta. El número de tubérculos aumentó en las plantas Spunta cultivadas bajo restricción hídrica con respecto a la condición de riego control, y fue constitutivamente alto en las plantas *BBX21-OE* independientemente del tratamiento del agua. Por el contrario, las plantas *BBX21-OE* mostraron un peso significativamente mayor de tubérculos que las plantas Spunta en las condiciones control (bien regadas) y restricción hídrica moderada (112,15% vs. 100% y 70,12% vs. 59,40%, respectivamente; Fig. 3.37).

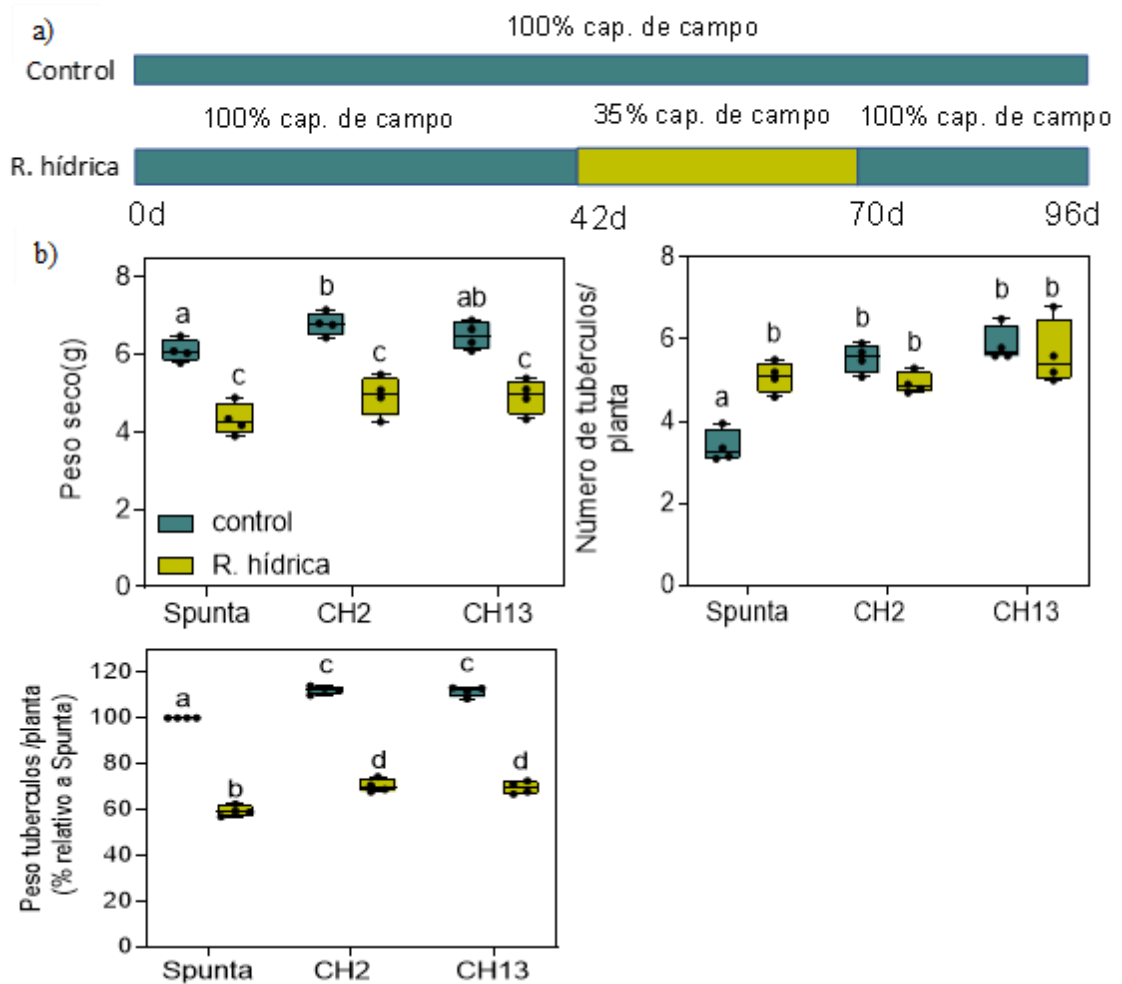


Figura 3.37: Caracterización del rendimiento de las plantas de la línea CH2 y CH13 creciendo bajo distintos regímenes hídricos.

a) Diagrama del diseño experimental utilizado para evaluar características de rendimiento en plantas de 96 días de edad. Las plantas se cultivaron durante 42 días a capacidad de campo, luego se expusieron a una restricción hídrica moderada durante 28 días (bien regado = 100% y R. hídrica = 35% de disponibilidad de agua), y luego a 26 días a capacidad de campo para la recuperación. b) Peso seco, número de tubérculos y peso de tubérculos en plantas de 96 días (Spunta, CH2, CH13) cultivadas en condiciones control (bien regadas) o con restricción hídrica moderada. Las cajas muestran los cuartiles y los bigotes los máximos y mínimos. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre las medias analizadas mediante una prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ), de cuatro experimentos independientes ( $n = 4$ ).

### **BBX21 regula la expresión de factores de transcripción, acuaporinas y genes de fotosíntesis bajo restricción hídrica**

Para obtener una idea de los mecanismos moleculares regulados por BBX21 en condiciones de restricción hídrica moderada en las plantas de papa, se hizo un RNAseq para analizar el transcriptoma de plantas de papa de 42 días de edad cultivadas en condiciones control (bien regadas) y restricción hídrica, utilizando el protocolo experimental descrito en la Fig. 3.27a. En primer lugar, se comparó los genes expresados diferencialmente por restricción hídrica en plantas Spunta sin transformar. Se encontraron 1494 genes expresados diferencialmente entre bien regados y restricción hídrica. De estos genes, se seleccionaron 491 genes regulados positivamente y 1003 regulados negativamente por la restricción hídrica (Cuadros suplementarios 3.6 y 3.7). Para identificar genes blanco-regulados por BBX21, se comparó la expresión génica entre las plantas Spunta y *BBX21-OE* cultivadas bajo restricción hídrica. Se encontraron 841 genes expresados diferencialmente entre los genotipos Spunta y *BBX21-OE* bajo restricción hídrica. De esa población de genes, se identificaron 318 genes regulados positivamente y 523 genes regulados negativamente por BBX21. Se hizo un análisis dCHIP y se identificaron dos grupos de genes (clusters 1 y 2, Fig. 3.38) para los siguientes análisis. El cluster 1 agrupó 189 genes regulados negativamente y 21 genes regulados positivamente en Spunta por restricción hídrica y constitutivamente regulados negativamente en plantas *BBX21-OE* independientemente de la condición hídrica (Cuadros suplementarios 3.8 y 3.9). El cluster 2 agrupó 15 genes regulados negativamente en Spunta por restricción hídrica y constitutivamente estable o elevados en plantas *BBX21-OE* (cuadro suplementario 3.10). Para un análisis más detallado, se seleccionaron aquellos genes regulados negativamente por la restricción hídrica en Spunta (cluster 1: 189 genes y cluster 2: 15 genes, Cuadros suplementarios 3.8 y S3.10, respectivamente). Se hizo un análisis de homología entre *S. tuberosum* y *A. thaliana* para encontrar genes homólogos entre especies. Entre los resultados, se hizo hincapié en genes relacionados con procesos involucrados en las respuestas a estrés hídrico, como crecimiento, fotosíntesis, estrés, apertura estomática y conductancia del mesófilo. En esta selección se identificaron los transcriptos *MYB73*, *SLAC1 HOMOLOGUE 3 (SLAH3)*, *SMALL AUXIN UPREGULATED RNA 76 (SAUR76)*, *TCP FAMILY TRANSCRIPTION FACTOR 4 (TCP4)*, *DREB2A*, *ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1 (ERF1)*, *1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID SYNTHASE 6 (ACS6)*, *ETHYLENE-*

*DEPENDENT GRAVITROPISM-DEFICIENT AND YELLOW-GREEN 1 (EGY1)*, *DELTA TONOPLAST INTEGRAL PROTEIN (TIP2-1)*, *STRESS-ASSOCIATED PROTEIN 12 (SAP12)* y varias “heat shock protein” como genes blancos de BBX21 (Cuadros suplementarios 3.8 y S3.10).

Se evaluó la expresión génica de *MYB73*, *EGY1*, *DREB2A*, *RCA*, *SLAH3* y *SAP12* mediante qRT-PCR (Fig. 3.39). Aunque *RCA* no se lo identifico en el RNAseq como un gen regulado por BBX21 bajo restricción hídrica, se lo incluyó en el análisis de expresión génica porque es necesario para la activación por luz de rubisco directamente asociada con las tasas de fotosíntesis (Foyer y Harbinson, 2012). Se pudo confirmar que BBX21 regula la expresión génica del factor de transcripción MYB73 asociado a las respuestas de crecimiento (Yang et al., 2020) y otros genes asociados a la señalización de la fotosíntesis como *EGY1* y *TIP2-1* (Sanjaya et al., 2021; Pou et al., 2013) y también genes regulados por estrés (*DREB2A* (Sakuma et al., 2006) y *SAP12* (Ströher et al., 2009) en plantas de papa cultivadas en restricción hídrica moderada. *MYB73* y *TIP2-1* fueron regulados negativamente en Spunta por restricción hídrica y constitutivamente estable o elevados en plantas *BBX21-OE*, mientras que *EGY1*, *SAP12* y *DREB2A* fueron regulados negativamente en Spunta por restricción hídrica y constitutivamente regulados negativamente en plantas *BBX21-OE* independientemente de la condición hídrica. No se pudieron encontrar diferencias estadísticas en la expresión de genes *RCA* y *SLAH3* entre genotipos y tratamientos de agua (Fig. 3.39).

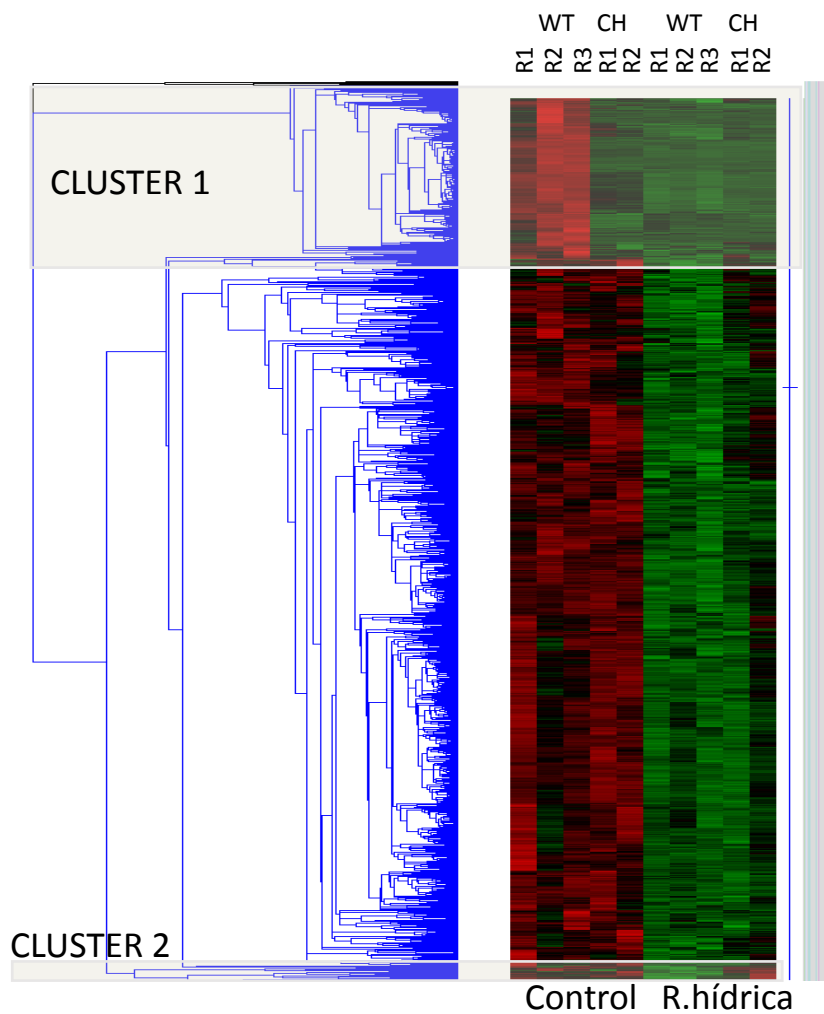


Figura 3.38: Transcriptoma de genes regulados por BBX21 en sequía. El “*heat map*” muestra 841 genes expresados diferencialmente en plantas Spunta y *BBX21-OE* bajo restricción hídrica. Los clusters 1 y 2 están resaltados. Datos obtenidos por el Dr. Carlos Crocco.

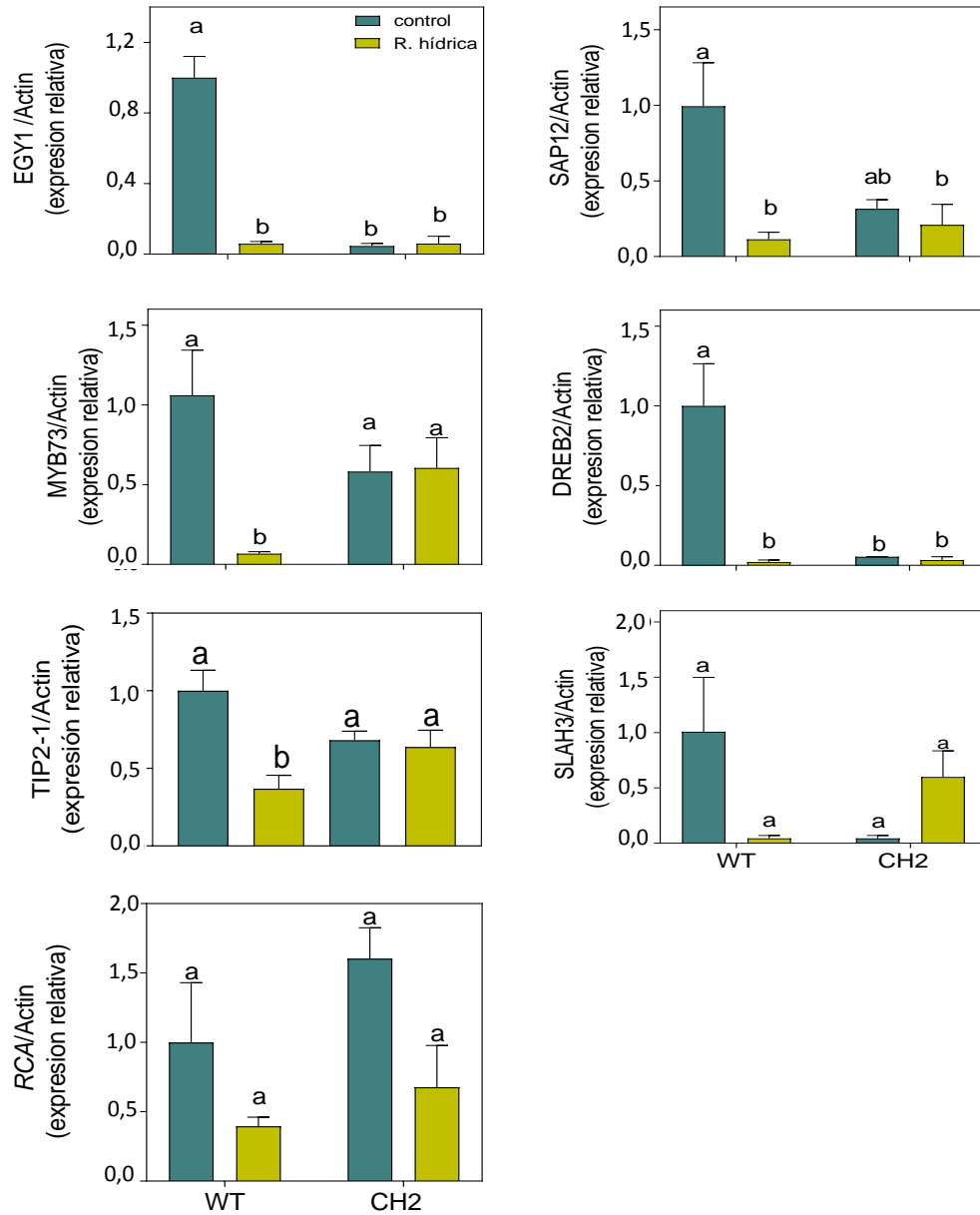


Figura 3.39: Cuantificación de la expresión de genes diferencialmente expresados entre tratamientos de riego en plantas Spunta y *BBX21-OE* mediante qRT-PCR, como validación de resultados del análisis RNAseq.

Expresión relativa de genes regulados negativamente en Spunta y regulados negativamente de forma constitutiva en *BBX21-OE*, según los datos RNAseq. Se analizaron plantas de 42 días de edad de los genotipos Spunta y CH2, cultivadas en condición control (bien regadas) o con restricción hídrica moderada. Los datos son medias  $\pm$  ES (n= 3). Letras diferentes denotan diferencias significativas entre las medias (prueba de Tukey;  $P < 0,05$ ).



## CAPITULO 4: DISCUSIÓN

A lo largo de la evolución, las plantas han seleccionado mecanismos moleculares asociados a señales endógenas como las hormonas para adaptarse a un ambiente circundante cambiante y poco uniforme. El ambiente que rodea a las plantas está compuesto de señales abióticas y bióticas que pueden variar durante las horas del día y también por cambios estacionales (Fujita et al., 2006b). Entre otras señales, la luz es fuente de información del ambiente circundante que la planta utiliza para ajustar su crecimiento y desarrollo; y, además, es fuente de energía para la síntesis de fotoasimilados. La luz participa en la regulación de numerosos procesos de desarrollo como la germinación, la fotomorfogénesis de la plántula, la percepción de plantas vecinas y la floración, entre otros. Las plantas son capaces de sensar eficientemente la calidad, la cantidad y la dirección de la luz a través de los fotorreceptores que absorben fotones de diferentes rangos de longitudes de onda e inician una cascada de señalización que promueve distintas respuestas fisiológicas (Huber et al., 2021). Entre estos fotorreceptores y la respuesta final existe una red de factores de transcripción implicados directa o indirectamente en la transducción de señales. Por su parte, las fitohormonas actúan como reguladores endógenos integrando distintas señales químicas en las células para el ajuste y coordinación de los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas (Fernández-Milmanda y Ballaré, 2021).

Más de 1500 factores de transcripción participan en la regulación transcripcional en *A. thaliana* (Mitsuda y Ohme-Takagi, 2009; Guo et al., 2005). Estos factores de transcripción se clasifican según sus dominios estructurales que les confieren funciones específicas. Las proteínas BBX son factores de transcripción que tienen uno o dos dominios B-Box en su región amino terminal y pueden contener dominios CCT en su región carboxilo terminal. Los primeros trabajos de BBX en plantas fueron realizados estudiando la función de CONSTANS/BBX1 en el control fotoperiódico de la floración (Suárez-López et al., 2001). En los últimos 10 años, numerosos trabajos se han publicado sobre la función de las proteínas BBX en *A. thaliana* y en muchas otras especies cultivables. Todos los estudios coinciden que estos factores de transcripción tienen una alta homología y funciones conservadas, lo que sugiere que son factores de transcripción relevantes para el ciclo de vida de la planta (Crocco y Botto, 2013; Yavad et al., 2020; Song et al., 2020; Vaishak et al., 2019).

Nuestro conocimiento de las proteínas BBX aún está limitado por la complejidad de las vías de señalización molecular en las que actúan y la escasa información funcional disponible (Gangappa y Botto, 2014; Vaishak et al., 2019). El factor de transcripción BBX21 pertenece al grupo estructural IV y contiene dos dominios B-Box. Las funciones biológicas de BBX21 no se habían explorado con profundidad antes de esta tesis, con la excepción de sus funciones en la germinación de semillas, la fotomorfogénesis de plántulas y la percepción de plantas vecinas en *Arabidopsis* (Xu et al., 2014, 2018; Zhao et al., 2020). En *A. thaliana*, BBX21 es un potente factor de transcripción que promueve la fotomorfogénesis (Datta et al., 2007; Job et al., 2018; Xu, 2020) e inhibe las respuestas de elongación para evitar el sombreado (Crocco et al., 2010). BBX21 es un componente fundamental en el centro regulador COP1-HY5 que regula el desarrollo de plántulas durante la transición entre la oscuridad y la luz (Holtan et al., 2011; Xu et al., 2018; Zhao et al., 2020). BBX21 es degradado mediante el proteasoma 26S en oscuridad, y se estabiliza cuando las plántulas crecen en luz, promoviendo la fotomorfogénesis a través de la actividad de HY5 (Xu et al., 2016). Además, se ha demostrado que BBX21 está involucrado en la promoción de la germinación de semillas de *A. thaliana*, interfiriendo con la unión de HY5 al promotor ABI5 (Xu et al., 2014).

En esta tesis se estudiaron los mecanismos asociados con BBX21 en las respuestas del tipo SAS, y en el comportamiento de plantas adultas sobreexpresantes de *BBX21* tanto de *A. thaliana* como en *S. tuberosum* creciendo en ambientes óptimos y bajo estrés hídrico. Los resultados más relevantes que van a ser discutidos a continuación son los siguientes:

- BBX21 inhibe el crecimiento del hipocótilo en plántulas de *A. thaliana* a través de la vía de señalización de BR. BBX21 inhibe la síntesis de BR activos e intermediarios y además regula negativamente la expresión de genes de biosíntesis de BR. En ambientes sombreados, la expresión de genes de la vía de los BR es inhibida por BBX21. En esta sección también se pudo observar que BBX21 y BZR1 actúan de manera interdependiente en el control del crecimiento del hipocótilo bajo sombra.
- La sobreexpresión de *BBX21* en plantas de *A. thaliana* produce plantas con una roseta más grande, con una inflorescencia más profusa, con mayores tasas de fotosíntesis y un aumento de los pigmentos y antocianinas. Además, la

sobreexpresión de *BBX21* produce plantas de papa más robustas, con un mayor contenido de antocianinas y fenoles en hoja. *BBX21* promueve la expresión de genes de la vía de los fenilpropanoides y confiere una mayor fotoprotección. También se observó que las plantas *BBX21-OE* tienen mayores tasas de fotosíntesis, en parte porque sus hojas tienen estomas más abiertos que las plantas control Spunta. Estos cambios se vieron reflejados en última instancia en un aumento del rendimiento en las plantas de papa.

- La sobreexpresión de *BBX21* produce plantas menos sensibles a la sequía. En condiciones de restricción hídrica moderada las plantas *BBX21-OE* tienen una menor inhibición del crecimiento del tallo, mayor tasa de fotosíntesis y mejor eficiencia del uso del agua. Además, estas plantas poseen una mayor difusión del CO<sub>2</sub> al cloroplasto y una mayor afinidad bioquímica por la fotosíntesis. Por otra parte, las plantas *BBX21-OE* son menos sensibles al ABA para la apertura de estomas. Por último, las plantas *BBX21-OE* tuvieron un mayor peso de tubérculos.

### **BBX21 inhibe el crecimiento en sombra en plántulas de *A. thaliana* a través de los brasinoesteroides.**

La información existente sobre la función de *BBX21* en la respuesta de escape al sombreado es incompleta. Durante la desetiología, las proteínas *BBX* tienen un rol clave en la regulación del crecimiento del hipocótilo (Song et al., 2020). Las proteínas *BBX* pueden actuar como reguladores positivos o negativos de la fotomorfogénesis. En el caso particular de *BBX21* se sabe que es un regulador positivo de la fotomorfogénesis por luz azul, roja y rojo lejano, ya que las plántulas mutantes de *bbx21* muestran hipocótilos alargados bajo estas condiciones lumínicas sugiriendo que esta proteína actúa aguas abajo de las vías de los fitocromos y criptocromos (Datta et al., 2007; Chang et al., 2008). Además, se sabe que *BBX21* promueve la fotomorfogénesis aumentando transcripcional y post-transcripcionalmente los niveles de *HY5* (Xu et al., 2016, 2018) y también puede unirse al promotor de *BBX11* regulando positivamente su expresión durante la desetiología (Zhao et al., 2020). Además de la participación de *BBX21* en los procesos de desetiología, se ha documentado que *BBX21* está involucrado en las respuestas de elongación del hipocótilo en sombra y que actúa en la vía de señalización de *COP1* junto con su homólogo *BBX22* (Crocco et al., 2010). El análisis del transcriptoma de *BBX21* en

sombra muestra un enriquecimiento en genes de señalización hormonal de auxinas, BR y etileno (Crocco et al., 2010). Los resultados de esta tesis demuestran que BBX21 es un factor de transcripción que actúa como integrador de las vías de biosíntesis de los BR y en la señalización por BR controlando la inhibición del crecimiento del hipocótilo en la SAS. El perfil de biosíntesis de BR es inhibido por BBX21 porque las plántulas *bbx21-1* muestran niveles significativamente mayores de varios intermediarios y de dos BR activos en comparación con las plántulas de Col-0 en condiciones de luz blanca y sombra (Fig. 3.5). BBX21 reprime la síntesis de intermediarios implicados en la ruta de biosíntesis de esteroides (CR y CN), la ruta de oxidación C6 (TE, TY, CS, 6-deoxoTY, 6-deoxo-3-DT) y la ruta C27- y C29- de las vías de BR (28-norCS y 28-homoCS, respectivamente) (Fig. 3.6 y 3.7). Sin embargo, existen algunas diferencias cualitativas y cuantitativas significativas en el perfil BR de las plántulas creciendo bajo luz blanca y sombra. Por ejemplo, 28-homoCS, CS y BL fueron inhibidos más fuertemente por BBX21 bajo luz blanca, mientras que la biosíntesis de 28-norCS y CN fue más intensamente reprimida bajo sombra (Fig. 3.5, 3.6 y 3.7). Estas diferencias en los perfiles de BR entre luz blanca y sombra podrían explicarse en parte por los efectos nulos o insignificantes de BBX21 en la regulación transcripcional de las enzimas de biosíntesis de BR en plántulas cultivadas bajo luz blanca suplementada con rojo lejano (Fig. 3.9). En *Arabidopsis* se han documentado dos vías activas de oxidación de C6. La vía de oxidación temprana de C6 predomina cuando la hidroxilación tiene lugar después de la oxidación de C6, mientras que la vía de oxidación tardía de C6 ocurre cuando los pasos metabólicos de hidroxilación se producen antes de la oxidación de C6 (Fujioka et al., 2002). Los niveles más altos de intermediarios TE y TY en plántulas mutantes *bbx21-1* cultivadas bajo sombra sugieren una actividad de inhibición más fuerte de BBX21 en la vía de oxidación temprana de C6 (Fig. 3.6 y 3.7). Curiosamente, el perfil de BR bajo sombra comparte algunas similitudes con los BR medidos en plántulas etioladas. Se ha sugerido que la vía de oxidación temprana de C6 es predominante durante la escotomorfogénesis, mientras que la vía de oxidación tardía de C6 es activa en la promoción de la fotomorfogénesis (Noguchi et al., 1999).

La homeostasis de BR se mantiene en parte mediante bucles de regulación de retroalimentación transcripcional que controlan la expresión de enzimas metabólicas claves de la síntesis de BR (Bajguz et al., 2020). En esta tesis se pudo demostrar que BBX21

suprime la transcripción de tres enzimas involucradas en la biosíntesis de BR, incluidas *DWF4*, *BR6OX1* y *BR6OX2* exclusivamente bajo luz blanca (Fig. 3.8 y 3.9). Estos datos concuerdan con trabajos previos que muestran el papel positivo de la luz en la expresión de los genes que codifican para enzimas de la biosíntesis de BR. Se ha documentado que la expresión de *BR6OX2* está controlada por la luz y el reloj circadiano (Nomoto et al., 2012). Además, la expresión de *BR6OX2* se ve afectada en los mutantes *hy5* y *phyAphyB*, lo que sugiere que su expresión es inducida por HY5 y los fitocromos durante la fotomorfogénesis de las plántulas (Hamasaki et al., 2020). El patrón de expresión de *DWF4*, *BR6OX1* y *BR6OX2* es específico de órgano, siendo particularmente mayor en los tejidos del gancho plumular con respecto a los cotiledones e hipocótilos de plántulas etioladas de *Arabidopsis* (Hamasaki et al., 2020). La inducción de la transcripción de enzimas de biosíntesis de BR por la luz también es común en otras especies. En plántulas de arroz, se ha documentado que la exposición a 6 horas de luz azul y luz blanca, pero no de luz rojo lejano, regula al alza la expresión de *CYP85A1/OSDWARF*, que codifica el homólogo de *BR6OX1* de *Arabidopsis*, y aumenta los niveles endógenos de BR, especialmente TY y CS (Asahina et al., 2014).

Por otra parte, la enzima *DWF4* es limitante en las reacciones metabólicas de los BR (Choe et al., 1998; Choe et al., 2001). Se sabe que los sustratos de *DWF4* siempre son abundantes en los tejidos vegetales, pero los productos de las reacciones catalizadas por *DWF4* son bajos o indetectables, lo que sugiere un papel fundamental de *DWF4* en la biosíntesis de BR (Fujita et al., 2006; Guo et al., 2010). También se documentaron niveles elevados de transcritos de *DWF4* en mutantes insensibles a BR, incluidos *bri1-5* o *cog1-3D* (un supresor dominante de *bri1-5*) y en mutantes de biosíntesis sensibles a BR, como *dwf1-1* (Choe et al., 1999; Noguchi et al., 1999; Wei et al., 2017). Estos resultados sugieren que la homeostasis de BR es un tema común que integra vías de biosíntesis y señalización. Los datos obtenidos en la sección I sugieren que mecanismos flexibles y diversos pueden estar involucrados en la regulación de la expresión de *DWF4* para ajustar finamente la homeostasis de BR al contexto ambiental de la planta. Hay otros factores de transcripción que pueden promover la expresión de *DWF4*. Por ejemplo, *COGWHEEL 1 (COG1)* un factor de transcripción de tipo DOF, regula la biosíntesis de BR indirectamente mediante la

regulación positiva de la transcripción de *PIF4* y *PIF5*, cuya expresión da como resultado niveles elevados de BR (Wei et al., 2017).

La mayor sensibilidad a los BR de las plántulas mutantes *bbx21-1* cultivadas en sombra sugiere que BBX21 puede modular negativamente la vía de señalización de BR (Fig. 3.4). Esto se ve apoyado por varias líneas de evidencia. En primer lugar, se encontró un enriquecimiento significativo de genes dependientes de BBX21 expresados diferencialmente bajo la sombra que están corregulados por BZR1 y PIF4 (Fig. 3.10 y cuadros suplementarios 3.1 a 3.5). En segundo lugar, se demostró que BBX21 regula a la baja la expresión de los genes de señalización BR y PIF4 en sombra a largo y corto plazo (Fig. 3.11 y 3.12). En tercer lugar, se observó que BBX21 y BZR1 pueden actuar de forma interdependiente en la respuesta de crecimiento del hipocótilo bajo sombra (Fig. 3.13). Se ha documentado que BZR1 puede interactuar con PIF4 formando heterodímeros que se unen a los promotores de sus objetivos comunes (Bai et al., 2012; Oh et al., 2012). BBX21 podría inhibir el módulo transcripcional BZR1-PIF4 reprimiendo la expresión génica de los genes de señalización BR. Sin embargo, algunos genes tempranos inducidos por la sombra pueden ser regulados independientemente por BBX21 y BZR1 dando plasticidad al sistema para una rápida respuesta de elongación por vías de señalización independientes. Esta idea no es descabellada porque se sabe que BBX32, un represor de la fotomorfogénesis de las plántulas, puede interactuar físicamente con BZR1 y PIF3 para mediar en el cierre de los cotiledones (Ravindran et al., 2021). Además, otros dos miembros del mismo grupo estructural V, BBX28 y BBX29, también suprimen la fotomorfogénesis de las plántulas mediante la interacción física con BEE1, BEE2 y BEE3 que aumentan los niveles de BZR1 para promover el alargamiento celular. Por otra parte, BBX20, un homólogo cercano de BBX21, suprime parcialmente el fenotipo del mutante *cop1* en la oscuridad y su expresión es inhibida por BZR1 (Fan et al., 2012).

Las respuestas de escape al sombreado suelen ser perjudiciales para los cultivos cultivados a alta densidad porque las plantas translocan recursos para el alargamiento del tallo y pecíolos a expensas de la producción de biomasa cosechable. En cereales, el SAS reduce las ramificaciones laterales y tiene un impacto negativo en la producción de biomasa y grano (Page et al., 2010; Warnasooriya y Brutnell, 2014). Los resultados de esta tesis ayudan a mejorar la comprensión que tenemos de la actividad de factores de transcripción

como *BBX21* en las redes de señalización hormonal de los BR que regulan las respuestas de crecimiento de las plantas. Nuevas hipótesis de trabajo pueden ser planteadas para controlar la arquitectura de los cultivos en condiciones de alta densidad de siembra (Casal, 2013; Carriedo et al., 2016; Sessa et al., 2018). Por ejemplo, la manipulación de la expresión de *BBX21* en tejidos y/o estadios de desarrollo de un cultivo podrían ayudar a suprimir o reducir el crecimiento de tallos con el objetivo de lograr mayores rendimientos.

### **Efecto de la sobreexpresión del gen *BBX21* en plantas de *A. thaliana* y papa**

En la sección II de esta tesis se caracterizó a las plantas adultas de *A. thaliana* y papa que sobreexpresan el gen *BBX21* en óptimas condiciones de riego. Los resultados obtenidos demuestran que la sobreexpresión de *BBX21* en plantas adultas de *A. thaliana* aumentó la tasa fotosintética y la conductancia estomática (Fig. 3.18). La falta de la proteína *BBX21* no parece afectar de manera significativa la morfología y la fisiología de las plantas adultas de *Arabidopsis* (Fig. 3.16), probablemente debido a la redundancia dentro de la familia *BBX*. Se ha documentado que *BBX20*, *BBX21* y *BBX22*, miembros del grupo IV de la familia *BBX*, poseen redundancia para la respuesta al crecimiento del hipocótilo cuando crecen en luz roja y en la acumulación de antocianinas (Bursch et al., 2020), y que *BBX21* y *BBX22* tienen efectos aditivos en el control de la elongación del hipocótilo bajo sombra provocada por una canopeo y sombra simulada (Crocco et al., 2010).

La tasa de fotosíntesis en función de PFD mostró que tanto la sobreexpresión de *BBX21* en plantas de *Arabidopsis* como la sobreexpresión heteróloga de *BBX21* en plantas de papa condujo al aumento en las tasas de fotosíntesis (hasta un 60% bajo irradiancias saturantes; Fig. 3.18 y 3.23) que se asoció con una mayor apertura estomática documentada en las plantas de papa *BBX21-OE* (Fig. 3.24). Además, los genes *RCA* y *FDI*, relacionados con la fotosíntesis, fueron regulados positivamente en las plantas de *A. thaliana* y papa *BBX21-OE*. Estas respuestas en la tasa de fotosíntesis estuvieron estrechamente relacionadas con la conductancia estomática y la mayor concentración interna de  $\text{CO}_2$  en plantas de papa y *A. thaliana* transgénicas, lo que sugiere que la apertura estomática es el principal efecto causal de la mayor tasa de fotosíntesis (Flexas et al., 2006a). Aunque la distribución de los estomas en las hojas de las plantas de papa difiere entre plantas transgénicas y las plantas no transformadas, no se observaron diferencias en el número de estomas. Por lo tanto, el

efecto de la abundancia de estomas no estaría asociado con la mayor tasa de fotosíntesis de plantas que sobreexpresan *BBX21* (Fig. 3.24). Estos resultados sugieren que la eficiencia del uso de la radiación puede ser mayor en un cultivo de papa sobreexpresante de *BBX21* dependiendo de la arquitectura de la planta y la extinción de la luz en el canopeo (Lambers et al., 1998). Para probar estas nuevas hipótesis de trabajo surgidas a partir de los resultados de esta tesis es necesario diseñar nuevos experimentos en ensayos a campo.

Aunque el contenido de antocianinas y fenoles fue mayor en las plantas transgénicas de *A. thaliana* y de papa, se observó un rendimiento cuántico potencial similar entre las plantas transgénicas y las plantas sin transformar de papa cuando crecieron a bajas irradiancias ( $F_v/F_m$  alrededor de 0,85; Fig. 3.26). Se observó un efecto protector de estos pigmentos en las plantas que sobreexpresan *BBX21* después de la exposición a PPF alto, ya que solo se fotoinhibieron las plantas de papa no transformadas ( $F_v/F_m$  cayó por debajo de 0,7; Fig. 3.26). Estos resultados sugieren que la reducción de la fotoinhibición del fotosistema II en las plantas de papa sobreexpresantes de *BBX21* puede estar asociada con la acumulación de metabolitos fotoprotectores, lo que lleva a una mayor tasa fotosintética. Además, se observó que las plantas sobreexpresantes de *BBX21* promueven significativamente la expresión de genes involucrados en la vía de los fenilpropanoides (*PAL1*, *CHS* y *F3H*) que conducen a un aumento en los niveles de antocianinas y compuestos fenólicos en plantas de papa y *A. thaliana* (Fig. 3.25 y 3.17). La inducción de un mecanismo de una aclimatación fotoprotectora para evitar el daño del fotosistema contra el exceso de radiación visible mediada por flavonoles que absorben la luz azul/UV se ha demostrado previamente utilizando mutantes de *A. thaliana* (Harvaux y Kloppstech, 2001). Por otra parte, la sobreexpresión de *PHYB* aumentó la resistencia del aparato fotosintético de plantas de papa a los rayos UV-B, lo que se asoció con una mayor acumulación de clorofilas, carotenoides y flavonoides en las hojas (Kreslavski et al., 2015). Las evidencias observadas en plantas de *A. thaliana* sobreexpresantes de *PHYB* son similares a los resultados obtenidos en esta tesis con plantas sobreexpresantes de *BBX21* y sugieren que las vías de señalización podrían estar parcialmente solapadas.

Aunque el mecanismo por el cual *BBX21* regula la expresión de genes de biosíntesis de fenilpropanoides no se exploró en esta tesis, trabajos previos sugieren que *BBX21* se une a la caja T/G del promotor de *HY5* controlando su expresión en plántulas de *A. thaliana* (Xu



et al., 2016, 2018). Además, HY5 se une directamente a las regiones promotoras de *CHS*, *CHI* y *F3H* para regular su expresión (Lee et al., 2007; Zhang et al., 2011). Ensayos funcionales en protoplastos de *A. thaliana* utilizando el promotor de *CHI* como gen reportero, mostraron que BBX21 puede activar la transcripción de *CHI* a través del promotor G-box (Datta et al., 2007). Estos resultados sugieren que BBX21 podría regular positivamente la expresión de genes de la vía de fenilpropanoide de manera dependiente de HY5.

Las plantas transgénicas de *BBX21* cultivadas en macetas bajo condiciones de invernáculo sin limitantes de recursos producen 15% más de rendimiento en tubérculos de tamaño menor en comparación con las plantas Spunta (Fig. 3.21 y 3.22). Sin embargo, la calidad de los tubérculos en términos de contenido de almidón fue similar entre los genotipos. Si bien esta tesis no exploró la conexión entre producción de tubérculos y las mayores tasas de fotosíntesis en las líneas *BBX21-OE*, algunos trabajos sugieren un rol funcional relevante de HY5 en la comunicación entre los recursos fotosintéticos producidos en la parte aérea de la planta y las raíces (Chen et al., 2016; van Gelderen et al., 2018). Como se ha discutido previamente BBX21 interacciona físicamente con HY5 y BBX21 junto con BBX20 y BBX22 son cofactores necesarios para la regulación transcripcional dependiente de HY5 (Bursch et al., 2020; Xu et al., 2016, 2018). Estos resultados sugieren que HY5 podría tener un papel importante en la formación de tubérculos siendo BBX21 un factor transcripcional relevante en este proceso.

Como estrategia biotecnológica para el aumento de la producción de alimentos, la sobreexpresión de *BBX21* puede tener ventajas en comparación con la sobreexpresión del gen *PHYB*, ya que evitaría los efectos pleiotrópicos no deseables que conlleva la sobreexpresión de un fotorreceptor que controla muchas más vías de señalización que un factor de transcripción. Las líneas sobreexpresantes de *PHYB* poseen características muy similares a las líneas *BBX21-OE*. Las plantas sobreexpresantes de *PHYB* en cultivos de papa tienen un fenotipo compacto, son más enanas, tienen respuesta del tipo SAS atenuada, mayores tasas de fotosíntesis y mayores rendimientos. Sin embargo, se ha demostrado que la sobreexpresión de *PHYB* se acompaña de una fuerte reducción en la eficiencia del uso del agua (Boccalandro et al., 2003, Boccalandro et al., 2009). Esta es una diferencia importante con las plantas *BBX21-OE*, ya que estas líneas no tienen efectos negativos en la

eficiencia del uso del agua (Fig. 3.18 y 3.23), una característica relevante para un cultivo sensible a la sequía como la papa. Es probable que la sobreexpresión de *PHYB* active toda la respuesta fotomorfogénica, mientras que la sobreexpresión de un regulador transcripcional como *BBX21* activa solo una parte de esta vía de desarrollo. Una aproximación aún más quirúrgica puede ser explorada sobreexpresando *BBX21* con promotores específicos para su expresión en tejidos celulares y estadios específicos durante el ciclo de vida de la planta. Los resultados obtenidos en esta tesis son de plantas individuales creciendo en macetas en condiciones controladas, por lo que sería interesante replicar estos experimentos con plantas creciendo a campo para indagar si el mayor rendimiento de las plantas transgénicas se mantiene en condiciones reales de cultivo de papa.

### **Efecto de la sobreexpresión de *BBX21* en plantas de papa creciendo bajo restricción hídrica**

Los resultados de la sección III de esta tesis demuestran que las plantas *BBX21-OE* son más tolerantes a la sequía que las plantas no transformadas de Spunta (Fig. 3.27 y 3.28). Bajo condiciones de restricción hídrica moderada, las tasas fotosintéticas de las plantas sobreexpresantes de *BBX21* fueron mayores durante las horas de la mañana y no se observaron diferencias significativas entre genotipos en la producción de antocianinas (Fig. 3.21, 3.22 y 3.23). Si bien las tasas fotosintéticas son mayores en las plantas sobreexpresantes de *BBX21* con respecto a las plantas no transformadas tanto en condiciones de capacidad de campo como bajo restricción hídrica moderada, los mecanismos dependientes de *BBX21* que controlan los procesos fotosintéticos parecen ser diferentes. En condiciones óptimas de riego, se demostró que las mayores tasas de fotosíntesis de las plantas de papa sobreexpresantes de *BBX21* se deben a una mayor conductancia estomática y mayores tasas de transpiración junto con el aumento de la síntesis de pigmentos fotoprotectores como las antocianinas que reducen la fotoinhibición (Fig. 3.23 y 3.26). En contraste, la ventaja de las plantas de papa sobreexpresantes de *BBX21* bajo condiciones de restricción hídrica se sustenta principalmente en mejoras no estomáticas por diferentes razones. Primero, la  $C_i$  fue menor en *BBX21-OE* que en las

plantas Spunta, a pesar de que tenían una conductancia estomática y una tasa de transpiración similares (Fig. 3.29). En segundo lugar, *BBX21-OE* mostró una mayor  $g_m$  que las plantas Spunta y, en consecuencia, una relación  $C_c/C_i$  más alta en el cloroplasto (Fig. 3.30 y 3.31). En tercer lugar, una mayor tasa de fotosíntesis en *BBX21-OE* a la misma concentración de  $CO_2$  en el cloroplasto ( $C_c$ ; Fig. 3.31) está determinado por un mayor valor de  $J_{max}$ , sin que haya diferencias en  $V_{cmax}$ , comparado con plantas WT (Fig. 3.32 y 3.33). Los valores más altos de  $J_{max}$  de las plantas *BBX21-OE* bajo sequía moderada pueden ser explicados por un mayor contenido de clorofila en comparación con las plantas WT, y la caída drástica de clorofilas a expensas de niveles más altos de antocianinas en WT (Fig. 3.21). La relevancia de  $J_{max}$ , junto con  $g_m$  en la mejora de la fotosíntesis en plantas *BBX21-OE* bajo estrés hídrico fue estimada en forma indirecta y en forma empírica de manera independiente. En cuarto lugar, la poca asociación entre  $C_i$  y la tasa de fotosíntesis (Fig. 3.34) sugiere que la  $g_s$  no parece ser la principal causa de mejora de la tasa de fotosíntesis de las plantas *BBX21-OE* bajo condiciones de restricción hídrica. Trabajos previos indican que la  $g_m$  está frecuentemente involucrada en la reducción de la tasa de fotosíntesis producida por baja disponibilidad de agua, y está bien correlacionada con la expresión de genes de anhidrasa carbónica y acuaporinas (Han et al., 2016; Perez Martin et al., 2014; Flexas et al., 2006b). El análisis transcriptómico obtenido en esta tesis sugiere fuertemente que las acuaporinas se pueden expresar de manera diferencial en respuesta a la disponibilidad de agua entre las plantas *BBX21-OE* y Spunta. De hecho, se encontró un gen (PGSC00003DMT4000042613) que tiene una similitud del 92% con la acuaporina *AQP1/TIP2.1* en *A. thaliana* (valor- $E < 1,1 \times 10^{-109}$ ). La expresión de este gen se redujo significativamente por la sequía en el genotipo sin transformar, pero no en las plantas *BBX21-OE* (Cuadro suplementario 3.8). En ensayos independientes, se confirmó que *TIP2-1/AQP1* se reduce significativamente por sequía en WT pero no en *BBX21-OE* (Fig. 3.32), lo que probablemente contribuya a una mayor tasa de fotosíntesis bajo limitaciones de agua. Flexas et al. (2006b) reportaron que plantas de tabaco transgénicas sobreexpresantes del gen *NtAQP1* mostraban una mayor  $g_m$  que las plantas sin transformar, al afectar la permeabilidad al  $CO_2$  de las membranas.

Si bien la  $g_m$  contribuye a mejorar la tasa de fotosíntesis en plantas *BBX21-OE* bajo una restricción hídrica moderada, la  $g_s$  también emerge como una clave crucial por su variación

a lo largo del fotoperíodo (Faralli et al., 2019; Buckley, 2017). De hecho, la *gs* fue significativamente mayor en las plantas *BBX21-OE* comparado a las plantas Spunta no transformadas a las 9 horas, pero no a partir de las 14 horas del día bajo restricción hídrica moderada (Fig. 3.30). Esto concuerda con la menor sensibilidad al ABA de las plantas *BBX21-OE* (Fig. 3.35 y 3.36). Los valores nulos de fotosíntesis para ambos genotipos después del mediodía son consecuencia de la *gs* extremadamente baja y el aumento del contenido de ABA en condiciones de restricción hídrica moderada (Fig. 3.30 y 3.35c). Por otra parte, los resultados de esta tesis demuestran que *BBX21* altera la sensibilidad al ABA en los tejidos vegetales, pero no modifica el contenido de ABA (Fig. 3.35). En plantas, la respuesta estomática de las células oclusivas está determinada por los efectos del ABA (Desikan et al., 2004). El bioensayo con hojas de papa aisladas de la planta demostró que la incubación con ABA 1  $\mu\text{M}$  redujo la apertura de los estomas en las plantas Spunta, pero mantuvo la apertura de los estomas en las hojas de las plantas *BBX21-OE*. Sin embargo, las diferencias entre genotipos en la respuesta estomática desaparecieron a una concentración más alta (10  $\mu\text{M}$ , Fig. 3.35). Estos resultados fueron confirmados en un ensayo independiente de plantas enteras rociadas con diferentes dosis de ABA para evaluar fotosíntesis y otros parámetros fotosintéticos. La sobreexpresión de *BBX21* mejora la tasa de fotosíntesis, *gs* y *Cc* con el agregado de ABA 2,5  $\mu\text{M}$ , pero no a concentraciones más altas de ABA (Fig. 3.36). Estos resultados confirman que las líneas *BBX21-OE* son más tolerantes al ABA. En *A. thaliana*, se ha demostrado que *BBX21* actúa río arriba de *ABI5* y *HY5* para el control de la germinación en condiciones de estrés mediadas por ABA (Xu et al., 2014). *BBX21* inhibe la expresión de *ABA INSENSITIVE 5 (ABI5)* porque interfiere con la interacción de *HY5* sobre el promotor de *ABI5* y, por otra parte, porque *BBX21* puede interactuar con la proteína *ABI5* que a su vez promueve su propia expresión (Xu et al., 2014). En otro estudio realizado con hojas aisladas de *A. thaliana* expuestas a la luz, se documentó que *BBX21* puede reclutar al factor de remodelación de cromatina *PICKLE (PKL)* para modular la estructura de la cromatina en el locus de *ABI5*. Este proceso epigenético mediado por *PKL* impide que el gen *ABI5* se transcriba y en consecuencia evita el cierre estomático por la actividad de la proteína *ABI5* (Kang et al., 2018). Como *BBX21* es un modulador de las respuestas a la luz en los procesos de des-etiolación y las respuestas de escape al sombreado en plántulas (Datta et al., 2007; Crocco et al.,

2010), no se puede descartar que BBX21 interactúe con la vía de señalización del fitocromo en condiciones de restricción hídrica. Durante la desecación del suelo, el fitocromo B (phyB) mejora la tolerancia a la sequía en las plantas de *Arabidopsis* (González et al., 2012). La menor capacidad de los mutantes nulos *phyB* para responder a la sequía se asoció con una menor sensibilidad al ABA, que reduce el cierre estomático mediado por genes asociados con el transporte y la percepción de ABA (González et al., 2012). Trabajos recientes demostraron que otras BBX también pueden estar involucradas en respuestas a sequía (Liu et al., 2019; Xu et al., 2020; Mbambalala et al., 2020). Mientras que la sobreexpresión de *AtBBX29* mejora la capacidad antioxidante y osmolítica en las plantas de caña de azúcar (Mbambalala et al., 2020), la sobreexpresión de *BBX19* en el crisantemo redujo la tolerancia a la sequía a través de interferencias de *CmBBX19* con la transactivación dependiente de *CmABF3* de genes de señalización ABA ubicados río abajo (Xu et al., 2020).

La comparación de los transcriptomas de plantas Spunta y *BBX21-OE* de 42 días de edad expuestas a condiciones de restricción hídrica permitió identificar genes regulados por BBX21. Entre los genes dianas de BBX21 en condiciones de estrés hídrico se encontraron varios genes relacionados con el control del crecimiento y la señalización hormonal (*MYB73*, *TCP14*, *SAUR76*, *ERF1*), respuesta al estrés (*HSP*, *DREB2A*, *SAP12*), respuesta a la fotosíntesis (*EGY1*, *TIP2.1*), entre otros (Fig. 3.32 y Cuadros suplementarios 3.8 y 3.10). Se ha propuesto que los genes *MYB* controlan el crecimiento de la raíz lateral en *A. thaliana* mediante la señalización ABA. La interacción del receptor ABA, PYR1-LIKE 8 (PYL8) y MYB77 mejora la señalización de auxinas formando heterodímeros con ARF7 y aumentando la unión de MYB77 a los promotores de múltiples genes que responden a auxinas, para promover el crecimiento de la raíz lateral (Zhao et al., 2014). En *A. thaliana*, EGY1 está involucrado en la renovación del centro de reacción del fotosistema II bajo alto estrés lumínico (Chen et al., 2005; Qi et al., 2020). También se ha documentado que EGY1 participa en la señalización entre el núcleo y el cloroplasto y puede actuar como una señal retrógrada que integra la señalización ABA para mantener la funcionalidad del cloroplasto bajo estrés de amonio en plantas de *A. thaliana* (Li et al., 2012). Las proteínas asociadas al estrés (SAP) como DREB2A y SAP12 protegen a las células de los efectos del estrés hídrico (Giri et al., 2013). En *A. thaliana* SAP12 actúa como un sensor de estrés temprano,

transmitiendo información redox a otros componentes de la célula a través de interacciones de proteínas (Ströher et al., 2009). DREB2A es un factor de transcripción clave activado por diferentes estreses como la sequía, el estrés salino y altas temperaturas que a su vez promueve muchos genes inducibles por sequía y estrés por calor que tengan en sus secuencias promotoras regiones específicas denominadas DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT (DRE) (Liu et al., 1998; Nakashima et al., 2000; Sakuma et al., 2006). Estos resultados sugieren que el factor de transcripción BBX21 es una pieza reguladora clave que controla la expresión génica en diferentes vías de señalización mediante la integración de respuestas de estrés y crecimiento (Gangappa y Botto, 2014; Song et al., 2020; Yadav et al., 2020).

Los descubrimientos de esta tesis cobran aún más relevancia en el contexto del cambio climático global en el cual es probable que las plantas estén expuestas con mayor frecuencia a las limitaciones de los recursos hídricos. Los modelos climáticos indican que el siglo XXI será cada vez más árido y las sequías más severas y prolongadas a escala mundial (MacDonald, 2010). La sequía que provoca un estrés hídrico en las plantas es un problema importante ya que conduce a la reducción de la productividad agrícola y plantea un gran desafío ante la necesidad de una creciente producción de alimentos para escenarios de aumento de la población mundial. La producción de variedades tolerantes al estrés es una necesidad que se hace cada vez más urgente. Al día de la fecha, hay muchos grupos de investigación que trabajan para lograr genotipos de más tolerantes a la sequía. Los enfoques de producción convencional, como las técnicas cruzamiento y selección, son lentas y costosas porque necesitan muchos años de selección fenotípica con resultados inciertos en muchos casos por interacciones génicas no favorables (Gaba et al., 2021). El conocimiento de las cascadas de señalización y de las vías moleculares a través de investigaciones en especies modelos junto con las herramientas actuales de mejoramiento genético como la introgresión de genes y factores de transcripción por transgénesis son alternativas más directas para la obtención de genotipos superiores. La manipulación a través de la ingeniería genética de este factor de transcripción es una herramienta biotecnológica prometedora para el desarrollo de nuevos cultivos y especies de interés agronómico creciendo en sistemas de secano.

## CAPITULO 5: CONCLUSIONES GENERALES

El conjunto de los datos de esta tesis permite extraer algunas conclusiones generales que permite ampliar el marco conceptual de cómo funcionan los factores de transcripción BBX en las plantas. En particular, esta tesis caracterizó en detalles algunos mecanismos en los cuales la proteína BBX21 está involucrada en la especie modelo *Arabidopsis thaliana* y también en una especie de importancia agronómica como *Solanum tuberosum* cv. Spunta con el objetivo de obtener plantas superiores que aumenten la producción de alimentos en condiciones subóptimas de cultivo.

De la familia de las BBX, solo BBX20 (una BBX del grupo IV, como BBX21) y BBX32 fueron identificados como factores de transcripción involucrados en la vía de los BR. En el trabajo de Sun et al. (2010) se demostró que BZR1 reprime la expresión de *BBX20* (Sun et al., 2010). Las plantas sobreexpresantes de *BBX20* tienen fenotipos fotomorfogénicos constitutivos en oscuridad y son hipersensibles a la luz. Además, los fenotipos de las cruza genéticas entre la línea sobreexpresantes de *BBX20* con mutantes de la vía de los BR son enanos, sugiriendo que BBX20 reprime las respuestas mediadas por BR (Fan et al., 2012). Por su parte, BBX32 regula negativamente la fotomorfogénesis y promueve la señalización de BR inhibiendo la apertura de los cotiledones en *A. thaliana*. Además, la expresión de *BBX32* es inducida por BR exógeno y aumenta en la línea *bzr1-1D* (BRASSINAZOLE RESISTANT1-1D) (Ravindran et al., 2021). La primera conclusión de esta tesis es que BBX21 también está involucrado en la vía de los BR, ya que modula la ruta de biosíntesis y de señalización de los mismos para integrar finamente las señales endógenas y ambientales, que conducen al control del crecimiento del hipocótilo de plántulas. Se demostró que dos líneas mutantes nulas de BBX21 (*bbx21-1* y *bbx21-2*) tienen respuestas constitutivas al BL, un BR sintético activo, y son hipersensibles al BRZ, un inhibidor sintético de BR, en la respuesta de crecimiento del hipocótilo en sombra. Este es el primer trabajo que vincula a los brasinosteroides con la actividad de BBX21 en las respuestas de escape al sombreado. En síntesis, BBX21 controla el perfil de BR inhibiendo la ruta de biosíntesis a través de la regulación transcripcional de las enzimas que participan en las vías BR y regula la señalización de BR al reprimir los genes diana de *BZR1* y *PIF4* aguas abajo en ambientes sombreados.

La segunda conclusión de esta tesis es que el factor de transcripción *BBX21* no solo controla el crecimiento de los hipocótilos de las plántulas a través de los BR sino que además puede regular otros procesos fisiológicos como la fotosíntesis de la planta adulta en parte a través de la señalización del ABA. En condiciones de riego a capacidad de campo, el factor de transcripción *BBX21* aumenta la eficiencia fotosintética y reduce la fotoinhibición en plantas de papa. Por otra parte, las líneas *BBX21-OE* también muestran mayores tasas de fotosíntesis durante la mañana cuando crecen en condiciones de restricción hídrica moderada. Además, la tesis demuestra que *BBX21* opera en la señalización del ABA en plantas adultas de papa mejorando el comportamiento fotosintético y aumentando el rendimiento de los tubérculos de papa en condiciones de estrés hídrico.

La tercera conclusión de esta tesis es que *BBX21* mejora la tasa de fotosíntesis por distintos mecanismos dependiendo del contexto hídrico. En óptimas condiciones y altas irradiancias, las vías de señales que promueven la síntesis de pigmentos pueden ser activadas por *BBX21* manteniendo mayores tasas de fotosíntesis neutralizando los procesos de fotoinhibición que protegen el aparato fotosintético (Harvaux y Kloppstech, 2001). Además, *BBX21* puede mejorar las tasas de fotosíntesis en contextos de limitaciones hídricas principalmente por la activación de mecanismos no estomáticos asociados a la difusión de  $\text{CO}_2$  en el mesófilo y tasa de transporte de electrones de la fotosíntesis y secundariamente por la disminución de la sensibilidad al ABA en la respuesta de la apertura estomática. Una mayor gm bajo condiciones de estrés hídrico contribuye a una mayor EUA y reduce el estrés oxidativo de la hoja, siendo un componente fotosintético relevante en los programas de mejoramiento de los cultivos (Cano et al., 2014).

La cuarta conclusión de esta tesis es que la mayor tolerancia a la sequía de plantas de papa sobrepresantes de *BBX21* puede ser una herramienta biotecnológica a tener en cuenta para los productores que trabajan en condiciones de secano, sin la posibilidad de contar con riego complementario siempre y cuando se destraben las limitaciones actuales para la comercialización de estos genotipos. Los experimentos de esta tesis fueron obtenidos de plantas cultivadas en macetas y bajo condiciones controladas de laboratorio y/o invernáculo. Por lo tanto, las conclusiones de este trabajo deben ser contextualizadas a las limitaciones del sistema experimental y los resultados deben ser validados en condiciones de campo.



Nuevos experimentos deben ser diseñados para la validación de los resultados en condiciones de campo, donde las variables climáticas son dinámicas. Los experimentos a campo además deben contemplar el uso de prácticas agronómicas usadas comúnmente en el cultivo de papa. El uso de herramientas biotecnológicas para modificar los niveles de expresión de factores de transcripción ha cobrado importancia en los últimos años. Por ejemplo, plantas sobreexpresantes del gen *HaHB4*, un gen propio del girasol confiere mayor tolerancia a la sequía en trigo y girasol (Ribichich et al., 2020; González et al., 2020). La sobreexpresión de *BBX21* puede ser una herramienta muy útil no sólo para aumentar los rendimientos de tubérculos de papa sino también para otros cultivos cuyos órganos de cosecha sean hojas, granos y frutos. Con respecto a los frutos, esta tesis demostró que la sobreexpresión de *BBX21* aumenta la producción de pigmentos y abre una ventana de oportunidades para explorar sus beneficios en cultivos cuyo valor productivo sean las flores y/o frutos como fuera demostrado en plantas de tomate sobreexpresantes de *SIBBX20* que producen mayores niveles de carotenoides en los frutos (Xiong et al., 2019; Lira et al., 2020). Por otra parte, se demostró que la expresión heteróloga del gen *AtBBX32* en plantas de soja (*Glycine max*) aumenta el rendimiento de grano porque extiende la ventana de tiempo entre el desarrollo de la vaina y la semilla (Preuss et al., 2012). Más recientemente, se ha demostrado que la sobreexpresión de *BBX24* en *Chrysanthemum morifolium* produce plantas con floración temprana y mayor tolerancia a la congelación y a la sequía (Yang et al., 2014). Integrando los resultados de esta tesis con los de bibliografía, se concluye que la sobreexpresión de algunos miembros de la familia de las BBXs puede contribuir a generar plantas superiores afectando no solo parámetros fisiológicos sino también parámetros fenológicos del cultivo en distintos contextos de estrés ambiental.

#### Cumplimiento de objetivos y verificación de hipótesis

Los tres objetivos particulares planteados en esta tesis se cumplieron y las hipótesis planteadas han sido validadas de la siguiente manera:

Objetivo I: Evaluar la respuesta de *BBX21* a los brasinoesteroides en la inhibición del crecimiento en ambientes sombreados en plántulas de *A. thaliana*.

*H<sub>1.1</sub>*) “La respuesta a ambientes sombreados en plántulas de *A. thaliana* mutantes de *bbx21* está mediado por hormonas, principalmente brasinoesteroides.” No rechazo *H<sub>1.1</sub>*

En la sección I de esta tesis se pudo demostrar que el factor de transcripción BBX21 inhibe el alargamiento del hipocótilo en sombra a través de los BR.

*H<sub>I.2</sub>) El factor de transcripción BBX21 media la respuesta a los brasinoesteroides en plántulas de Arabidopsis a través señalización de los BR. No rechazo H<sub>I.2</sub>*

BBX21 puede afectar la señalización de BR a través de la inhibición de un grupo común de genes que actúan aguas abajo de los factores de transcripción BZR y PIF4 bajo sombra de corto y largo plazo.

*H<sub>I.3</sub>) El factor de transcripción BBX21 regula la expresión de genes de la biosíntesis de los BR. No rechazo H<sub>I.3</sub>*

El perfil de biosíntesis de BR mostró que tanto los compuestos activos (brasinolide y 28-homobrasinolide), como los compuestos intermedios, son más altos en plántulas *bbx21-1* comparadas con Col-0, creciendo bajo luz blanca y/o sombra. La expresión de los genes *DWF4*, *BR6OX1* y *BR6OX2* implicados en la biosíntesis de BR es mayor en *bbx21-1* que en Col-0 bajo luz blanca.

Objetivo II: Caracterizar la morfología y fisiología de plantas de *A. thaliana* y de *S. tuberosum* sobreexpresantes de *BBX21* creciendo en condiciones óptimas.

El segundo objetivo se logró cumplir a través de una caracterización de plantas de *A. thaliana* y papa sobreexpresantes de *BBX21* a distintas escalas de análisis. A continuación, se fundamenta la validación de cada hipótesis de trabajo.

*H<sub>II.1</sub>) La sobreexpresión del gen BBX21 confiere a las plantas de A. thaliana cambios en su morfología, bioquímica y comportamiento fotosintético. No rechazo H<sub>II.1</sub>*

Mediante análisis morfológicos, anatómicos, fisiológicos, bioquímicos y de expresión génica, se demostró que las plantas que sobreexpresan *BBX21* son más robustas.

*H<sub>II.2</sub>) La sobreexpresión del gen BBX21 en plantas de papa aumenta el rendimiento de tubérculos. No rechazo H<sub>II.2</sub>*

Las plantas que sobreexpresan *BBX21* de papa producen un 15% más de tubérculos en peso y los tubérculos producidos son de menor tamaño que las plantas no transformadas en condiciones sin restricciones de riego. La calidad de los tubérculos en cuanto a la producción de almidón fue similar entre genotipos.

Objetivo III: Estudiar el comportamiento de las plantas de *S. tuberosum* sobreexpresantes de *BBX21* creciendo en ambientes con riegos restringidos.

Los resultados descritos en la sección III de esta tesis demuestran que la sobreexpresión de *BBX21* mejora el comportamiento fotosintético cuando las plantas de papas son cultivadas bajo restricciones hídricas moderadas. A continuación, se fundamenta la validación de las hipótesis planteadas.

*H<sub>III-1</sub>) Las plantas sobreexpresantes del gen BBX21 en papa son más tolerantes que las plantas sin transformar cuando son cultivadas bajo restricciones hídricas moderadas. No rechazo H<sub>III-1</sub>*

En esta tesis se descubrió que las plantas de *BBX21-OE* son más tolerantes a la restricción de agua producen más biomasa y tienen niveles más altos de clorofilas que las plantas Spunta sin transformar.

*H<sub>III-2</sub>) Las plantas sobreexpresantes del gen BBX21 en papa son más tolerantes al estrés hídrico que las plantas sin transformar porque disminuyen las limitaciones estomáticas mediadas por la vía del ABA. No rechazo H<sub>III-2</sub>*

Las líneas *BBX21-OE* tienen mayores tasas de fotosíntesis y EUA durante las primeras horas de la mañana bajo restricción hídrica. Las líneas *BBX21-OE* son más tolerantes a la sequía moderada en primer lugar porque mecanismos no estomáticos mejoran la conductancia del mesófilo ( $g_m$ ) y la tasa máxima de transporte de electrones ( $J_{max}$ ). En segundo lugar, las plantas sobreexpresantes de *BBX21* son menos sensibles al ABA y mantienen sus estomas más abiertos que las plantas sin transformar en condiciones de restricción hídrica moderada.

*H<sub>III-3</sub>) La sobreexpresión del gen BBX21 en plantas de papa induce cambios en la expresión génica para mejorar la tolerancia al estrés hídrico. No rechazo H<sub>III-3</sub>*

El análisis de RNA-seq reveló que 204 genes reducen su expresión por sequía en plantas Spunta sin transformar y se mantienen estables en las líneas *BBX21-OE* independientemente del tratamiento hídrico. Estos genes pueden contribuir a la tolerancia a la sequía mediada por *BBX21*.

*H<sub>III-4</sub>) Las plantas sobreexpresantes del gen BBX21 en papa poseen un mayor rendimiento que las plantas sin transformar, cuando son cultivadas bajo restricciones hídricas moderadas. No rechazo H<sub>III-4</sub>*

Las plantas *BBX21-OE* producen hasta 11% más de rendimiento de tubérculos que las plantas Spunta sin transformar bajo restricción hídrica moderada. En conjunto los resultados de esta tesis asociados a las H<sub>II-2</sub> y H<sub>III-4</sub> sugieren que la sobreexpresión de *BBX21* confiere aumento en el rendimiento de tubérculos en diferentes contextos hídricos.

#### Futuras líneas de investigación

A partir de los datos de esta tesis se desprender futuras líneas de investigación, algunas de las cuales son:

1.- Investigar mecanismos adicionales de *BBX21* y la señalización por BR en las respuestas de escape al sombreado: los resultados de esta tesis demuestran que *BBX21* inhibe la respuesta de crecimiento de los hipocótilos mediada por los BR particularmente en el tratamiento de sombra (Fig. 3.2 y 3.3). Si bien los resultados demuestran que *BBX21* es genéticamente interdependiente con *BZR1* e inhibe genes de la señalización de *PIF4* y *BZR1* en la sombra (Fig. 3.13 y 3.10), los perfiles de biosíntesis de BR son inhibidos por *BBX21* independientemente del tratamiento lumínico. Además, los genes que codifican para enzimas de la biosíntesis de BR tienen su expresión aumentada en plántulas mutantes de *BBX21* crecidas en luz blanca (Fig. 3.8). A partir de estos resultados surgen nuevas hipótesis de trabajo respecto al vínculo entre *BBX21*, brasinoesteroides y sombra.

Datos recientes obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que *BBX21* interacciona físicamente con *TCP1* (Gómez-Ocampo et al., enviado a revisión). El conjunto de los datos fisiológicos y las nuevas evidencias sugieren que la interacción proteica de *BBX21*-*TCP1* debería ser menos estable en ambientes sombreados aumentando la biosíntesis de BR activos y promoviendo el crecimiento de los hipocótilos en sombra. Esta hipótesis de trabajo puede ser evaluada con análisis de western blot para determinar los niveles de *BBX21* en plántulas expuestas a la luz blanca y sombra junto con análisis de niveles de proteína de *TCP1* taggeada en plántulas salvaje y mutante de *BBX21* expuestas a luz blanca y sombra.

2.- Validar a campo los resultados de la sobreexpresión de *BBX21* en papa y el aumento de los rendimientos de tubérculos: Los resultados de esta tesis demuestran que las papas sobreexpresantes de *BBX21* son más tolerantes a la sequía que las plantas sin transformar

Spunta en condiciones de cultivo en maceta. Estos resultados tienen que ser validados en condiciones de cultivo a campo. Esta hipótesis de trabajo puede ser evaluada realizando ensayos a campo en condiciones típicas de siembra a dos niveles de riego y dos niveles de densidad. Se podrán realizar mediciones para caracterizar la morfología midiendo, por ejemplo, la altura del tallo de las plantas desde el suelo al ápice y el diámetro del tallo de las plantas, la fecha de la antesis floral de las plantas, el número final de ramificaciones, y número y peso de tubérculos. También se podrán medir pigmentos como antocianinas y fenoles, intercambio de CO<sub>2</sub> y conductancia estomática y del mesófilo de las hojas. Una vez realizada una caracterización de las plantas *BBX21-OE* creciendo a distintas densidades de cultivo, se podrán realizar experimentos modificando otras variables del ambiente, como diferentes condiciones de fertilización.

3.- Evaluar el evento biotecnológico de la sobreexpresión de *BBX21* en otras especies cultivables: Los resultados mostrados en esta tesis permiten concluir que la sobreexpresión de *BBX21* provoca cambios en la morfología de las plantas. Plantas de *Arabidopsis* y papa tienen una mayor biomasa verde, con mayores niveles de clorofila. Además, las plantas de papa tienen mayor rendimiento de tubérculos en condiciones óptimas como subóptimas de riego; mientras que las plantas de *Arabidopsis* tienen inflorescencias más profusas, lo que debería conducir a un mayor número de semillas. Todos estos datos en su conjunto nos permiten asumir que la sobreexpresión de *BBX21* podría ser muy útil como una herramienta biotecnológica para el mejoramiento de diversas especies cultivables, ya que podría utilizarse en especies donde el órgano cosechable sean las hojas (pasturas como alfalfa y trébol, o plantas hortícolas de hoja como lechuga y acelga), granos (como los principales cultivos utilizados en el país: soja, maíz, trigo y girasol), y raíces y tubérculos (como la papa, zanahoria, batata).

## BIBLIOGRAFÍA

- **Ahmad M.** (1999) Seeing the world in red and blue: insight into plant vision and photoreceptors. *Curr Opin Plant Biol* 2: 230-235.
- **Ahmad M., Cashmore A.R.** (1996) Seeing blue: the discovery of cryptochrome. *Plant Mol Biol* 30: 851-861.
- **Ang L.-H., Deng, X.-W.** (1994) Regulatory hierarchy of photomorphogenic loci: Allele-specific and light-dependent interaction between the HY5 and COP1 loci. *Plant Cell* 6: 613–628
- **Anithakumari A.M., Nataraja K.N., Visser R.G., Linden V.C.G.** (2012) Genetic dissection of drought tolerance and recovery potential by quantitative trait locus mapping of a diploid potato population. - *Mol Breed* 30: 1413-1429.
- **Anjum S.A.; Ashraf U.; Tanveer M.; Khan I.; Hussain S.; Shahzad B.; Zohaib, A.; Abbas F.; Saleem M.F.; Ali I.; et al.** (2017) Drought Induced Changes in Growth, Osmolyte Accumulation and Antioxidant Metabolism of Three Maize Hybrids. *Front Plant Sci* 8: 69.
- **Asahina M., Tamaki Y., Sakamoto T., Shibata K., Nomura T., Yokota T.** (2014) Blue light-promoted rice leaf bending and unrolling are due to up-regulated brassinosteroid biosynthesis genes accompanied by accumulation of castasterone. *Phytochemistry* 104: 21-29.
- **Bai M.Y., Shang J.X., Oh E., Fan M., Bai Y., Zentella R., ... Wang Z. Y.** (2012) Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in Arabidopsis. *Nat Cell Biol*, 14(8): 810-817.
- **Bajguz A., Chmur M., Gruszka D.** (2020) Comprehensive Overview of the Brassinosteroid Biosynthesis Pathways: Substrates, Products, Inhibitors, and Connections. *Front Plant Sci* 11: 1034.
- **Ballaré, C.L., Scopel, A.L., Sánchez, R.A.** (1991) Photocontrol of stem elongation in plant neighbourhoods: effects of photon fluence rate under natural conditions of radiation. *Plant, Cell Environ* 14(1): 57-65.
- **Ballaré, C.L., Scopel, A.L., Sánchez, R.A.** (1995) Plant photomorphogenesis in canopies, crop growth, and yield. *HortScience* 30(6): 1172-1181.

- **Baudry A., Ito S., Song Y.H., Strait A.A., Kiba T., Lu S., Henriques R., Pruneda-Paz J.L., Chua N.H., Tobin E.M., Kay S.A., Imaizumi T.** (2010) F-box proteins FKF1 and LKP2 act in concert with ZEITLUPE to control Arabidopsis clock progression. *Plant Cell* 22: 606-22.
- **Bernacchi C.J., Portis A.R., Nakano H., Von Caemmerer S., Long S.P.** (2002) Temperature response of mesophyll conductance. Implications for the determination of Rubisco enzyme kinetics and for limitations to photosynthesis in vivo. *Plant Physiol* 130: 1–7.
- **Boccalandro H.E., Ploschuk E.L., Yanovsky M.J., Sánchez R.A., Gatz C., Casal J.J.** (2003) Increased phytochrome B alleviates density effects on tuber yield of field potato crops. *Plant Physiol* 133: 1539–1546.
- **Boccalandro H.E., Rugnone M.L., Moreno J.E., Ploschuk E.L., Serna L., Yanovsky M.J., Casal J.J.** (2009) Phytochrome B enhances photosynthesis at the expense of water-use efficiency in Arabidopsis. *Plant Physiol* 150: 1083–1092.
- **Bongi G., Loreto F.** (1989) Gas-exchange properties of salt-stressed olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant Physiol* 90: 1408-1416.
- **Boyer J. S.** (1982) Plant Productivity and Environment. *Science*, Vol. 218 (4571): 443-448.
- **Bray E.A.** (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2: 48-54.
- **Briefs I.S.A.A.A.** (2017) Global status of commercialized biotech/GM crops in 2017: Biotech crop adoption surges as economic benefits accumulate in 22 years. *ISAAA brief*, 53: 25-26.
- **Briggs W.R., Christie J.M., Salomon M.** (2001) Phototropins: a new family of flavin-binding blue light receptors in plants. *Antioxid Redox Signal* 3: 775-88.
- **Buckley T. N.** (2017) Modeling stomatal conductance. *Plant physiol* 174(2): 572-582.
- **Bursch K., Toledo-Ortiz G., Pireyre M., Lohr M., Braatz C., y Johansson H.** (2020) Identification of BBX proteins as rate-limiting cofactors of HY5. *Nat Plants*, 6(8): 921-928.
- **Burton, W.G.** (1989) *The potato* - 3rd ed. John Wiley & Sons Inc. New York. 742 pp.

- **Cano F.J., Lopez R., Warren C.R.** (2014) Implications of the mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> for photosynthesis and water-use efficiency during long-term water stress and recovery in two contrasting Eucalyptus species. *Plant, Cell Environ* 37(11), 2470-2490.
- **Cao J., Liang Y., Yan T., Wang X., Zhou H., Chen C., Zhang Y., Zhang B., Zhang S., Liao J., Cheng S., Chu J., Huang X., Xu D., Li J., Deng X.W., Lin F.** (2022) The photomorphogenic repressors BBX28 and BBX29 integrate light and brassinosteroid signaling to inhibit seedling development in Arabidopsis. *Plant Cell* 34(6): 2266-2285.
- **Carabelli M, Morelli G, Whitelam G, Ruberti I.** (1996) Twilight-zone and canopy shade induction of the Athb-2 homeobox gene in green plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 3530-5.
- **Carriedo L.G., Maloof J.N., Brady S.M.** (2016). Molecular control of crop shade avoidance. *Curr Opin Plant Biol* 30: 151–158.
- **Casal J.J.** (2012). Shade Avoidance. *The Arabidopsis Book* 10: e0157.
- **Casal J.J.** (2013) Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade. *Annu Rev Plant Biol* 64: 403–427.
- **Cashmore A.R., Jarillo J.A., Wu Y.J., Liu D.** (1999) Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. *Science* 284: 760–765.
- **Chakir S., Jensen M.** (1999). How does *Lobaria pulmonaria* regulate photosystem II during progressive desiccation and osmotic water stress? A chlorophyll fluorescence study at room temperature and at 77 K. *Physiol plant* 105(2): 256-264.
- **Chang C.S., Li Y.H., Chen L.T., Chen W.C., Hsieh W.P., Shin J., Jane W.N., Chou S.J., Choi G., Hu J.M., Somerville S., Wu S.H.** (2008) LZFI, a HY5-regulated transcriptional factor, functions in Arabidopsis de-etiolation. *Plant J* 54: 205–219.
- **Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J., Rodriguez, M.L., Ricardo, C.P.P., Osorio M.L., Carvalho I., Faria T., Piñeiro C.** (2002) How Plants Cope with Water Stress in the Field. *Photosynthesis and Growth. Ann Bot* 89: 907-916.
- **Chaves M.M., Maroco J.P., Pereira J.S.** (2003) Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Funct plant biol*, 30(3): 239-264.



- **Chen Y.H., Hsu B.D.** (1995) Effects of dehydration on the electron transport of *Chlorella*. An in vivo fluorescence study. *Photosyn res* 46(1): 295-299.
- **Chen G., Bi Y.R. and Li, N.** (2005) EGY1 encodes a membrane-associated and ATP-independent metalloprotease that is required for chloroplast development. *Plant J* 41: 364–375.
- **Chen X., Yao Q., Gao X., Jiang C., Harberd N. P., Fu X.** (2016) Shoot-to-root mobile transcription factor HY5 coordinates plant carbon and nitrogen acquisition. *Curr Biol*, 26(5): 640-646.
- **Choe S., Dilkes B.P., Fujioka S., Takatsuto S., Sakurai A., Feldmann K.A.** (1998) The DWF4 Gene of *Arabidopsis* Encodes a Cytochrome P450 That Mediates Multiple 22 $\alpha$ -Hydroxylation Steps in Brassinosteroid Biosynthesis. *Plant Cell* 10: 231-243.
- **Choe S., Dilkes B.P., Gregory B.D., Ross A.S., Yuan H., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Tanaka A., Yoshida S., Tax F.E., Feldmann K.A.** (1999) The *Arabidopsis* dwarf1 mutant is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol* 119: 897-907.
- **Choe S., Fujioka S., Noguchi T., Takatsuto S., Yoshida S., Feldmann K.A.** (2001). Overexpression of DWARF4 in the brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growth and seed yield in *Arabidopsis*. *Plant J* 26(6): 573-582.
- **Ciolfi A., Sessa G., Sassi M., Possenti M., Salvucci S., Carabelli M., ..., Ruberti I.** (2013) Dynamics of the shade-avoidance response in *Arabidopsis*. *Plant phys* 163(1): 331-353.
- **Clack T., Mathews S., Sharrock RA.** (1994) The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol Biol* 25: 413–427.
- **Clough R.C., Vierstra R.D.** (1997) Phytochrome degradation *Plant Cell Environ* 20: 713–721.
- **Coleman W.K.** (2008) Evaluation of wild *Solanum* species for drought resistance. *Solanum gandarillasii* Cardenas. *Env and Exp Bot*, 62: 221-230.

- **Cornic G., Massacci A.** (1996) Leaf photosynthesis under drought stress. In *Photosynthesis and the Environment* (pp. 347-366). Springer, Dordrecht.
- **Crocco C.D., Holm M., Yanovsky M.J., Botto J.F.** (2010) AtBBX21 and COP1 genetically interact in the regulation of shade avoidance. *Plant J* 64: 551– 562.
- **Crocco C.D., Botto J.F.** (2013) BBX proteins in green plants: insights into their evolution, structure, feature and functional diversification. *Gene* 531: 44–52.
- **Crocco C.D., Locascio A., Escudero C.M., Alabadí D., Blázquez M.A., Botto J.F.** (2015) The transcriptional regulator BBX24 impairs DELLA activity to promote shade avoidance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun* 6: 6202.
- **Corvo Dolcet, S.** (2005) “Cultivo de la papa en la Argentina”. Secretaría de agricultura, ganadería, pesca y alimentos. Subsecretaría de agricultura, ganadería y alimentación. Dirección de agricultura.
- **Dao T.T.H., Linthorst H.J.M., Verpoorte, R.** (2011) Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochem Rev* 10(3): 397-412.
- **Datta S., Hettiarachchi C., Johansson H., Holm M.** (2007) SALT TOLERANCE HOMOLOG2, a B-box protein in *Arabidopsis* that activates transcription and positively regulates light-mediated development. *Plant Cell* 19: 3242–3255.
- **Deblonde P. M. K., Ledent J. F.** (2001). Effects of moderate drought conditions on green leaf number, stem height, leaf length and tuber yield of potato cultivars. *Eur. J. Agron.* 14: 31–41.
- **Deikman J., Hammer P.E.** (1995) Induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 108: 47–57.
- **Demarsy E., Fankhauser C.** (2009) Higher plants use LOV to perceive blue light. *Curr Opin Plant Biol* 12: 69-74.
- **Demkura P.V., Abdala G., Baldwin I.T., Ballaré C.L.** (2010) Jasmonate dependent and -independent pathways mediate specific effects of solar ultraviolet B radiation on leaf phenolics and antiherbivore defense. *Plant Physiol* 152: 1084–1095.
- **Desikan R., Cheung M. K., Bright J., Henson D., Hancock J. T., Neill S. J.** (2004). ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J exp bot* 55(395), 205-212.

- **Devlin P.F., Yanovsky M.J. and Kay S.A.** (2003) A genomic analysis of the shade avoidance response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 133: 1617-1629.
- Drake J. E., Power S. A., Duursma R. A., Medlyn B. E., Aspinwall M. J., Choat B., ... Tissue D. T. (2017). Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis for four tree species under drought: a comparison of model formulations. *Agricultural and Forest Meteorology*, 247, 454-466.
- **Dwelle R. B.** (1985). Photosynthesis and photoassimilate partitioning. *Potato physiology*, 35-58.
- **Dizeo de Strittmatter C.G.** (1973) Nueva técnica de diafanización. *Bol Soc Argent Bot* 15: 126–129.
- **Edge R., McGarvey D. J., Truscott T. G.** (1997) The carotenoids as antioxidants—a review. *J of Photochem and Photobiol B: Biology*, 41(3): 189-200.
- **Evers D., Lefevre I., Legay S., Lamoureux D., Hausman J.-F., Rosales R.O.G., et al.** (2010) Identification of drought-responsive compounds in potato through a combined transcriptomic and targeted metabolite approach. *J. Exp. Bot.* 61: 2327–2343.
- **F.A.O.** Food and Agriculture Organization of The United Nations: [www.fao.org](http://www.fao.org)
- **Fan, X.-Y., Y. Sun, D.-M. Cao, M.-Y. Bai, X.-M. Luo, H.-J. Yang, C.-Q. Wei, S.-W. Zhu, Y. Sun, K. Chong, and Wang Z.-Y.** (2012) BZS1, a B-box Protein, Promotes Photomorphogenesis Downstream of Both Brassinosteroid and Light Signaling Pathways. *Mol Plant* 5: 591-600.
- **Fankhauser C., Chory J.** (1997) Light control of plant development *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 203B229.
- **Faralli, M., Matthews, J., Lawson, T.** (2019) Exploiting natural variation and genetic manipulation of stomatal conductance for crop improvement. *Curr Opin Plant Biol* 49: 1-7.
- **Farquhar G.D., von Caemmerer S. V., Berry J.A.** (1980) A biochemical model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C<sub>3</sub> species. *Planta* 149(1): 78-90.
- **Fasan T., Haverkort, A.J.** (1991) The influence of cyst nematodes and drought on potato growth.1. Effects on plant-growth under semi-controlled conditions. *Neth. J. Plant Pathol.* 97: 151–161.

- **Farooq M., Wahid A., Kobayashi N. S. M. A., Fujita D. B. S. M. A., Basra S. M. A.** (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. In Sustainable agriculture: 153-188.
- **Fernández-Milmanda G. L., C. D. Crocco, M. Reichelt, C. A. Mazza, T. G. Köllner, T. Zhang, M. D., Cargnel, M. Z. Lichy, A. S. Fiorucci, C. Fankhauser, A. J. Koo, A. T. Austin, J. Gershenzon, and Ballaré C. L.** (2020) A light-dependent molecular link between competition cues and defence responses in plants. *Nat Plants* 6: 223-230.
- **Fernández-Milmanda G.L., Ballaré, C.L.** (2021) Shade avoidance: expanding the color and hormone palette. *Trends plant sci* 26(5): 509-523.
- **Flexas J., Medrano H.** (2002) Drought- inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non- stomatal limitations revisited. *Ann bot* 89(2): 183-189.
- **Flexas J., Ribas- Carbó M., Bota J., Galmés J., Henkle M., Martínez- Cañellas S., Medrano H.** (2006) Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO<sub>2</sub> concentration. *New Phytol* 172(1): 73-82.
- **Flexas J., Ribas-Carbó M., Hanson D.T., Bota J., Otto B., Cifre J., McDowell N., Medrano H., and Kaldenhoff R.** (2006b) Tobacco Aquaporin NtAQP1 Is Involved in Mesophyll Conductance to CO<sub>2</sub> in Vivo. *Plant J* 48 (3): 427–39.
- **Flexas J., Ribas- Carbo M., DIAZ- ESPEJO A., Galmes, J., Medrano, H.** (2008) Mesophyll conductance to CO<sub>2</sub>: current knowledge and future prospects. *Plant cell environ* 31(5): 602-621.
- **Foyer C. H., Harbinson J.** (2012) Photosynthetic regulation. In *Terrestrial Photosynthesis in a Changing Environment: A Molecular, Physiological and Ecological Approach* (pp. 20-40). Cambridge University Press.
- **Fujioka S., Takatsuto S., Yoshida S.** (2002) An Early C-22 Oxidation Branch in the Brassinosteroid Biosynthetic Pathway. *Plant Physiol* 130: 930-939.
- **Fujita S., Ohnishi T., Watanabe B., Yokota T., Takatsuto S., Fujioka S., Yoshida S., Sakata K., Mizutani M.** (2006) Arabidopsis CYP90B1 catalyses the early C-22 hydroxylation of C27, C28 and C29 sterols. *Plant J* 45:765-774.

- **Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., Yamaguchi-Shinozaki K., & Shinozaki K.** (2006b). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current opinion in plant biology*, 9(4), 436-442.
- **Gaba Y., Pareek A., Singla-Pareek S. L.** (2021) Raising climate-resilient crops: journey from the conventional breeding to new breeding approaches. *Current Genomics*, 22(6): 450.
- **Galmés J., Molins A., Flexas J., Conesa M.A.** (2017) Coordination between Leaf CO<sub>2</sub> Diffusion and Rubisco Properties Allows Maximizing Photosynthetic Efficiency in Limonium Species. *Plant Cell Environ* 40 (10): 2081-2094.
- **Gangappa S.N., Crocco C.D., Johansson H., Datta S., Hettiarachchi C., Holm M., Botto J.F.** (2013) The Arabidopsis B-BOX protein BBX25 interacts with HY5, negatively regulating BBX22 expression to suppress seedling photomorphogenesis. *Plant Cell* 25: 1243–1257.
- **Gangappa S.N., Botto J.F.** (2014) The BBX family of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* 19: 460–470.
- **Gangappa S.N., Botto J.F.** (2016) The multifaceted roles of HY5 in plant growth and development. *Mol Plant* 9: 1353–1365.
- **Gawronska H., Dwelle R.B.** (1989) Partitioning of photoassimilates by potato plants (*Solanum tuberosum* L.) as influenced by irradiance I. Partitioning patterns in cultivar Russet Burbank grown under high and low irradiance. *American Potato Journal*, 66(4): 201-213.
- **van Gelderen K., Kang C., Paalman R., Keuskamp D., Hayes S., Pierik R.** (2018) Far-red light detection in the shoot regulates lateral root development through the HY5 transcription factor. *Plant Cell*, 30(1): 101-116.
- **Giri J., Dansana P.K., Kothari K.S., Sharma G., Vij S., Tyagi A.K.** (2013) SAPs as novel regulators of abiotic stress response in plants. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 35: 639–648.
- **Givnish T.J.** (1988) Adaptation to sun and shade: a whole-plant perspective. *Funct Plant Biol* 15(2): 63-92.

- **Gómez-Ocampo JG** (2015) Caracterización morfológica y fisiológica de plantas *Solanum tuberosum* sobre - expresantes del gen BBX21. <http://ri.agro.uba.ar/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=ti&d=2015gomezocampo>
- **González C.V., Ibarra S.E., Piccoli P.N., Botto J.F., Boccalandro H.E.** (2012) Phytochrome B increases drought tolerance by enhancing ABA sensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell Environ* 35: 1958–1968.
- **González F. G., Rigalli N., Miranda P. V., Romagnoli M., Ribichich K. F., Trucco F., ... Chan R. L.** (2020) An interdisciplinary approach to study the performance of second-generation genetically modified crops in field trials: a case study with soybean and wheat carrying the sunflower HaHB4 transcription factor. *Fronti plant sci*, 178.
- **Gould K.S., Kuhn D.N., Lee D.W., Oberbauer S.F.** (1995) Why leaves are sometimes red. *Nature* 378: 241–242.
- **Goosey L., Palecanda L., Sharrock R.A.** (1997) Differential patterns of expression of the *Arabidopsis* PHYB, PHYD, and PHYE phytochrome genes. *Plant Physiol* 115: 959–969.
- **Guo A., H, K., Liu D., Bai S., Gu X., Wei L., Luo J.** (2005) DATF: a database of *Arabidopsis* transcription factors. *Bioinformatics* 21(10): 2568-2569.
- **Guo Z., Fujioka S., Blancaflor E.B., Miao S., Gou X., Li J.** (2010) TCP1 Modulates Brassinosteroid Biosynthesis by Regulating the Expression of the Key Biosynthetic Gene DWARF4 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22: 1161-1173.
- **Guo H., Li L., Aluru M., Aluru S., Yin Y.** (2013) Mechanisms and networks for brassinosteroid regulated gene expression. *Curr Opin Plant Biol* 16: 545–553.
- **Han J.M., Meng H.F., Wang S.Y., Jiang C.D., Liu F., Zhang W.F., Zhang Y.L.** (2016) Variability of Mesophyll Conductance and its relationship with water use efficiency in cotton leaves under drought pretreatment. *Journal of Plant Physiol* 194: 61-71.
- **Hamasaki H., Ayano M., Nakamura A., Fujioka S., Asami T., Takatsuto S., Yoshida S., Oka Y., Matsui M., Shimada Y.** (2020) Light Activates Brassinosteroid Biosynthesis to Promote Hook Opening and Petiole Development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 61: 1239-1251.

- **Harley P.C., Loreto F., Marco G.D., Sharkey T.D.** (1992) Theoretical considerations when estimating the mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> flux by analysis of the response of photosynthesis to CO<sub>2</sub>. *Plant Physiol* 98: 1429–1436.
- **Harvaux M., Kloppstech K.** (2001) The protective functions of carotenoid and flavonoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis npq* and *tt* mutants. *Planta* 213: 953–966.
- **Haupt-Herting S., Fock H. P.** (2000) Exchange of oxygen and its role in energy dissipation during drought stress in tomato plants. *Physiol Plant*, 110(4): 489-495.
- **He J.X., Gendron J.M., Yang Y., Li J., Wang Z. Y.** (2002) The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* 99(15): 10185-10190.
- **He J.X., Gendron M.J., Sun Y., Gampala S.S., Gendron N., Sun C.Q., Wang Z.Y.** (2005) BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science*, 307: 1634-1638.
- **Hennig L., Büche C., Eichenberg K., Schäfer E.** (1999). Dynamic properties of endogenous phytochrome A in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol* 121: 571-7.
- **Hill D., Nelson D., Hammond J., y Bell L.** (2021) Morphophysiology of potato (*Solanum tuberosum*) in response to drought stress: paving the way forward. *Front Plant Sci* 11: 597554.
- **Hoecker U.** (2017) The activities of the E3 ubiquitin ligase COP1/SPA, a key repressor in light signaling. *Curr Opin Plant Biol* 37: 63–69.
- **Holtan H.E., Bandong S., Marion C.M., Adam L., Tiwari S., Shen Y., Maloof J.N., Maszle D.R., Ohto M.A., Preuss S., et al** (2011) BBX32, an *Arabidopsis* B-Box protein, functions in light signaling by suppressing HY5- regulated gene expression and interacting with STH2/BBX21. *Plant Physiol* 156: 2109–2123.
- **Huang J., Zhao X., Weng X., Wang L., Xie W.** (2012) The rice B-box zinc finger gene family: Genomic identification, characterization, expression profiling and diurnal analysis. *PLoS ONE* 7: e48242.
- **Huarte M.A., Capezio S.B.** (2013) Cultivo de papa. Asignatura cultivo de papa. Unidad Integrada Balcarce Inta FCA UNMdP.

- **Huber M., Nieuwendijk N. M., Pantazopoulou C. K., Pierik, R.** (2021). Light signalling shapes plant–plant interactions in dense canopies. *Plant, Cell & Environ* 44(4), 1014-1029.
- **Jaleel C. A., Manivannan P. A. R. A. M. A. S. I. V. A. M., Wahid A., Farooq M., Al-Juburi H. J., Somasundaram R. A. M. A. M. U. R. T. H. Y., Panneerselvam R.** (2009) Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int J Agric Biol* 11(1): 100-105.
- **Jefferies R.A.** (1992). Effects of drought on chlorophyll fluorescence in potato (*Solanum tuberosum* L.). Relations between plant-growth and measurements of fluorescence. *Potato Res* 35: 35–40
- **Jefferies R.A.** (1993). Cultivar responses to water-stress in potato: effects of shoot and roots. *New Phytol* 123: 491–498.
- **Job N., Yadukrishnan P., Bursch K., Datta S., y Johansson H.** (2018) Two B-box proteins regulate photomorphogenesis by oppositely modulating HY5 through their diverse C-terminal domains. *Plant Physiol* 176(4): 2963-2976.
- **Job N., Datta S.** (2021) PIF3/HY5 module regulates BBX11 to suppress protochlorophyllide levels in dark and promote photomorphogenesis in light. *New Phytol* 230(1): 190-204.
- **Johansen D.A.** (1940) *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill, New York.
- **Kang X., Xu G., Lee B., Chen C., Zhang H., Kuang R., et al.** (2018) HRB2 and BBX21 interaction modulates Arabidopsis ABI5 locus and stomatal aperture. *Plant Cell Environ* 41: 1912–1925.
- **Kar R.K.** (2011) Plant responses to water stress: role of reactive oxygen species. - *Plant Signal Behav* 6: 1741-1745.
- **Katsumata, T., Hasegawa, A., Fujiwara, T., Komatsu, T., Notomi, M., Abe, H., ... & Kawaide, H.** (2008). Arabidopsis CYP85A2 catalyzes lactonization reactions in the biosynthesis of 2-deoxy-7-oxalactone brassinosteroids. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 72(8), 2110-2117.
- **Keinänen M., Oldham N.J., Baldwin I.T.** (2001) Rapid HPLC screening of jasmonate-induced increases in tobacco alkaloids, phenolics, and diterpene glycosides in *Nicotiana attenuata*. *J Agric Food Chem* 49: 3553–3558.



- **Kendrick R.E., Hillman W.S.** (1971). Aspects of phytochrome decay in etiolated seedlings under continuous illumination. *Am J Bot* 58: 424–428.
- **Khanna R., Kronmiller B., Maszle D.R., Coupland G., Holm M., Mizuno T., Wu S.H.** (2009) The Arabidopsis B-box zinc finger family. *Plant Cell* 21: 3416–3420.
- **Kielbowicz-Matuk A., Rey P., Rorat T.** (2014) Interplay between circadian rhythm, time of the day and osmotic stress constraints in the regulation of the expression of a Solanum double B-box gene. *Ann Bot* 113: 831–842.
- **Kliebenstein D.J., Lim J.E., Landry L.G., Last R.L.** (2002) Arabidopsis UVR8 regulates ultraviolet-B signal transduction and tolerance and contains sequence similarity to human regulator of chromatin condensation 1. *Plant Physiol.* 130: 234–43.
- **Koornneef M., Rolff E., Spruit C.J.P.** (1980) Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in Arabidopsis thaliana. *Z Pflanzenphysiol* 100: 147–160.
- **Kreslavski V.D., Kosobryukhov A.A., Shmarev A.N., Aksenova N.P., Konstantinova T.N., Golyanovskaya S.A., Romanov G.A.** (2015) Introduction of the Arabidopsis PHYB gene increases resistance of photosynthetic apparatus in transgenic Solanum tuberosum plants to UV-B radiation. *Russ J Plant Physiol* 62: 204–209.
- **Kuromori T., Seo M., Shinozaki K.** (2018) ABA transport and plant water stress responses. *Trends plant sci*, 23(6): 513–522.
- **Lahlou O., Ouattar S., Ledent J. F.** (2003) The effect of drought and cultivar on growth parameters, yield and yield components of potato. *Agronomie* 23: 257–268.
- **Lambers H., Chapin F.S. and Pons T.L.** (2008) *Plant Physiological Ecology*, New York, NY: Springer New York.
- **Lau O.S., Deng X.W.** (2012) The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends Plant Sci* 17: 584–593.
- **Lawlor D. W. Cornic, G.** (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, cell environ*, 25(2): 275–294.

- **Lee J., He K., Stolc V., Lee H., Figueroa P., Gao Y., Tongprasit W., Zhao H., Lee I., Deng X.W.** (2007) Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. *Plant Cell* 19: 731–749.
- **Lee S. C., Luan S.** (2012) ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant, cell environ* 35(1), 53-60.
- **Legris M., Klose C., Burgie E., Costigliolo R.C., Neme M., Hiltbrunner A., ... Casal J.J.** (2016) Phytochrome B integrates light and temperature signals in *Arabidopsis*. *Science* 354: 897–900.
- **Li J., Chory J.** (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90: 929–938.
- **Li J., Wen J., Lease K.A., Doke J.T., Tax F.E., Walker J.C.** (2002) BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* 110: 213–222.
- **Li J., Li G., Wang H., Wang Deng X.** (2011) Phytochrome signaling mechanisms. *Arabidopsis Book* 2011.
- **Li B., Li Q., Xiong L., Kronzucker H.J., Krämer U., Shi W.** (2012) *Arabidopsis* plastid AMOS1/EGY1 integrates abscisic acid signaling to regulate global gene expression response to ammonium stress. *Plant Physiol* 160: 2040–2051.
- **Lin C., Yang H., Guo H., Mocker T., Chen J., and Cashmore A.R.** (1998) Enhancement of blue light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7686–7699.
- **Lin C.** (2002) Blue light receptors and signal transduction *Plant Cell* 14: S207BS225.
- **Lira B.S., Oliveira M. J., Shiose L., Wu R.T.A., Rosado D., Lupi A.C.D., ... Rossi M.** (2020) Light and ripening-regulated BBX protein-encoding genes in *Solanum lycopersicum*. *Scientific reports*, 10(1): 1-14.
- **Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain, separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1391–1406.

- **Liu X., Li R., Dai Y., Chen X., Wang X.** (2018) Genome-wide identification and expression analysis of the B-box gene family in the Apple (*Malus domestica* Borkh.) genome. *Mol Genet Genomics*: **293**(2): 303–315.
- **Liu X., Li R., Dai Y., Yuan L., Sun Q., Zhang S., Wang X.** (2019) A B-box zinc finger protein, MdBBX10, enhanced salt and drought stresses tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 99: 437–447.
- **Liu Y., Jafari F., Wang H.** (2021) Integration of light and hormone signaling pathways in the regulation of plant shade avoidance syndrome. *aBIOTECH*, 2(2): 131-145.
- **Mbambalala N., Panda S.K., van der Vyver C.** (2020) Overexpression of AtBBX29 Improves Drought Tolerance by Maintaining Photosynthesis and Enhancing the Antioxidant and Osmolyte Capacity of Sugarcane Plants. *Plant Mol Biol Report* doi.org/10.1007/s11105-020-01261-8.
- **MacDonald G. M.** (2010) Water, climate change, and sustainability in the southwest. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107: 21256–21262.
- **Mancinelli A.L.** (1994) The physiology of phytochrome action. In: Kendrick RE, Kronenberg GHM., editors. *Photomorphogenesis in Plants*, Ed 2. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 211–269.
- **Manetas Y., Drinia A., Petropoulou Y.** (2002) High contents of anthocyanins in young leaves are correlated with low pools of xanthophyll cycle components and low risk of photoinhibition. *Photosynthetica* 40: 349– 354.
- **Marmé D., Marchal B., Schafer E.,** (1971) A detailed analysis of phytochrome decay and dark reversion in mustard cotyledons. *Planta* 100: 331B336.
- **Misra, V.; Solomon, S.; Mall, A.K.; Prajapati, C.P.; Hashem, A.; Abd Allah, E.F.; Ansari, M.I.** (2020) Morphological assessment of water stressed sugarcane: A comparison of waterlogged and drought affected crop. *Saudi J Biol Sci* 27: 1228–1236.
- **Mitsuda N., Ohme-Takagi M.** (2009) Functional analysis of transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 50(7): 1232-1248.
- **Monteith J.L., Moss C.J.** (1977) Climate and the efficiency of crop production in Britain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 281: 277–294.

- **Moran R.** (1982) Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with n,n-dimethylformamide. *Plant Physiol* 69: 1376–1381.
- **Morison J. I., Lawson T.** (2007) Does lateral gas diffusion in leaves matter?. *Plant, cell & environment*, 30(9): 1072-1085.
- **Nagaoka S., Takano T.** (2003) Salt tolerance-related protein STO binds to a Myb transcription factor homologue and confers salt tolerance in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 54: 2231–2237.
- **Nagy F., Kircher S, Schäfer E.** (2001) Intracellular trafficking of photoreceptors during light induced signal transduction in plants. *J Cell Sci* 114:475B480.
- **Nakashima K., Shinwari Z.K., Sakuma Y., Seki M., Miura S., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** (2000) Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2 genes encoding DRE binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Mol Biol* 42: 657–665.
- **Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2013) ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant cell rep* 32(7): 959-970.
- **Noguchi T., Fujioka S., Choe S., Takatsuto S., Yoshida H., Yuan K., Feldmann A., Tax F.E.** (1999) Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of *Arabidopsis* accumulate brassinosteroids. *Plant Physiol* 121: 743-752.
- **Nomoto Y., Kubozono S., Miyachi M., Yamashino T., Nakamichi N., Mizuno T.** (2012) Circadian clock and PIF4-mediated external coincidence mechanism coordinately integrates both of the cues from seasonal changes in photoperiod and temperature to regulate plant growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* 8: e22863.
- **Oklestkova J. D., Tarkowská L., Eyer, T., Elbert A., Marek Z., Smržová O., Novák M., Fránek V., N. Zhabinskii, Strnad M.** (2017) Immunoaffinity chromatography combined with tandem mass spectrometry: A new tool for the selective capture and analysis of brassinosteroid plant hormones. *Talanta* 170: 432-440.
- **Oh E., Zhu J.Y., Wang Z.Y.** (2012) Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nat cell biol* 14(8): 802-809.

- **Oren-Shamir M.** (2009) Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants?. *Plant Sci* 177(4): 310-316.
- **Oyama T., Shimura Y., Okada K.** (1997) The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev.* 11: 2983–2995.
- **de Pater, S., Caspers, M., Kottenhagen, M., Meima, H., Ter Stege, R., & de Vetten, N.** (2006). Manipulation of starch granule size distribution in potato tubers by modulation of plastid division. *Plant Biotechnology Journal*, 4(1), 123-134.
- **Page E.R., Tollenaar M., Lee E.A., Lukens L., Swanton C.J.** (2010) Shade avoidance: an integral component of crop–weed competition. *Weed Research* 50(4): 281-288.
- **Patmi Y.S., Pitoyo A., Solichatun Sutarno** (2020) Effect of drought stress on morphological, anatomical, and physiological characteristics of Cempo Ireng Cultivar Mutant Rice (*Oryza sativa* l.) strain 51 irradiated by gamma-ray. *J Phys Conf Ser* 1436: 012015.
- **Perez-Martin A., Michelazzo C., Torres-Ruiz J.M., Flexas J, Fernández J.E., Sebastiani L, Diaz-Espejo A.** (2014) Regulation of Photosynthesis and Stomatal and Mesophyll Conductance under Water Stress and Recovery in Olive Trees: Correlation with Gene Expression of Carbonic Anhydrase and Aquaporins. *J Exp Bot* 65 (12): 3143–56.
- **Podolec R., Wagnon T. B., Leonardelli M., Johansson H., Ulm R.** (2022) Arabidopsis B-box transcription factors BBX20-22 promote UVR8 photoreceptor-mediated UV-B responses. *Plant J*
- **Pou A., Medrano H., Flexas J., y Tyerman S.D.** (2013) A putative role for TIP and PIP aquaporins in dynamics of leaf hydraulic and stomatal conductances in grapevine under water stress and re-watering. *Plant, cell environ* 36(4): 828-843.
- **Preuss S.B., Meister R., Xu Q., Urwin C.P., Tripodi F.A., Screen S.E., Anil V.S., Zhu S., Morrell J.A., Liu G., et al** (2012) Expression of the Arabidopsis thaliana BBX32 gene in soybean increases grain yield. *PLoS One* 7: e30717.
- **Quail P.H.** (1991) Phytochrome: a light-activated molecular switch that regulates plant gene expression. *Annu Rev Genet.* 25: 389-409.

- **Quail P.H., Boylan M.T., Parks B.M., Short T.W., XU Y., Wagner D.** (1995) Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* 268: 675B680.
- **Quail P.H.** (1997) An emerging molecular map of the phytochromes. *Plant Cell Environ* 20: 657-665.
- **Quail P.H.** (2002) Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr Opin Cell Biol* 14: 180–188.
- **Quail P.H.** (2008) The phytochrome family: dissection of functional roles and signalling pathways among family members. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*353:1399-403.
- **Queval G., Neukermans J., Vanderauwera S., Van Breusegem F., Noctor G.** (2012) Day length is a key regulator of transcriptomic responses to both CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Arabidopsis. - *Plant Cell Environ* 35: 374-387.
- **Qi Y., Wang X., Lei P., Li H., Yan L., Zhao J., Meng J., Shao J., An L., Yu F., et al** (2020) The chloroplast metalloproteases VAR2 and EGY1 act synergistically to regulate chloroplast development in Arabidopsis. *J Biol Chem* 295: 1036–1046.
- **Radin J.W., Ackerson R.C.** (1981) Water relations of cotton plants under nitrogen deficiency. III. Stomatal conductance, photosynthesis, and abscisic acid accumulation during drought. *Plant Physiol* 67: 115-119.
- **Ravindran N., Ramachandran H., Job N., Yadav A., Vaishak K., Datta S.** (2021) B-box protein BBX32 integrates light and brassinosteroid signals to inhibit cotyledon opening. *Plant Physiol* 187: 446–461.
- **Ribichich K.F., Chiozza M., Ávalos-Britez S., Cabello J.V., Arce A.L., Watson G., ... Chan R.L.** (2020) Successful field performance in warm and dry environments of soybean expressing the sunflower transcription factor HB4. *J Exp Bot* 71(10): 3142-3156.
- **Rizzini L., Favory J.J., Cloix C., Faggionato D., O'Hara A., Kaiserli E., Baumeister R., Schäfer E., Nagy F., Jenkins G.I., Ulm R.** (2011) Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science* 332: 103-6.

- **Robertson J.M., Pharis R.P., Huang Y.Y., Reid D.M., Yeung E.C.** (1985) Drought induced increases in abscisic acid levels in the root apex of sunflower. *Plant Physiol* 79: 1086-1089.
- **Roig-Villanova I., Bou-Torrent J., Galstyan A., Carretero-Paulet L., Portolés S., Rodríguez-Concepción M., Martínez-García J.F.** (2007) Interaction of shade avoidance and auxin responses: a role for two novel atypical bHLH proteins. *EMBO J* 26: 4756-67.
- **Saez A., Robert N., Maktabi M.H., Schroeder J.I., Serrano R., Rodriguez P.L.** (2006) Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in *Arabidopsis* by combined inactivation of the protein phosphatase type 2C ABI1 and HAB1. *Plant Physiol* 141: 1389–1399.
- **Sáez P.L., Galmés J., Ramírez C.F., Poblete L., Rivera B.K., Cavieres L.A., Clemente-Moreno M.J., Flexas J., Bravo L.A.** (2018) Mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> is the most significant limitation to photosynthesis at different temperatures and water availabilities in Antarctic vascular species. *Environ Exp Bot* 156: 279–287.
- **Sakuma Y., Maruyama K., Qin F., Osakabe Y., Shinozaki K., Yamaguchi Shinozaki K.** (2006) Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 18822–18827.
- **Sanjaya A., Muramatsu R., Sato S., Suzuki M., Sasaki S., Ishikawa H., ... Fujiwara M.T.** (2021) *Arabidopsis* EGY1 Is Critical for Chloroplast Development in Leaf Epidermal Guard Cells. *Plants* 10(6): 1254.
- **Saura-Sanchez M.** (2020) Mecanismos de acción de las proteínas BBX en *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral.
- **Schapendonk A.H.C.M., Spitters C.J.T., Groot P.J.** (1989) Effects of water stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence of five potato cultivars. *Potato Research* 32: 17- 32.
- **Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W.** (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 9(7): 671-675.

- **Sessa G., Carabelli M., Sassi M., Cioffi A., Possenti M., Mittempergher F., Becker J., Morelli G., Ruberti I.** (2005) A dynamic balance between gene activation and repression regulates the shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 19: 2811–2815.
- **Sessa, G., Carabelli, M., Possenti, M., Morelli, G., Ruberti, I.** (2018) Multiple pathways in the control of the shade avoidance response. *Plants* 7(4): 102.
- **Semmoloni, Mariana.** (2020). Integración de señales de sombra y sequía en *Arabidopsis thaliana*. (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.). Recuperado de [https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6863\\_Semmoloni](https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6863_Semmoloni)
- **Sharrock R.A., Quail P.H.** (1989) Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: Structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev* 3: 1745–1757.
- **Shangguan Z., Shao M., Dyckmans J.** (1999) Interaction of osmotic adjustment and photosynthesis in winter wheat under soil drought. *Journal of Plant Physiol* 154(5-6): 753-758.
- **Shimada, Y., Fujioka, S., Miyauchi, N., Kushiro, M., Takatsuto, S., Nomura, T., ... & Yoshida, S.** (2001). Brassinosteroid-6-oxidases from *Arabidopsis* and tomato catalyze multiple C-6 oxidations in brassinosteroid biosynthesis. *Plant physiology*, 126(2), 770-779.
- **Shin, D. H., Choi, M., Kim, K., Bang, G., Cho, M., Choi, S. B., ... & Park, Y. I.** (2013). HY5 regulates anthocyanin biosynthesis by inducing the transcriptional activation of the MYB75/PAP1 transcription factor in *Arabidopsis*. *FEBS letters*, 587(10), 1543-1547.
- **Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol* 115: 327–334.
- **Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot* 58(2): 221-227.
- **Sinclair T.R., Muchow R.C.** (1999) Radiation use efficiency. *Adv Agron* 65: 215–265.



- **Song Z., Bian Y., Liu J., Sun Y., Xu D.** (2020) B-box proteins: Pivotal players in light-mediated development in plants. *J Integr Plant Biol* 10.1111/jipb.12935.
- **Song Z., Heng Y., Bian Y., Xiao Y., Liu J., Zhao X., ... Xu D.** (2021) BBX11 promotes red light-mediated photomorphogenic development by modulating phyB-PIF4 signaling. *aBIOTECH* 2(2): 117-130.
- **Steinacher M., Joos F. Stocker T. F.** (2013) Allowable carbon emissions lowered by multiple climate targets. *Nature* 499: 197–201.
- **Steyn W.J., Wand S.J.E., Holcroft D.M., Jacobs G.** (2002) Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytol* 155: 349–361.
- **Ströher E., Wang X.-J., Roloff N., Klein P., Husemann A., Dietz K.-J.** (2009) Redox-dependent regulation of the stress-induced zinc-finger protein SAP12 in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 2: 357–367.
- **Suárez-López P., Wheatley K., Robson F., Onouchi H., Valverde F., Coupland G.** (2001) CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 410(6832): 1116-1120.
- **Sun Y., Fan X.Y., Cao D.M., et al.,** (2010) Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 19: 765–777.
- **Sunil, L., y Shetty, N. P.** (2022). Biosynthesis and regulation of anthocyanin pathway genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(5-6), 1783-1798
- **Taiz L., Zeiger E., Møller I.M., and Murphy A.** (2018) *Fundamentals of Plant Physiology*. Sinauer Associates, Massachusetts, EEUU.
- **Talar U., Kielbowicz-Matuk A., Czarnecka J., Rorat T.** (2017) Genome-wide survey of B-box proteins in potato (*Solanum tuberosum*)-Identification, characterization and expression patterns during diurnal cycle, etiolation and de-etiolation. *PLoS ONE* 12(5): e0177471.
- **Tao Y., Ferrer J.L., Ljung K., Pojer F., Hong F., Long J.A., Li L., Moreno J.E., Bowman M.E., Ivans L.J., Cheng Y., Lim J., Zhao Y., Ballaré C.L., Sandberg G., Noel J.P., Chory J.** (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* 133: 164-76.

- **Tarkowská D., Novák O., Oklestkova J., Strnad M.** (2016) The determination of 22 natural brassinosteroids in a minute sample of plant tissue by UHPLC–ESI–MS/MS. *Analyt bioanalyt chemist* 408(24): 6799-6812.
- **Thiele A., Herold M., Lenk I., Quail P.H., Gatz C.** (1999) Heterologous expression of Arabidopsis phytochrome B in transgenic potato influences photosynthetic performance and tuber development. *Plant Physiol* 120: 73–82
- **Vaishak K.P., Yadukrishnan P., Bakshi S., Kushwaha A.K., Ramachandran H., Job N., Babu D., Datta S.** (2019) The B-box bridge between light and hormones in plants. *J Photochem Photobiol B* 191: 164-174
- **Waltz E.** (2015) First stress- tolerant soybean gets go- ahead in Argentina. *Nature Biotechol* 33: 682.
- **Wang Z.Y., Nakano T., Gendron J., He J., Chen M., Vafeados D., Yang Y., Fujioka S., Yoshida S., Asami T., Chory J.** (2002) Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev Cell* 2: 505-513.
- **Wang Z. Y., Bai M. Y., Oh E., & Zhu J. Y.** (2012) Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis. *Annu rev genet* 46: 701-724.
- **Wang Q., Tu X., Zhang J., Chen X., Rao L.** (2013) Heat stress-induced BBX18 negatively regulates the thermotolerance in Arabidopsis. *Mol Biol Rep* 40: 2679–2688.
- **Wang W., Bai M. Y., & Wang Z. Y.** (2014) The brassinosteroid signaling network—a paradigm of signal integration. *Curr opin plant biol* 21: 147-153.
- **Warnasooriya S.N., Brutnell T.P.** (2014) Enhancing the productivity of grasses under high-density planting by engineering light responses: from model systems to feedstocks. *J Exp Bot* 65(11): 2825-2834.
- **Waterman P.G., Mole S.** (1994) *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- **Wei Z., Yuan T., Tarkowská D. E., Kim J., Nam H. G., Novák O., ...Li, J.** (2017) Brassinosteroid biosynthesis is modulated via a transcription factor cascade of COG1, PIF4, and PIF5. *Plant Physiol* 174(2): 1260-1273.

- **WWAP** (United Nations World Water Assessment Programme). The United Nations World Water Development Report 2015: Water for a Sustainable World UNESCO, Paris (2015).
- **Xiong C., Luo D., Lin A., Zhang C., Shan L., He P., ... Wang T.** (2019) A tomato B-box protein Sl BBX 20 modulates carotenoid biosynthesis by directly activating PHYTOENE SYNTHASE 1 and is targeted for 26S proteasome-mediated degradation. *New Phytol* 221(1): 279-294.
- **Xu D., Li J., Gangappa S.N., Hettiarachchi C., Lin F., Andersson M.X., Jiang Y., Deng X.W., Holm M.** (2014) Convergence of Light and ABA signaling on the ABI5 promoter. *PLoS Genet* 10: e1004197.
- **Xu D., Jiang Y., Li J., Lin F., Holm M., Deng X.W.** (2016) BBX21, an Arabidopsis B-box protein, directly activates HY5 and is targeted by COP1 for 26S proteasome-mediated degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: 7655–7660.
- **Xu D., Jiang Y., Li J., Holm M., Deng X.W.** (2018) The B-box domain protein BBX21 promotes photomorphogenesis. *Plant Physiol* 176: 2365–2375.
- **Xu Y., Zhao X., Aiwaili P., Mu X., Zhao M., Zhao J., Cheng L., Ma C., Gao J., Hong B.** (2020). A zinc finger protein BBX19 interacts with ABF3 to negatively affect drought tolerance in Chrysanthemum. *Plant J* 103: 1783– 1795.
- **Xu D.** (2020) COP1 and BBXs- HY5- mediated light signal transduction in plants. *New Phytol* 228(6): 1748-1753.
- **Yadav A., Ravindran N., Singh D., Rahul P.V., Datta S.** (2020) Role of Arabidopsis BBX proteins in light signaling. *J Plant Biochem and Biotechnol* doi.org/10.1007/s13562-020-00597-2.
- **Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* 57: 781–803.
- **Yang Y., Zhang L., Chen P., Liang T., Li X. y Liu H.** (2020) UV-B photoreceptor UVR8 interacts with MYB73/MYB77 to regulate auxin responses and lateral root development. *The EMBO journal* 39(2): e101928.
- **Yang Y., Ma C., Xu Y., Wei Q., Imtiaz M., Lan H., Gao S., Cheng L., Wang M., Fei Z., Hong B., Gao J.** (2014) A zinc finger protein regulates flowering time

and abiotic stress tolerance in *Chrysanthemum* by modulating gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* 26: 2038–2054.

- **Yang C., Li L.** (2017) Hormonal regulation in shade avoidance. *Front Plant Sci* 8:1527.
- **Yin X., Sun Z., Struik P.C., Gu J.** (2011) Evaluating a new method to estimate the rate of leaf respiration in the light by analysis of combined gas exchange and chlorophyll fluorescence measurements. *J Exp Bot* 62: 3489– 3499.
- **Yin Y., Wang Z.Y., Mora-Garcia S., Li J., Yoshida S., Asami T., Chory J.** (2002) BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation *Cell*, 109: 181-191.
- **Yordanov I., Velikova V. y Tsonev T.** (2003) Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulg. J. Plant Physiol* 187–206.
- **Zhang H., He H., Wang X., Wang X., Yang X., Li L., Deng X.W.** (2011) Genome wide mapping of the HY5-mediated gene networks in *Arabidopsis* that involve both transcriptional and post-transcriptional regulation. *Plant J* 65: 346–358.
- **Zhao, B., y Li, J.** (2012). Regulation of brassinosteroid biosynthesis and inactivation F. *J Integr Plant Biol* 54(10): 746–759).
- **Zhao F.Y., Wang K., Zhang S.Y., Ren J., Liu T., Wang X.** (2014) Crosstalk between ABA, auxin, MAPK signaling, and the cell cycle in cadmium-stressed rice seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 36:1879–1892.
- **Zhao X., Heng Y., Wang X., Deng X. W., Xu D.** (2020) A positive feedback loop of BBX11–BBX21–HY5 promotes photomorphogenic development in *Arabidopsis*. *Plant communications* 1(5): 100045.
- **Zhu J., Gong Z., Zhang C., Song C.-P. Damsz B., Inan G., Koiwa H., Zhu J.-K., Hasegawa P.M. Bressan, R.A.** (2002) OSM1/ SPY61: A syntaxin protein in *Arabidopsis* controls abscisic acid– mediated and non-abscisic acid–mediated responses to abiotic stress. *Plant Cell* 14: 3009–3028.
- **Zhu J.K.** (2016) Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell* 167: 313–324.

## FIGURAS SUPLEMENTARIAS

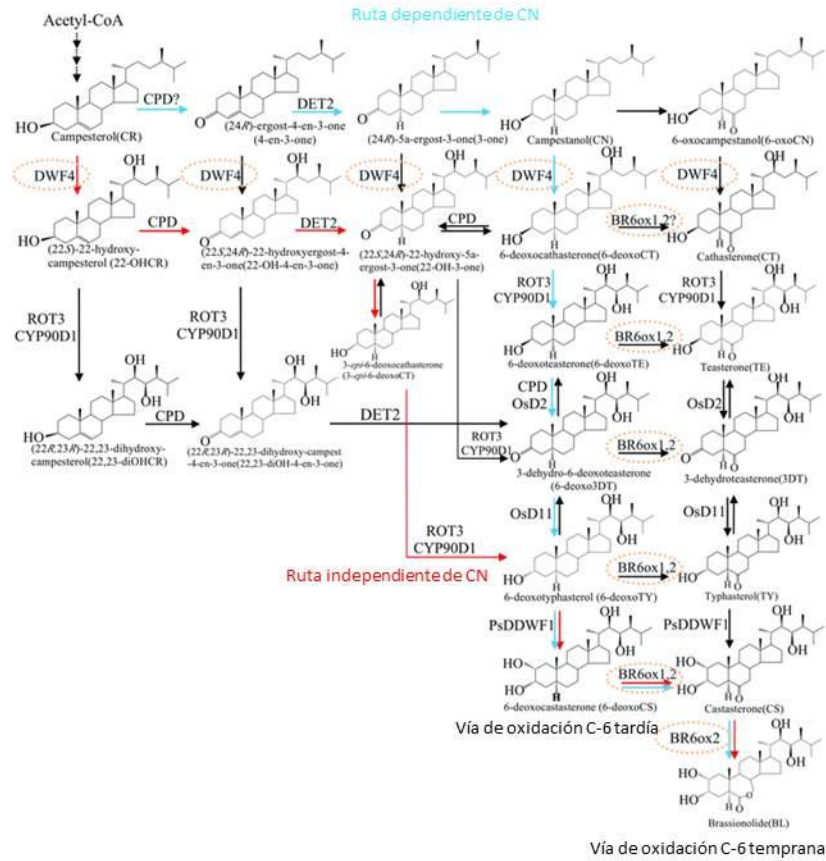


Figura suplementaria 1: Ruta biosintética simplificada de brasinoesteroides, indicando las enzimas implicadas en cada una de las reacciones (adaptado de Zhao y Li, 2012).

## CUADROS SUPLEMENTARIOS

**Cuadro S3.1: Objetivos de BZR y genes que son regulados por BBX21 bajo sombra.**

<i>Gen</i>	<i>Anotación</i>
At3g05800	AIF1, ATBS1(ACTIVATION-TAGGED BRI1 SUPPRESSOR 1)-INTERACTING FACTOR 1
At1g04680	pectate lyase family protein, similar to pectate lyase GP:14531296 from (Fragaria x ananassa)
At3g13740	URF 4-related, similar to URF 4 (GI:49224) (Swiss-Prot:Q05370)(Synechococcus sp.)
At1g17430	hydrolase, alpha/beta fold family protein, low similarity to SP:Q02104 Lipase 1 precursor (EC 3.1.1.3) (Triacylglycerol lipase) {Psychrobacter immobilis}, contains Pfam profile PF00561: hydrolase, alpha/beta fold family
At4g27410	ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 72, RD26, RESPONSIVE TO DESICCATION 26. Encodes a NAC transcription factor induced in response to desiccation. It is localized to the nucleus and acts as a transcriptional activator in ABA-mediated dehydration response.
At2g42580	TETRATRICOPETIDE-REPEAT THIOREDOXIN-LIKE 3, TTL3, VHI-INTERACTING TPR CONTAINING PROTEIN, VIT. Encodes a member of the TTL family and contains a thioredoxin like domain and three tandem TPRs. Interacts physically with BRL2/VH1 and appears to play a role in brassinosteroid and auxin signaling.
At5g54500	FQR1__quinone reductase. Encodes a flavin mononucleotide-binding flavodoxin-like quinone reductase that is a primary auxin-response gene.
At1g23080	PIN7__auxin efflux carrier protein, putative, similar to efflux carrier of polar auxin transport (Brassica juncea) gi:12331173:emb:CAC24691
At5g65650	expressed protein
At2g34070	TBL37, TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 37
At5g58650	Encodes PSY1, an 18-aa tyrosine-sulfated glycopeptide that promotes cellular proliferation and expansion.
At1g05575	expressed protein
At4g13340	LEUCINE-RICH REPEAT/EXTENSIN 3, LRX3
At5g10180	ARABIDOPSIS SULFATE TRANSPORTER 68, AST68, SULFATE TRANSPORTER 2;1, SULTR2;1
At4g31590	ATCSLC05_ATCSLC5_CSLC05__glycosyl transferase family 2 protein, similar to cellulose synthase from Agrobacterium tumefaciens (gi:710492) and Agrobacterium radiobacter (gi:710493); contains Pfam glycosyl transferase, group 2 family protein domain PF00535
At1g11260	glucose transporter (STP1), nearly identical to glucose transporter GB:P23586 SP:P23586 from (Arabidopsis thaliana)
At5g57060	expressed protein
At1g12500	phosphate translocator-related, low similarity to glucose-6-phosphate/phosphate-translocator precursor (Zea mays) GI:2997589, phosphoenolpyruvate/phosphate translocator precursor (Mesembryanthemum crystallinum) GI:9295275, SP:P21727:CPTR_PEA Triose phosphate/phosphate translocator, chloroplast precursor (CTPT) {Pisum sativum}
At5g49700	DNA-binding protein-related, contains Pfam domain PF03479: Domain of unknown function (DUF296), found in AT-hook motifs Pfam:PF02178
At5g04200	ATMC9, ATMCP2F, MC9, MCP2F, METACASPASE 2F, METACASPASE 9

<i>Gen</i>	<i>Anotación</i>
At5g44130	FASCICLIN-LIKE ARABINOGALACTAN PROTEIN 13 PRECURSOR, FLA13
At4g36670	ATPLT6, ATPMT6, PLT6, PMT6, POLYOL TRANSPORTER 6, POLYOL/MONOSACCHARIDE TRANSPORTER 6
At5g13180	ANAC083, NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 83, NAC083, VND-INTERACTING 2, VNI2. Encodes a NAC domain transcription factor that interacts with VND7 and negatively regulates xylem vessel formation
At1g23030	armadillo/beta-catenin repeat family protein / U-box domain-containing protein, contains Pfam domain, PF00514: Armadillo/beta-catenin-like repeats and Pfam, PF04564: U-box domain
At1g71030	ATMYBL2__Encodes a putative myb family transcription factor. In contrast to most other myb-like proteins its myb domain consists of a single repeat. A proline-rich region potentially involved in transactivation is found in the C-terminal part of the protein. Its transcript accumulates mainly in leaves.
At3g61160	shaggy-related protein kinase beta / ASK-beta (ASK2), identical to shaggy-related protein kinase beta SP:O23145 GI:2569931 from ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )

**Cuadro S3.2: Objetivos de BZR1 (con regulación de brasinoesteroides), objetivos de PIF4 y genes regulados por BBX21 en sombra.**

<i>Gen</i>	<i>Anotación</i>
At1g09250	expressed protein
At2g44080	expressed protein
At1g75450	CKX5_ATCKX5__FAD-binding domain-containing protein / cytokinin oxidase family protein, similar to GB:CAA77151 from ( <i>Zea mays</i> ) (SP:Q9T0N8) (Plant J. 17 (6), 615-626 (1999))
At4g19420	pectinacetyltransferase family protein, contains Pfam profile: PF03283 pectinacetyltransferase
At3g58120	AtZIP61. bZIP transcription factor family protein, contains Pfam profile: PF00170 bZIP transcription factor ;supported by cDNA gi:15100054:gb:AF401300.1:AF401300
At5g02760	protein phosphatase 2C family protein / PP2C family protein, similar to Ser/Thr protein phosphatase 2C (PP2C6) (GI:15020818) ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ); similar to protein phosphatase 2C (GI:3608412) ( <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> ); contains Pfam PF00481 : Protein phosphatase 2C domain
At1g69160	expressed protein
At1g75830	LCR67_PDF1.1__plant defensin-fusion protein, putative (PDF1.1), identical to SP:P30224 Cysteine-rich antifungal protein 1 precursor (AFP1) ( <i>Anther-specific protein S18 homolog</i> ) { <i>Arabidopsis thaliana</i> }
At1g25450	very-long-chain fatty acid condensing enzyme, putative, nearly identical to fatty acid condensing enzyme CUT1 GI:5001734 from ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )
At3g49360	glucosamine/galactosamine-6-phosphate isomerase family protein, similar to SP:O95336 6-phosphogluconolactonase (EC 3.1.1.31) (6PGL) { <i>Homo sapiens</i> }; contains Pfam profile PF01182: Glucosamine-6-phosphate isomerase/6-phosphogluconolactonase
At2g43050	pectinesterase family protein, contains Pfam profile: PF01095 pectinesterase

<i>Gen</i>	<i>Anotación</i>
At5g60850	OBP4__Dof-type zinc finger domain-containing protein, similar to zinc finger protein OBP4 gi:5059396 from ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ); EMBL:AF155817
At4g17245	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein, contains Pfam profile: PF00097 zinc finger, C3HC4 type (RING finger)
At1g02360	chitinase, putative, similar to chitinase precursor GI:5880845 from ( <i>Petroselinum crispum</i> )
At2g43060	IBH1
At3g13980	expressed protein
At1g32190	expressed protein
At1g29395	COR414-TM1__stress-responsive protein, putative, similar to cold acclimation WCOR413-like protein gamma form ( <i>Hordeum vulgare</i> ) gi:18449100:gb:AAL69988; similar to stress-regulated protein SAP1 ( <i>Xerophyta viscosa</i> ) gi:21360378:gb:AAM47505
At3g28180	ATCSLC04_ATCSLC4_CSLC04__glycosyl transferase family 2 protein, similar to beta-(1-3)-glucosyl transferase GB:AAC62210 GI:3687658 from ( <i>Bradyrhizobium japonicum</i> ), cellulose synthase from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (gi:710492) and <i>Agrobacterium radiobacter</i> (gi:710493); contains Pfam glycosyl transferase, group 2 family protein domain PF00535

**Cuadro S3.3: Objetivos de BZR1 (sin regulación de brasinoesteroides) y genes regulados por BBX21 en sombra.**

<i>Gen</i>	<i>Anotación</i>
At5g07570	glycine/proline-rich protein, contains similarity to flagelliform silk protein ( <i>Nephila clavipes</i> ) gi:7106224:gb:AAF36090
At2g46370	JAR1_FIN219_JAR__auxin-responsive GH3 family protein, similar to auxin-responsive GH3 product ( <i>Glycine max</i> ) GI:18591; contains Pfam profile PF03321: GH3 auxin-responsive promoter
At3g49790	expressed protein, predicted protein, <i>Arabidopsis thaliana</i>
At1g07040	expressed protein
At5g53060	RCF3, REGULATOR OF CBF GENE EXPRESSION 3
At3g04910	WNK1_ZIK4__protein kinase family protein, contains protein kinase domain, Pfam:PF00069
At2g47200	expressed protein
At1g27290	expressed protein
At2g39650	expressed protein, contains Pfam profile PF04720: Protein of unknown function (DUF506)
At4g13420	HAK5__potassium transporter (HAK5), identical to K <sup>+</sup> transporter HAK5 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) gi:7108597:gb:AAF36490; similar to high-affinity potassium transporter AtKUP1p ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) gi:2688979:gb:AAB88901; KUP/HAK/KT Transporter family member, PMID:11500563



<i>Gen</i>	<i>Anotación</i>
At4g23750	CRF2, CYTOKININ RESPONSE FACTOR 2, TARGET OF MONOPTEROS 3, TMO3
At4g38550	expressed protein
At3g07360	ARABIDOPSIS THALIANA PLANT U-BOX 9, ATPUB9, PLANT U-BOX 9, PUB9. Encodes a protein containing a U-box and an ARM domain. This protein has E3 ubiquitin ligase activity based on in vitro assays.
At4g26210	mitochondrial ATP synthase g subunit family protein, contains Pfam profile: PF04718 mitochondrial ATP synthase g subunit
At2g47270	Encodes UPBEAT1 (UPB1), a transcription factor with a bHLH domain.
At1g18870	ARABIDOPSIS ISOCHORISMATE SYNTHASE 2, ATICS2, ICS2, ISOCHORISMATE SYNTHASE 2
At1g14330	kelch repeat-containing F-box family protein, contains Pfam profile PF01344: Kelch motif; contains weak Pfam PF00646: F-box domain; weak similarity to Kelch-like protein 1 (Swiss-Prot:Q9NR64) (Homo sapiens)
At4g30450	glycine-rich protein
At4g36030	ARMADILLO REPEAT ONLY 3, ARO3
At1g11380	expressed protein, contains Pfam profile PF04749: Protein of unknown function, DUF614
At3g02875	IAA-LEUCINE RESISTANT 1, ILR1. Hydrolyzes amino acid conjugates of the plant growth regulator indole-3-acetic acid (IAA), including IAA-Leu and IAA-Phe. Uses Mg and Co ions as cofactors
At2g41650	expressed protein
At3g05200	ATL6__zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein (ATL6), contains Pfam profile: PF00097: Zinc finger, C3HC4 type (RING finger)
At4g19230	CYP707A1__cytochrome P450 family protein, cytochrome P450, Encodes a protein with ABA 8'-hydroxylase activity, involved in ABA catabolism.
At2g40630	expressed protein
At1g61740	expressed protein, contains Pfam profile: PF01925 domain of unknown function DUF81; identical to cDNA hypothetical protein, partial GI:4079631
At2g04800	expressed protein
At2g47180	ATGOLS1, GALACTINOL SYNTHASE 1, GOLS1. Gols1 is a galactinol synthase that catalyzes the formation of galactinol from UDP-galactose and myo-inositol. Gols1 transcript levels rise in response to methyl viologen, an oxidative damage-inducing agent. Plants over-expressing Gols1 have increased tolerance to salt, chilling, and high-light stress.

**Cuadro S3.4: Objetivos de BZR1 (sin regulación de brasinoesteroides) objetivos de PIF4 y genes regulados por BBX21 en sombra.**

<i>Gen</i>	<i>Anotación</i>
At5g13170	nodulin MtN3 family protein, similar to MtN3 GI:1619602 (root nodule development) from (Medicago truncatula); identical to cDNA senescence-associated protein (SAG29) mRNA, partial cds GI:4426938

<i>Gen</i>	<i>Anotación</i>
At2g30520	RPT2__signal transducer of phototropic response (RPT2), identical to RPT2 (Arabidopsis thaliana) gi:6959488:gb:AAF33112
At5g15860	expressed protein
At5g06530	similar to ABC transporter family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:At3g52310.1); similar to putative ABC transporter AbcG1 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:XP_480256.1); contains InterPro domain AAA ATPase (InterPro:IPR003593); contains InterPro domain ABC transporter (InterPro:IPR003439); contains InterPro domain ATP/GTP-binding site motif A (P-loop) (InterPro:IPR001687)
At4g23820	glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family protein, weak similarity to polygalacturonase PG 1 (Glycine max) GI:5669846; contains PF00295: Glycosyl hydrolases family 28
At3g49580	expressed protein
At4g23260	protein kinase family protein, contains Pfam domain PF00069: Protein kinase domain
At5g60840	expressed protein, predicted protein, Drosophila melanogaster
At1g17220	translation initiation factor IF-2, chloroplast, putative, similar to SP:P57997:IF2C_PHAVU Translation initiation factor IF-2, chloroplast precursor (PvIF2cp) {Phaseolus vulgaris}
At5g47240	ATNUDT8__MutT/nudix family protein, similar to SP:P53370 Nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 6 {Homo sapiens}; contains Pfam profile PF00293: NUDIX domain
At2g22980	SCPL13__similar to serine carboxypeptidase S10 family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:At2g23000.1); similar to serine carboxypeptidase S10 family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:At2g23010.2); similar to serine carboxypeptidase S10 family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:At3g10450.1); similar to serine carboxypeptidase S10 family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:At2g23010.1); similar to serine carboxypeptidase S10 family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:At2g22920.2); similar to OSJNBb0051N19.2 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:XP_474646.1); contains InterPro domain Esterase/lipase/thioesterase (InterPro:IPR000379); contains InterPro domain Serine carboxypeptidase (S10) (InterPro:IPR001563)
At4g38810	calcium-binding EF hand family protein, contains INTERPRO:IPR002048 calcium-binding EF-hand domain
At4g19170	NCED4__9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, putative / neoxanthin cleavage enzyme, putative / carotenoid cleavage dioxygenase, putative, similar to 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (Phaseolus vulgaris)(GI:6715257); neoxanthin cleavage enzyme, Lycopersicon esculentum, PATX:E325797
At4g16770	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein, low similarity to flavonol synthase from Petunia hybrida (SP:Q07512), Citrus unshiu (GI:4126403); contains Pfam domain PF03171, 2OG-Fe(II) oxygenase superfamily; non-consensus GG acceptor splice site at exon 8

**Cuadro S3.5: Objetivos de unión a PIF4 que están regulados por PIF y genes que son regulados por BBX21 en sombra (41 genes)**

<i>Gen</i>	<i>Descripción</i>
AT1G01070	UMAMIT28, USUALLY MULTIPLE ACIDS MOVE IN AND OUT TRANSPORTERS 28
AT1G06980	PADRE protein

<i>Gen</i>	<i>Descripción</i>
AT1G07010	ATSLP1, SHEWENELLA-LIKE PROTEIN PHOSPHATASE 1, SLP1
AT1G09420	G6PD4, GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE 4
AT1G12080	Vacuolar calcium-binding protein-like protein;(source:Araport11)
AT1G13280	ALLENE OXIDE CYCLASE 4, AOC4
AT1G20190	member of Alpha-Expansin Gene Family. Naming convention from the Expansin Working Group (Kende et al, 2004. Plant Mol Bio)
AT1G52190	ATNPF1.2, NITRATE TRANSPORTER 1.11, NPF1.2, NRT1.11, NRT1/ PTR FAMILY 1.2
AT1G64660	ATMGL, METHIONINE GAMMA-LYASE, MGL
AT1G67050	membrane-associated kinase regulator;(source:Araport11)
AT1G67750	Pectate lyase family protein;(source:Araport11)
AT1G76240	DUF241 domain protein (DUF241);(source:Araport11)
AT2G19660	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein;(source:Araport11)
AT2G28190	TSOD2, COPPER/ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE 2, CSD2, CZSOD2, SOD2, SUPEROXIDE DISMUTASE 2
AT2G38170	ATCAX1, CATION EXCHANGER 1, CAX1, RARE COLD INDUCIBLE 4, RCI4
AT2G38400	AGT3, ALANINE:GLYOXYLATE AMINOTRANSFERASE 3
AT2G43010	ATPIF4, PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4, PIF4, SRL2
AT3G14370	WAG2
AT3G23700	S1 RNA-BINDING RIBOSOMAL PROTEIN 1, SRRP1
AT3G45600	TET3, TETRASPANIN3
AT3G54400	Eukaryotic aspartyl protease family protein
AT4G14560	IAA1
AT4G25100	FSD1, Fe superoxide dismutase 1
AT4G27435	fiber (DUF1218)
AT4G33470	HDA14, histone deacetylase 14
AT4G38690	PLC-like phosphodiesterases superfamily protein
AT5G04530	KCS19, 3-ketoacyl-CoA synthase 19
AT5G06980	hypothetical protein
AT5G07010	ST2A, sulfotransferase 2A

<i>Gen</i>	<i>Descripción</i>
AT5G10430	AGP4, arabinogalactan protein 4
AT5G14780	FDH, formate dehydrogenase
AT5G15230	GASA4, GAST1 protein homolog 4
AT5G18820	Cpn60alpha2, chaperonin-60alpha2
AT5G24870	RING/U-box superfamily protein
AT5G39850	Ribosomal protein S4
AT5G39860	PRE1, PACLOBUTRAZOL RESISTANCE1
AT5G43700	ATAUX2-11, AUXIN INDUCIBLE 2-11
AT5G46180	DELTA-OAT, ornithine-delta-aminotransferase
AT5G48900	Pectin lyase-like superfamily protein
AT5G52570	BETA-OHASE 2, beta-carotene hydroxylase 2
AT5G53980	HB52, homeobox protein 52

**Cuadro S3.6: Genes regulados positivamente en restricción hídrica expresados diferencialmente en plantas Spunta.**

Genes	Control (bien regado)			R. hídrica			spunta_100%	spunta_35%	ratio spunta
	Spunta C1	Spunta C2	Spunta C3	Spunta H1	Spunta H2	Spunta H3			
PGSC0003DMT400012995	0,95	0,58	0,65	8,96	3,44	16,26	0,73	9,55	13,15
PGSC0003DMT400078103	1,27	2,02	0,33	13,44	8,96	23,46	1,21	15,29	12,67
PGSC0003DMT400033385	1,59	0,87	0,65	10,08	15,85	12,80	1,04	12,91	12,45
PGSC0003DMT400083792	1,27	1,73	1,30	16,52	10,68	26,13	1,43	17,78	12,40
PGSC0003DMT400034146	0,32	0,87	0,00	4,48	1,03	8,80	0,40	4,77	12,03
PGSC0003DMT400041814	0,32	0,29	0,33	1,68	2,07	7,46	0,31	3,74	11,93
PGSC0003DMT400078044	0,32	0,00	0,00	1,12	1,03	1,60	0,11	1,25	11,72
PGSC0003DMT400080961	2,86	2,89	1,95	28,55	24,46	35,99	2,57	29,67	11,56
PGSC0003DMT400018307	0,32	0,00	0,65	3,64	3,10	3,47	0,32	3,40	10,53
PGSC0003DMT400050274	0,00	0,58	0,98	4,76	1,72	9,06	0,52	5,18	9,96
PGSC0003DMT400042165	0,32	0,58	0,00	4,20	2,07	2,40	0,30	2,89	9,63
PGSC0003DMT400067459	0,00	0,00	0,98	0,84	0,34	8,26	0,33	3,15	9,63
PGSC0003DMT400000538	0,32	0,00	0,65	1,96	1,72	5,33	0,32	3,00	9,29
PGSC0003DMT400053378	0,64	0,00	0,00	1,12	0,69	4,00	0,21	1,94	9,08
PGSC0003DMT400075824	0,32	1,15	0,98	7,28	3,10	11,46	0,82	7,28	8,91
PGSC0003DMT400079929	1,59	1,44	1,30	14,56	7,92	16,00	1,44	12,83	8,89
PGSC0003DMT400053173	2,86	1,15	1,63	12,60	18,95	14,13	1,88	15,23	8,10
PGSC0003DMT400075642	0,32	0,00	0,65	2,24	1,03	4,27	0,32	2,51	7,77
PGSC0003DMT400036487	3,18	5,77	5,20	31,07	24,11	54,39	4,72	36,52	7,74
PGSC0003DMT400014656	0,64	0,87	0,65	3,08	4,13	9,33	0,72	5,51	7,66
PGSC0003DMT400082749	0,32	0,29	0,33	1,12	0,69	5,33	0,31	2,38	7,60
PGSC0003DMT400088089	0,00	0,00	0,65	0,56	1,38	2,93	0,22	1,62	7,49
PGSC0003DMT400019127	0,32	0,00	0,33	1,40	1,03	2,40	0,22	1,61	7,43
PGSC0003DMT400034604	0,00	0,29	0,33	1,40	1,03	2,13	0,21	1,52	7,35
PGSC0003DMT400066490	1,59	0,00	1,30	3,64	3,44	14,13	0,96	7,07	7,34
PGSC0003DMT400019653	0,64	0,58	0,33	3,36	3,44	4,53	0,52	3,78	7,31

PGSC0003DMT400068453	0,32	0,00	0,33	2,52	0,69	1,33	0,22	1,51	6,98
PGSC0003DMT400075435	0,95	0,00	0,65	3,08	3,10	4,53	0,53	3,57	6,69
PGSC0003DMT400002504	0,32	0,29	0,98	4,48	3,79	1,87	0,53	3,38	6,38
PGSC0003DMT400000694	2,86	5,20	4,88	28,27	25,49	25,59	4,31	26,45	6,13
PGSC0003DMT400070196	0,64	0,58	0,65	2,80	1,38	6,93	0,62	3,70	5,94
PGSC0003DMT400088705	0,00	0,29	0,65	2,80	1,38	1,33	0,31	1,84	5,86
PGSC0003DMT400079843	0,00	0,29	0,98	2,80	2,07	2,40	0,42	2,42	5,72
PGSC0003DMT400021053	0,32	0,58	0,00	1,68	0,69	2,67	0,30	1,68	5,60
PGSC0003DMT400067635	1,27	2,31	1,30	7,28	9,30	10,40	1,63	8,99	5,53
PGSC0003DMT400080660	0,95	2,02	0,98	6,72	6,20	7,73	1,32	6,88	5,23
PGSC0003DMT400083793	1,59	2,89	3,90	12,88	8,96	20,26	2,79	14,03	5,02
PGSC0003DMT400043247	0,32	1,15	0,00	1,96	2,41	2,93	0,49	2,43	4,97
PGSC0003DMT400079091	1,27	0,29	1,63	3,08	5,51	7,20	1,06	5,26	4,95
PGSC0003DMT400046624	6,35	10,10	12,36	46,47	55,81	39,19	9,60	47,16	4,91
PGSC0003DMT400011954	0,64	0,00	0,65	1,68	2,76	1,87	0,43	2,10	4,89
PGSC0003DMT400074356	4,45	3,18	1,95	15,12	11,37	19,73	3,19	15,41	4,82
PGSC0003DMT400044239	1,27	1,73	1,30	2,52	5,17	12,26	1,43	6,65	4,64
PGSC0003DMT400049305	1,27	0,29	1,30	4,76	5,17	3,20	0,95	4,38	4,59
PGSC0003DMT400031584	1,91	0,58	0,65	5,88	3,10	5,33	1,05	4,77	4,56
PGSC0003DMT400076960	0,32	0,87	0,65	2,24	2,41	3,73	0,61	2,79	4,55
PGSC0003DMT400073479	0,64	0,29	0,33	1,40	1,38	2,93	0,42	1,90	4,53
PGSC0003DMT400049124	2,22	0,87	1,30	4,48	3,44	11,73	1,46	6,55	4,48
PGSC0003DMT400073240	0,64	1,15	0,65	3,36	4,82	2,67	0,81	3,62	4,45
PGSC0003DMT400009069	10,80	7,22	14,31	45,35	61,66	35,72	10,78	47,58	4,41
PGSC0003DMT400052105	5,40	4,62	4,55	24,08	15,85	24,26	4,86	21,40	4,41
PGSC0003DMT400065226	0,32	1,15	1,63	3,08	4,13	6,13	1,03	4,45	4,30
PGSC0003DMT400053156	0,64	1,15	0,00	3,08	2,41	2,13	0,60	2,54	4,26
PGSC0003DMT400044333	1,59	0,58	0,98	3,36	4,13	5,87	1,05	4,45	4,24
PGSC0003DMT400010253	0,64	1,44	0,33	1,40	5,51	3,20	0,80	3,37	4,20

PGSC0003DMT400026261	3,18	3,18	3,90	9,24	7,23	25,86	3,42	14,11	4,13
PGSC0003DMT400032319	0,64	0,58	0,33	2,80	1,72	1,87	0,52	2,13	4,12
PGSC0003DMT400017543	0,64	0,29	0,33	1,68	1,38	2,13	0,42	1,73	4,12
PGSC0003DMT400027952	0,64	1,15	0,65	2,80	3,44	3,73	0,81	3,32	4,09
PGSC0003DMT400023436	0,64	1,15	0,33	2,52	3,10	2,93	0,71	2,85	4,03
PGSC0003DMT400038501	0,95	1,15	1,30	5,04	5,17	3,47	1,13	4,56	4,02
PGSC0003DMT400058325	0,00	1,15	0,98	1,12	3,79	3,47	0,71	2,79	3,93
PGSC0003DMT400040043	1,91	2,02	1,63	5,04	7,23	9,60	1,85	7,29	3,93
PGSC0003DMT400002085	1,59	0,58	2,60	4,20	3,79	10,66	1,59	6,22	3,91
PGSC0003DMT400053645	9,53	8,95	10,41	36,95	40,30	35,46	9,63	37,57	3,90
PGSC0003DMT400032493	0,32	0,00	1,30	1,96	2,76	1,60	0,54	2,11	3,90
PGSC0003DMT400024698	0,64	0,00	1,30	2,52	3,44	1,60	0,65	2,52	3,90
PGSC0003DMT400082799	6,99	6,35	5,20	21,00	25,84	24,53	6,18	23,79	3,85
PGSC0003DMT400021519	0,64	1,15	0,00	1,96	1,38	3,47	0,60	2,27	3,80
PGSC0003DMT400073722	1,27	0,87	0,65	4,20	3,44	2,93	0,93	3,52	3,79
PGSC0003DMT400065544	0,64	1,15	0,98	2,80	1,38	6,13	0,92	3,44	3,72
PGSC0003DMT400035609	1,59	0,87	0,00	1,40	1,72	5,87	0,82	3,00	3,65
PGSC0003DMT400043146	3,18	4,91	6,18	22,68	16,19	12,80	4,76	17,22	3,62
PGSC0003DMT400035284	0,64	1,44	1,30	4,48	3,10	4,53	1,13	4,04	3,58
PGSC0003DMT400066347	0,32	2,31	1,30	4,48	4,48	5,07	1,31	4,68	3,57
PGSC0003DMT400000613	6,04	7,22	9,11	27,43	13,09	38,92	7,46	26,48	3,55
PGSC0003DMT400052184	7,63	11,26	16,26	34,71	34,45	55,45	11,72	41,54	3,55
PGSC0003DMT400001184	0,95	0,58	0,65	2,80	1,72	3,20	0,73	2,57	3,54
PGSC0003DMT400048241	3,18	0,58	2,93	8,68	6,20	8,80	2,23	7,89	3,54
PGSC0003DMT400011266	0,32	1,44	0,33	1,96	2,76	2,67	0,70	2,46	3,54
PGSC0003DMT400000430	5,72	5,48	7,81	20,72	20,32	26,13	6,34	22,39	3,53
PGSC0003DMT400065346	1,27	1,15	1,30	4,76	1,38	6,93	1,24	4,36	3,51
PGSC0003DMT400049910	1,27	0,29	0,33	2,24	2,76	1,60	0,63	2,20	3,49
PGSC0003DMT400035387	0,95	0,29	0,98	2,52	1,72	3,47	0,74	2,57	3,47

PGSC0003DMT400008686	1,59	0,58	1,95	5,32	5,17	3,73	1,37	4,74	3,45
PGSC0003DMT400031740	1,27	1,15	0,33	3,92	1,03	4,53	0,92	3,16	3,45
PGSC0003DMT400042153	0,32	0,58	0,98	1,40	2,41	2,67	0,63	2,16	3,45
PGSC0003DMT400057191	5,40	4,62	4,88	11,76	10,68	28,79	4,97	17,08	3,44
PGSC0003DMT400065051	0,32	0,87	0,98	3,36	1,38	2,67	0,72	2,47	3,41
PGSC0003DMT400080936	1,91	2,89	1,63	4,48	6,20	11,20	2,14	7,29	3,40
PGSC0003DMT400074514	1,59	0,87	0,33	3,08	2,41	4,00	0,93	3,16	3,40
PGSC0003DMT400012346	2,54	2,02	1,63	5,32	5,86	9,86	2,06	7,01	3,40
PGSC0003DMT400030539	2,54	0,87	1,95	5,04	7,58	5,33	1,79	5,98	3,35
PGSC0003DMT400023953	4,45	4,91	6,50	14,56	18,95	19,46	5,29	17,66	3,34
PGSC0003DMT400084781	0,64	1,73	0,65	3,64	2,41	4,00	1,01	3,35	3,33
PGSC0003DMT400059525	7,31	4,33	4,23	16,52	13,78	22,39	5,29	17,56	3,32
PGSC0003DMT400079706	2,54	4,62	5,20	10,92	17,22	12,80	4,12	13,65	3,31
PGSC0003DMT400007788	1,27	2,89	2,28	10,36	5,17	5,60	2,15	7,04	3,28
PGSC0003DMT400042531	5,08	2,31	0,65	7,28	6,55	12,53	2,68	8,79	3,28
PGSC0003DMT400043468	1,59	2,02	0,65	3,64	5,51	4,80	1,42	4,65	3,27
PGSC0003DMT400057317	2,22	2,02	1,63	5,88	8,27	4,80	1,96	6,32	3,23
PGSC0003DMT400049589	0,64	1,44	1,30	4,20	2,41	4,27	1,13	3,63	3,22
PGSC0003DMT400083727	0,64	1,44	1,63	3,64	3,44	4,80	1,24	3,96	3,20
PGSC0003DMT400042780	0,64	1,44	0,98	2,24	4,82	2,67	1,02	3,24	3,18
PGSC0003DMT400080033	0,64	1,44	0,65	3,64	1,72	3,20	0,91	2,85	3,14
PGSC0003DMT400002569	0,00	1,44	1,95	4,48	2,41	3,73	1,13	3,54	3,13
PGSC0003DMT400051093	0,32	1,44	0,98	2,80	3,10	2,67	0,91	2,86	3,13
PGSC0003DMT400082079	6,99	6,64	3,25	14,56	6,55	31,46	5,63	17,52	3,11
PGSC0003DMT400030111	10,49	12,70	12,36	44,51	35,48	30,39	11,85	36,79	3,10
PGSC0003DMT400027525	1,27	0,29	1,63	3,36	3,79	2,67	1,06	3,27	3,08
PGSC0003DMT400037108	2,86	1,15	1,95	4,76	4,48	9,06	1,99	6,10	3,07
PGSC0003DMT400052684	0,95	1,73	0,33	3,36	2,41	3,47	1,00	3,08	3,07
PGSC0003DMT400057622	1,91	2,89	1,63	5,32	7,23	6,93	2,14	6,49	3,03



PGSC0003DMT400029758	8,26	4,04	3,25	11,48	13,09	22,13	5,18	15,57	3,00
PGSC0003DMT400025192	1,27	1,44	0,98	4,48	5,17	1,33	1,23	3,66	2,98
PGSC0003DMT400055257	2,22	2,60	1,95	3,64	3,10	13,33	2,26	6,69	2,96
PGSC0003DMT400021403	1,91	1,73	0,33	2,52	4,13	5,07	1,32	3,91	2,95
PGSC0003DMT400079821	0,32	1,15	1,63	3,08	3,10	2,93	1,03	3,04	2,94
PGSC0003DMT400049166	4,45	2,02	1,30	6,72	5,86	10,13	2,59	7,57	2,92
PGSC0003DMT400011522	9,85	6,64	2,60	12,04	15,50	27,73	6,36	18,42	2,90
PGSC0003DMT400004951	2,54	3,18	1,63	7,00	5,17	8,80	2,45	6,99	2,85
PGSC0003DMT400032141	0,95	0,87	0,98	2,24	2,76	2,93	0,93	2,64	2,83
PGSC0003DMT400019959	1,27	1,15	0,65	2,24	2,41	4,00	1,02	2,88	2,82
PGSC0003DMT400051848	2,22	2,31	2,28	5,88	6,55	6,66	2,27	6,36	2,80
PGSC0003DMT400045323	1,27	1,44	2,28	5,60	4,82	3,47	1,66	4,63	2,78
PGSC0003DMT400038562	1,27	1,15	1,30	3,08	3,79	3,47	1,24	3,45	2,78
PGSC0003DMT400048222	4,13	5,48	6,50	12,88	15,85	16,00	5,37	14,91	2,78
PGSC0003DMT400013094	3,81	5,20	1,95	6,72	4,48	19,20	3,65	10,13	2,77
PGSC0003DMT400033871	3,18	6,93	3,90	17,36	9,99	11,46	4,67	12,94	2,77
PGSC0003DMT400020777	3,81	3,75	4,23	9,80	10,33	12,53	3,93	10,89	2,77
PGSC0003DMT400008751	8,58	4,33	5,53	16,24	11,71	22,13	6,15	16,69	2,72
PGSC0003DMT400080811	1,91	2,89	2,60	6,16	7,58	6,13	2,47	6,62	2,69
PGSC0003DMT400054207	2,86	2,60	3,25	7,56	7,23	8,53	2,90	7,77	2,68
PGSC0003DMT400053338	2,22	4,04	0,33	4,20	3,79	9,60	2,20	5,86	2,67
PGSC0003DMT400042959	4,13	4,33	2,28	6,44	11,02	11,20	3,58	9,55	2,67
PGSC0003DMT400056255	4,77	6,06	4,88	15,40	12,75	13,60	5,24	13,92	2,66
PGSC0003DMT400057821	2,86	1,44	2,93	5,88	5,86	7,46	2,41	6,40	2,66
PGSC0003DMT400048101	2,22	1,44	3,58	5,60	6,89	6,66	2,41	6,38	2,65
PGSC0003DMT400011776	6,35	4,62	8,78	14,84	14,47	22,66	6,58	17,32	2,63
PGSC0003DMT400002220	2,54	2,60	2,60	4,76	6,89	8,53	2,58	6,73	2,61
PGSC0003DMT400029506	4,45	4,62	3,90	9,52	10,68	13,60	4,32	11,27	2,61
PGSC0003DMT400060978	11,76	9,53	10,41	22,96	27,21	31,99	10,57	27,39	2,59

PGSC0003DMT400074952	4,45	6,64	1,95	8,40	12,75	12,53	4,35	11,23	2,58
PGSC0003DMT400071701	2,22	1,73	2,93	4,20	4,48	9,06	2,29	5,91	2,58
PGSC0003DMT400047919	6,67	4,33	5,85	17,36	9,99	16,00	5,62	14,45	2,57
PGSC0003DMT400023517	13,34	19,63	21,79	59,91	48,92	31,73	18,25	46,85	2,57
PGSC0003DMT400012614	1,91	1,44	1,95	4,48	3,79	5,33	1,77	4,53	2,57
PGSC0003DMT400061912	4,13	3,46	3,58	10,64	7,58	10,40	3,72	9,54	2,56
PGSC0003DMT400077631	8,26	6,64	7,15	15,40	16,19	24,79	7,35	18,79	2,56
PGSC0003DMT400079573	3,50	3,75	2,28	9,52	6,55	8,26	3,18	8,11	2,55
PGSC0003DMT400012353	3,18	3,18	3,58	6,16	9,30	9,86	3,31	8,44	2,55
PGSC0003DMT400031529	2,22	2,60	3,90	7,28	7,92	6,93	2,91	7,38	2,54
PGSC0003DMT400021440	1,91	1,73	1,30	4,48	4,82	3,20	1,65	4,17	2,53
PGSC0003DMT400003474	8,26	9,24	7,48	15,40	19,64	27,99	8,33	21,01	2,52
PGSC0003DMT400078120	2,54	4,04	2,93	11,48	7,23	5,07	3,17	7,93	2,50
PGSC0003DMT400008352	4,13	4,62	6,18	11,48	17,22	8,53	4,98	12,41	2,49
PGSC0003DMT400018441	3,50	6,35	6,50	15,40	11,37	13,86	5,45	13,54	2,49
PGSC0003DMT400088400	2,86	3,75	2,93	6,44	8,96	8,26	3,18	7,89	2,48
PGSC0003DMT400001664	3,81	7,79	7,81	10,92	11,02	26,13	6,47	16,02	2,48
PGSC0003DMT400073355	4,77	6,93	4,55	15,68	14,12	10,40	5,42	13,40	2,47
PGSC0003DMT400070613	13,34	17,03	14,64	31,63	37,55	41,32	15,00	36,83	2,46
PGSC0003DMT400082752	1,91	1,73	4,23	7,28	7,23	4,80	2,62	6,44	2,45
PGSC0003DMT400081990	1,91	2,31	3,58	5,32	7,58	6,13	2,60	6,34	2,44
PGSC0003DMT400005250	6,04	4,33	5,20	5,32	13,09	19,46	5,19	12,62	2,43
PGSC0003DMT400047390	3,18	2,02	2,28	5,88	4,82	7,46	2,49	6,05	2,43
PGSC0003DMT400031731	20,02	18,48	15,61	47,87	53,74	29,59	18,04	43,73	2,42
PGSC0003DMT400080377	6,35	4,91	5,20	14,84	11,71	13,33	5,49	13,29	2,42
PGSC0003DMT400010250	2,54	1,15	1,30	4,20	4,13	3,73	1,66	4,02	2,42
PGSC0003DMT400063377	2,54	1,73	1,30	4,76	4,13	4,53	1,86	4,47	2,41
PGSC0003DMT400067527	3,18	4,04	2,93	9,80	8,61	5,87	3,38	8,09	2,39
PGSC0003DMT400045604	3,81	6,06	1,63	6,44	6,89	14,13	3,83	9,15	2,39

PGSC0003DMT400027199	10,49	10,10	7,48	15,12	16,88	34,92	9,36	22,31	2,38
PGSC0003DMT400014122	1,91	3,75	2,60	5,04	3,10	11,46	2,75	6,53	2,37
PGSC0003DMT400055877	0,95	2,89	2,60	5,60	3,44	6,13	2,15	5,06	2,36
PGSC0003DMT400001251	2,86	1,44	2,60	3,92	5,86	6,40	2,30	5,39	2,34
PGSC0003DMT400047521	3,18	3,18	2,60	6,44	7,58	6,93	2,99	6,98	2,34
PGSC0003DMT400010120	6,35	10,39	10,41	19,60	24,80	18,93	9,05	21,11	2,33
PGSC0003DMT400027749	1,91	1,44	2,93	5,04	5,86	3,73	2,09	4,88	2,33
PGSC0003DMT400043469	2,54	3,75	3,25	8,40	4,48	9,33	3,18	7,40	2,33
PGSC0003DMT400052190	4,13	3,75	5,20	8,68	11,37	10,40	4,36	10,15	2,33
PGSC0003DMT400042495	1,91	5,48	2,60	6,44	8,27	8,53	3,33	7,75	2,33
PGSC0003DMT400048298	0,64	4,04	3,58	7,28	5,51	6,40	2,75	6,40	2,32
PGSC0003DMT400075055	3,81	2,02	3,90	7,84	7,23	7,46	3,24	7,51	2,32
PGSC0003DMT400047041	2,22	5,48	3,58	9,52	8,27	8,26	3,76	8,68	2,31
PGSC0003DMT400092929	9,85	12,41	7,81	22,40	23,77	23,19	10,02	23,12	2,31
PGSC0003DMT400001183	4,77	7,22	5,53	12,60	14,47	13,33	5,84	13,47	2,31
PGSC0003DMT400059232	10,49	6,64	10,41	21,00	21,01	21,33	9,18	21,11	2,30
PGSC0003DMT400019729	8,26	8,08	9,11	19,60	24,46	14,40	8,48	19,49	2,30
PGSC0003DMT400005557	5,40	4,04	3,58	7,00	9,30	13,60	4,34	9,97	2,30
PGSC0003DMT400047299	10,80	5,77	3,90	17,08	9,65	20,26	6,82	15,66	2,30
PGSC0003DMT400017087	15,25	12,99	23,74	41,15	43,75	34,39	17,33	39,76	2,29
PGSC0003DMT400006502	6,35	6,06	4,88	9,80	12,75	17,06	5,76	13,20	2,29
PGSC0003DMT400083203	19,06	15,88	18,54	44,51	39,96	37,86	17,83	40,78	2,29
PGSC0003DMT400070218	19,70	15,30	10,08	27,43	32,73	42,92	15,03	34,36	2,29
PGSC0003DMT400058377	6,35	6,35	4,55	12,60	14,47	12,26	5,75	13,11	2,28
PGSC0003DMT400067341	4,77	4,91	6,83	13,16	10,68	13,60	5,50	12,48	2,27
PGSC0003DMT400014372	2,54	3,75	2,93	5,88	6,89	8,00	3,07	6,92	2,25
PGSC0003DMT400059202	3,81	2,89	2,93	6,72	8,27	6,66	3,21	7,22	2,25
PGSC0003DMT400043583	11,76	13,86	8,46	21,00	24,46	30,93	11,36	25,46	2,24
PGSC0003DMT400088045	3,50	4,04	5,20	10,64	10,68	7,20	4,25	9,51	2,24

PGSC0003DMT40000326	50,84	45,90	53,66	109,18	114,02	112,24	50,13	111,81	2,23
PGSC0003DMT400026382	2,54	0,87	4,55	6,16	5,86	5,60	2,65	5,87	2,21
PGSC0003DMT400069392	7,94	5,77	6,18	12,32	14,81	16,80	6,63	14,64	2,21
PGSC0003DMT400034908	11,12	15,88	18,86	30,51	34,10	35,99	15,29	33,53	2,19
PGSC0003DMT400083994	23,51	19,92	20,49	56,27	36,86	46,65	21,31	46,59	2,19
PGSC0003DMT400009299	3,18	2,60	1,95	5,04	5,17	6,66	2,58	5,62	2,18
PGSC0003DMT400065326	73,08	64,66	49,43	127,38	124,36	153,83	62,39	135,19	2,17
PGSC0003DMT400029126	7,94	9,53	12,68	21,00	24,11	19,99	10,05	21,70	2,16
PGSC0003DMT400039773	15,25	13,86	15,29	31,07	32,73	31,99	14,80	31,93	2,16
PGSC0003DMT400020102	1,91	2,60	3,90	5,32	4,48	8,26	2,80	6,02	2,15
PGSC0003DMT400070424	4,13	5,20	4,55	10,08	9,30	10,40	4,63	9,93	2,15
PGSC0003DMT400041346	3,50	2,89	3,90	5,04	9,30	7,73	3,43	7,36	2,14
PGSC0003DMT400023282	11,76	10,68	11,06	22,68	21,36	27,73	11,17	23,92	2,14
PGSC0003DMT400045907	10,80	14,15	12,36	33,59	24,46	21,59	12,44	26,55	2,13
PGSC0003DMT400069988	2,22	2,60	3,90	6,44	5,51	6,66	2,91	6,20	2,13
PGSC0003DMT400076776	2,86	6,93	3,58	10,64	7,23	10,66	4,46	9,51	2,13
PGSC0003DMT400000135	6,04	4,91	3,90	9,52	8,27	13,86	4,95	10,55	2,13
PGSC0003DMT400084203	15,89	10,97	15,29	29,95	30,66	28,53	14,05	29,71	2,11
PGSC0003DMT400065635	2,54	5,20	3,25	7,84	8,27	6,93	3,66	7,68	2,10
PGSC0003DMT400072628	1,91	4,04	5,85	6,16	8,96	9,60	3,93	8,24	2,09
PGSC0003DMT400068829	70,54	86,31	99,52	179,73	206,69	149,29	85,46	178,57	2,09
PGSC0003DMT400048879	7,63	11,26	4,55	15,96	16,19	16,80	7,81	16,32	2,09
PGSC0003DMT400030402	13,34	17,61	22,44	27,71	24,46	59,18	17,80	37,12	2,09
PGSC0003DMT400040083	2,22	2,31	5,20	5,60	5,51	9,06	3,24	6,72	2,07
PGSC0003DMT400004283	4,77	4,91	6,83	10,36	12,40	11,46	5,50	11,41	2,07
PGSC0003DMT400072322	14,93	14,43	18,21	36,11	29,63	32,79	15,86	32,84	2,07
PGSC0003DMT400039289	8,26	6,35	6,83	14,00	21,01	9,33	7,15	14,78	2,07
PGSC0003DMT400027230	2,54	3,18	3,25	7,28	6,20	5,07	2,99	6,18	2,07
PGSC0003DMT400033829	7,63	9,24	12,36	17,64	20,32	22,39	9,74	20,12	2,06

PGSC0003DMT400058792	10,17	6,93	6,50	18,20	12,75	17,60	7,87	16,18	2,06
PGSC0003DMT400071565	26,05	18,19	14,64	40,31	41,34	39,46	19,63	40,37	2,06
PGSC0003DMT400068527	9,85	11,55	14,31	21,00	24,46	27,99	11,90	24,48	2,06
PGSC0003DMT400070357	6,35	6,06	4,88	12,04	10,68	12,80	5,76	11,84	2,05
PGSC0003DMT400005230	6,04	3,18	3,58	8,12	7,23	10,93	4,27	8,76	2,05
PGSC0003DMT400084231	2,86	2,02	3,25	4,20	6,89	5,60	2,71	5,56	2,05
PGSC0003DMT400044334	13,98	11,84	12,68	25,20	27,21	26,39	12,83	26,27	2,05
PGSC0003DMT400046993	2,86	4,62	4,55	9,24	7,58	7,73	4,01	8,18	2,04
PGSC0003DMT400003181	6,67	8,95	9,76	15,12	21,01	15,46	8,46	17,20	2,03
PGSC0003DMT400052072	16,52	15,30	15,94	30,51	28,25	38,12	15,92	32,29	2,03
PGSC0003DMT400052577	2,54	2,31	3,25	5,32	5,51	5,60	2,70	5,48	2,03
PGSC0003DMT400048249	10,49	4,62	7,48	16,80	15,16	13,86	7,53	15,27	2,03
PGSC0003DMT400016886	3,81	6,35	5,20	10,08	11,37	9,60	5,12	10,35	2,02
PGSC0003DMT400061480	24,15	18,48	7,81	24,64	28,59	48,52	16,81	33,92	2,02
PGSC0003DMT400088995	3,50	3,75	4,23	5,04	9,30	8,80	3,83	7,71	2,02
PGSC0003DMT400051598	3,81	3,75	1,95	7,28	4,13	7,73	3,17	6,38	2,01
PGSC0003DMT400045498	12,39	15,88	10,08	23,24	26,87	26,93	12,78	25,68	2,01
PGSC0003DMT400044098	29,55	32,62	33,82	72,23	56,15	64,25	32,00	64,21	2,01
PGSC0003DMT400051089	6,67	8,95	5,20	13,44	12,75	15,46	6,94	13,88	2,00
PGSC0003DMT400033082	32,41	31,75	26,02	61,03	56,15	63,18	30,06	60,12	2,00
PGSC0003DMT400009319	12,71	17,03	15,29	32,19	27,90	29,86	15,01	29,98	2,00
PGSC0003DMT400083978	12,07	12,70	11,71	22,68	21,36	28,79	12,16	24,28	2,00
PGSC0003DMT400026368	9,21	6,35	4,55	15,68	9,99	14,40	6,70	13,36	1,99
PGSC0003DMT400018299	13,98	14,72	11,06	24,92	26,18	27,99	13,25	26,36	1,99
PGSC0003DMT400017515	4,77	8,37	11,71	14,84	17,22	17,33	8,28	16,46	1,99
PGSC0003DMT400050740	4,13	4,04	4,55	8,96	7,23	9,06	4,24	8,42	1,99
PGSC0003DMT400091740	8,58	8,37	9,11	14,84	11,02	25,86	8,69	17,24	1,98
PGSC0003DMT400014229	6,35	7,79	7,15	12,32	12,06	17,86	7,10	14,08	1,98
PGSC0003DMT400001073	20,33	15,59	17,24	33,87	32,04	39,46	17,72	35,12	1,98

PGSC0003DMT400062283	3,81	4,91	4,55	6,72	11,02	8,53	4,42	8,76	1,98
PGSC0003DMT400011772	10,80	17,61	13,33	23,80	33,76	25,06	13,91	27,54	1,98
PGSC0003DMT400041670	6,99	3,75	3,90	10,08	6,89	12,00	4,88	9,66	1,98
PGSC0003DMT400031181	9,21	10,10	4,55	17,08	14,12	16,00	7,95	15,73	1,98
PGSC0003DMT400085629	6,99	6,35	5,85	12,32	13,09	12,53	6,40	12,65	1,98
PGSC0003DMT400012963	24,78	21,07	18,54	36,67	40,99	49,59	21,46	42,42	1,98
PGSC0003DMT400033077	5,08	4,91	4,55	8,68	10,68	9,33	4,85	9,56	1,97
PGSC0003DMT400081309	20,97	15,59	13,66	29,11	31,00	38,66	16,74	32,92	1,97
PGSC0003DMT400023089	9,85	9,53	7,48	18,76	15,85	18,13	8,95	17,58	1,96
PGSC0003DMT400027905	17,16	21,07	25,04	36,11	51,33	36,79	21,09	41,41	1,96
PGSC0003DMT400083071	19,38	18,19	21,79	36,39	39,61	40,52	19,79	38,84	1,96
PGSC0003DMT400028536	4,77	3,75	4,88	7,84	10,68	7,73	4,47	8,75	1,96
PGSC0003DMT400080247	18,75	12,41	8,78	28,27	21,70	28,26	13,31	26,08	1,96
PGSC0003DMT400008142	5,08	4,91	6,18	10,64	10,33	10,66	5,39	10,54	1,96
PGSC0003DMT400079005	5,08	3,18	3,25	7,84	8,27	6,40	3,84	7,50	1,96
PGSC0003DMT400015693	6,04	10,39	8,13	16,80	13,78	17,33	8,19	15,97	1,95
PGSC0003DMT400064264	21,61	25,40	26,34	43,39	51,67	47,99	24,45	47,68	1,95
PGSC0003DMT400039464	4,77	4,33	3,25	5,60	11,02	7,46	4,12	8,03	1,95
PGSC0003DMT400045838	5,72	4,33	5,20	11,20	9,99	8,53	5,08	9,91	1,95
PGSC0003DMT400029962	14,62	7,51	11,06	19,04	23,42	22,13	11,06	21,53	1,95
PGSC0003DMT400030878	10,17	11,26	10,41	18,20	22,39	21,33	10,61	20,64	1,94
PGSC0003DMT400015048	2,22	4,33	4,23	9,52	4,48	6,93	3,59	6,98	1,94
PGSC0003DMT400063804	8,58	8,37	11,71	16,52	17,57	21,33	9,55	18,47	1,93
PGSC0003DMT400048386	9,21	12,12	12,68	20,72	23,42	21,59	11,34	21,91	1,93
PGSC0003DMT400062019	14,30	7,79	8,78	11,76	19,64	28,26	10,29	19,89	1,93
PGSC0003DMT400025655	4,13	6,64	4,88	9,24	11,37	9,60	5,22	10,07	1,93
PGSC0003DMT400042364	11,44	12,41	12,03	22,68	27,56	18,66	11,96	22,97	1,92
PGSC0003DMT400046228	11,12	10,39	13,98	23,24	24,11	20,79	11,83	22,71	1,92
PGSC0003DMT400018508	3,50	4,04	4,23	8,96	7,23	6,40	3,92	7,53	1,92

PGSC0003DMT400009462	18,43	13,86	14,31	24,64	33,76	30,93	15,53	29,78	1,92
PGSC0003DMT400000488	36,86	27,42	36,43	63,27	66,83	61,85	33,57	63,98	1,91
PGSC0003DMT400009621	41,94	48,50	67,97	97,14	93,01	111,70	52,80	100,62	1,91
PGSC0003DMT400077052	18,75	9,24	16,59	27,43	24,11	33,32	14,86	28,29	1,90
PGSC0003DMT400079324	4,13	2,89	4,23	8,40	6,55	6,40	3,75	7,12	1,90
PGSC0003DMT400002546	17,48	21,65	16,26	36,11	32,73	36,26	18,46	35,03	1,90
PGSC0003DMT400050177	49,25	45,61	39,68	85,10	79,57	90,11	44,85	84,93	1,89
PGSC0003DMT400050070	6,67	10,10	6,18	16,24	11,71	15,46	7,65	14,47	1,89
PGSC0003DMT400040371	8,90	7,22	8,13	14,00	13,43	18,40	8,08	15,28	1,89
PGSC0003DMT400030796	13,34	8,37	10,73	17,36	19,64	24,26	10,81	20,42	1,89
PGSC0003DMT400008902	30,18	32,04	33,17	55,99	60,28	63,72	31,80	60,00	1,89
PGSC0003DMT400012517	2,54	4,04	4,23	5,88	5,17	9,33	3,60	6,79	1,89
PGSC0003DMT400038838	9,53	7,51	7,48	17,36	13,09	15,73	8,17	15,39	1,88
PGSC0003DMT400022696	6,67	4,91	8,13	12,32	11,71	13,06	6,57	12,36	1,88
PGSC0003DMT400008404	109,30	115,76	107,32	201,28	228,73	194,88	110,79	208,30	1,88
PGSC0003DMT400018697	6,67	6,06	5,20	10,08	8,96	14,66	5,98	11,23	1,88
PGSC0003DMT400001255	20,02	19,34	24,07	38,35	37,89	42,92	21,14	39,72	1,88
PGSC0003DMT400002414	4,77	6,64	4,55	6,16	12,06	11,73	5,32	9,98	1,88
PGSC0003DMT400073888	29,55	28,29	30,90	54,31	57,18	54,92	29,58	55,47	1,88
PGSC0003DMT400004934	6,35	4,91	7,15	10,92	12,40	11,20	6,14	11,51	1,88
PGSC0003DMT400044981	5,40	5,48	4,55	8,96	9,30	10,66	5,14	9,64	1,87
PGSC0003DMT400008519	9,21	7,51	7,15	15,68	14,47	14,40	7,96	14,85	1,87
PGSC0003DMT400047370	18,43	15,59	18,21	34,15	28,25	34,92	17,41	32,44	1,86
PGSC0003DMT400075590	5,72	5,20	5,85	13,16	8,96	9,06	5,59	10,39	1,86
PGSC0003DMT400062178	3,81	3,75	6,18	6,16	7,92	11,46	4,58	8,51	1,86
PGSC0003DMT400063965	9,85	9,53	11,71	16,52	19,29	21,86	10,36	19,22	1,85
PGSC0003DMT400051929	12,07	12,70	15,29	19,04	26,18	28,79	13,35	24,67	1,85
PGSC0003DMT400036399	27,96	22,81	15,61	33,03	21,70	67,72	22,13	40,82	1,84
PGSC0003DMT400065431	16,84	9,24	8,46	21,84	16,19	25,59	11,51	21,21	1,84

PGSC0003DMT40003415	3,18	5,20	4,88	7,84	7,23	9,33	4,42	8,13	1,84
PGSC0003DMT400046817	6,35	5,77	7,48	12,04	13,09	10,93	6,53	12,02	1,84
PGSC0003DMT400026065	25,42	26,27	21,14	40,87	45,82	47,19	24,28	44,63	1,84
PGSC0003DMT400016682	2,22	4,91	5,20	8,40	7,23	6,93	4,11	7,52	1,83
PGSC0003DMT400058309	4,77	3,75	4,55	7,00	7,58	9,33	4,36	7,97	1,83
PGSC0003DMT400079262	7,31	4,62	3,25	10,08	8,61	9,06	5,06	9,25	1,83
PGSC0003DMT400010685	81,66	73,32	98,22	135,50	195,66	131,70	84,40	154,29	1,83
PGSC0003DMT400033057	7,63	5,20	5,20	8,96	11,71	12,26	6,01	10,98	1,83
PGSC0003DMT400003006	4,77	4,62	5,85	10,36	7,58	9,86	5,08	9,27	1,82
PGSC0003DMT400089256	6,35	6,35	5,20	8,68	11,71	12,26	5,97	10,88	1,82
PGSC0003DMT400077629	4,45	7,22	3,25	10,08	6,20	10,93	4,97	9,07	1,82
PGSC0003DMT400090439	6,04	4,91	7,48	10,92	13,09	9,60	6,14	11,20	1,82
PGSC0003DMT400003387	7,31	7,51	11,06	16,80	17,57	12,80	8,63	15,72	1,82
PGSC0003DMT400051349	9,53	9,24	7,15	16,52	12,06	18,66	8,64	15,75	1,82
PGSC0003DMT400071599	14,30	16,17	14,64	29,95	24,80	27,46	15,04	27,40	1,82
PGSC0003DMT400030694	5,72	5,20	6,83	11,20	10,68	10,40	5,92	10,76	1,82
PGSC0003DMT400041875	31,77	33,78	35,12	66,63	56,84	59,18	33,56	60,88	1,81
PGSC0003DMT400052737	15,57	11,55	12,36	22,68	25,49	23,46	13,16	23,88	1,81
PGSC0003DMT400088816	10,49	8,37	11,38	21,00	17,57	16,26	10,08	18,28	1,81
PGSC0003DMT400027073	3,81	4,33	6,50	8,12	8,27	10,13	4,88	8,84	1,81
PGSC0003DMT400029874	10,80	13,28	13,98	19,88	24,46	24,53	12,69	22,96	1,81
PGSC0003DMT400091248	2,86	5,20	3,90	8,12	7,92	5,60	3,99	7,21	1,81
PGSC0003DMT400096652	6,99	14,15	14,31	21,00	26,87	16,26	11,82	21,38	1,81
PGSC0003DMT400047220	33,04	36,66	44,23	68,03	76,13	61,85	37,98	68,67	1,81
PGSC0003DMT400078809	12,39	14,43	6,83	20,44	16,88	23,46	11,22	20,26	1,81
PGSC0003DMT400049657	27,64	23,38	28,94	44,51	50,98	48,79	26,65	48,09	1,80
PGSC0003DMT400002573	20,65	23,67	23,09	34,15	46,16	41,32	22,47	40,54	1,80
PGSC0003DMT400026068	23,51	18,19	18,86	38,63	32,73	37,86	20,19	36,41	1,80
PGSC0003DMT400055405	6,67	4,33	4,55	9,80	11,02	7,20	5,18	9,34	1,80



PGSC0003DMT400050448	26,69	26,85	28,62	55,71	44,09	47,99	27,39	49,26	1,80
PGSC0003DMT400082117	7,94	8,08	8,13	14,00	13,43	16,00	8,05	14,48	1,80
PGSC0003DMT400007742	77,84	73,03	77,08	132,70	152,26	124,50	75,98	136,49	1,80
PGSC0003DMT400070622	12,71	10,10	16,26	22,68	24,80	22,66	13,02	23,38	1,80
PGSC0003DMT400016133	6,35	6,35	8,13	10,08	14,47	12,80	6,94	12,45	1,79
PGSC0003DMT400019156	13,03	14,72	14,64	25,48	26,52	23,99	14,13	25,33	1,79
PGSC0003DMT400003403	4,45	5,20	6,83	7,84	11,02	10,66	5,49	9,84	1,79
PGSC0003DMT400052889	10,80	12,12	10,41	18,76	18,95	21,86	11,11	19,86	1,79
PGSC0003DMT400058374	13,34	6,35	7,15	14,84	17,91	15,20	8,95	15,98	1,79
PGSC0003DMT400079446	30,82	37,82	37,73	57,95	58,22	73,85	35,46	63,34	1,79
PGSC0003DMT400049601	6,67	5,20	8,13	11,20	11,71	12,80	6,67	11,90	1,79
PGSC0003DMT400004714	13,98	11,26	13,98	22,12	23,08	24,79	13,07	23,33	1,78
PGSC0003DMT400018279	8,90	9,24	7,81	16,80	11,37	18,13	8,65	15,43	1,78
PGSC0003DMT400011387	8,58	5,77	6,50	12,32	12,06	12,80	6,95	12,39	1,78
PGSC0003DMT400050582	10,17	8,66	7,48	14,00	15,85	17,06	8,77	15,64	1,78
PGSC0003DMT400053098	6,04	6,64	8,78	11,20	13,43	13,60	7,15	12,74	1,78
PGSC0003DMT400057060	21,61	19,92	17,24	34,15	35,83	34,66	19,59	34,88	1,78
PGSC0003DMT400020641	19,38	20,21	15,94	32,19	34,10	32,52	18,51	32,94	1,78
PGSC0003DMT400011283	6,99	9,53	6,50	13,44	14,12	13,33	7,67	13,63	1,78
PGSC0003DMT400040809	8,90	7,51	8,78	13,72	14,47	16,53	8,40	14,91	1,78
PGSC0003DMT400017823	17,79	19,92	15,61	34,15	28,59	31,73	17,77	31,49	1,77
PGSC0003DMT400004251	27,01	23,96	16,91	44,23	30,66	45,32	22,63	40,07	1,77
PGSC0003DMT400019781	28,91	22,23	26,34	45,63	48,92	42,39	25,83	45,65	1,77
PGSC0003DMT400028324	11,12	19,05	15,94	23,52	31,00	26,93	15,37	27,15	1,77
PGSC0003DMT400009868	7,94	6,93	6,50	12,32	12,06	13,33	7,12	12,57	1,76
PGSC0003DMT400045507	6,04	4,33	6,50	8,12	10,68	10,93	5,62	9,91	1,76
PGSC0003DMT400065486	6,04	7,22	8,13	14,56	10,33	12,80	7,13	12,56	1,76
PGSC0003DMT400073833	14,62	14,15	10,73	25,48	22,74	21,33	13,17	23,18	1,76
PGSC0003DMT400036825	9,85	12,12	9,76	18,48	17,57	19,73	10,58	18,59	1,76

PGSC0003DMT400024160	30,82	31,18	25,69	51,79	50,64	51,72	29,23	51,38	1,76
PGSC0003DMT400014342	8,90	8,08	7,15	13,72	12,06	16,53	8,04	14,10	1,75
PGSC0003DMT400048985	8,26	5,48	5,53	9,80	12,75	11,20	6,42	11,25	1,75
PGSC0003DMT400037507	6,35	6,35	6,18	10,08	9,65	13,33	6,29	11,02	1,75
PGSC0003DMT400048145	51,47	56,00	59,84	94,62	100,24	97,57	55,77	97,48	1,75
PGSC0003DMT400002189	8,90	8,37	8,13	12,32	15,50	16,53	8,47	14,78	1,75
PGSC0003DMT400066504	17,79	24,25	30,25	38,63	46,50	41,06	24,10	42,06	1,75
PGSC0003DMT400010943	18,11	15,88	17,24	24,92	34,10	30,39	17,08	29,80	1,75
PGSC0003DMT400016146	26,37	30,89	25,37	43,39	45,82	54,92	27,54	48,04	1,74
PGSC0003DMT400023662	14,62	13,86	14,64	21,84	27,21	26,13	14,37	25,06	1,74
PGSC0003DMT400045992	15,89	12,70	14,64	24,92	23,77	26,66	14,41	25,12	1,74
PGSC0003DMT400047273	44,80	43,88	45,21	76,15	83,71	73,31	44,63	77,72	1,74
PGSC0003DMT400041444	7,94	6,06	5,53	14,28	8,27	11,46	6,51	11,34	1,74
PGSC0003DMT400003292	5,08	4,33	5,85	8,96	10,68	6,93	5,09	8,86	1,74
PGSC0003DMT400078042	15,57	15,30	16,26	27,15	28,25	26,66	15,71	27,35	1,74
PGSC0003DMT400016171	23,83	21,36	25,37	32,47	35,14	55,19	23,52	40,93	1,74
PGSC0003DMT400053351	25,10	20,78	23,74	40,59	39,61	40,79	23,21	40,33	1,74
PGSC0003DMT400071036	6,67	7,22	11,38	15,12	16,19	12,53	8,42	14,61	1,73
PGSC0003DMT400032575	7,31	9,24	11,38	14,28	21,36	12,80	9,31	16,15	1,73
PGSC0003DMT400053754	7,94	7,79	7,48	12,32	11,37	16,53	7,74	13,41	1,73
PGSC0003DMT400004493	7,31	8,37	6,18	11,76	11,71	14,40	7,29	12,62	1,73
PGSC0003DMT400003000	7,94	6,64	5,53	14,84	9,30	10,66	6,70	11,60	1,73
PGSC0003DMT400060605	15,57	22,81	18,86	34,99	26,18	37,86	19,08	33,01	1,73
PGSC0003DMT400000842	11,12	11,55	8,46	17,08	14,81	21,86	10,38	17,92	1,73
PGSC0003DMT400065485	23,83	20,21	21,79	47,31	30,31	35,99	21,94	37,87	1,73
PGSC0003DMT400046393	6,35	4,91	5,85	9,24	10,68	9,60	5,70	9,84	1,73
PGSC0003DMT400018676	7,63	8,37	8,13	14,28	12,40	14,93	8,04	13,87	1,72
PGSC0003DMT400075363	10,17	8,08	6,83	15,68	13,43	14,13	8,36	14,41	1,72
PGSC0003DMT400006861	7,63	4,62	4,23	10,92	8,96	8,53	5,49	9,47	1,72

PGSC0003DMT400029492	9,53	13,57	13,33	21,84	16,88	23,99	12,14	20,90	1,72
PGSC0003DMT400036639	20,02	19,92	18,21	36,67	31,35	31,99	19,38	33,34	1,72
PGSC0003DMT400018405	34,95	36,95	36,75	61,31	65,45	59,98	36,22	62,25	1,72
PGSC0003DMT400018343	5,72	5,48	6,50	9,80	11,02	9,60	5,90	10,14	1,72
PGSC0003DMT400063679	28,28	29,73	25,37	47,03	43,75	52,52	27,79	47,77	1,72
PGSC0003DMT400037651	7,63	10,39	12,03	19,88	18,95	12,80	10,02	17,21	1,72
PGSC0003DMT400056988	9,85	14,15	13,98	22,96	20,32	21,86	12,66	21,71	1,72
PGSC0003DMT400075243	7,31	7,79	10,41	13,72	14,81	15,20	8,50	14,58	1,71
PGSC0003DMT400038392	16,52	16,74	12,68	24,36	28,25	26,13	15,31	26,25	1,71
PGSC0003DMT400061873	26,05	25,98	23,09	35,27	43,75	49,59	25,04	42,87	1,71
PGSC0003DMT400012867	42,26	40,70	40,33	62,43	68,21	79,98	41,10	70,21	1,71
PGSC0003DMT400073404	12,39	16,74	13,98	24,36	24,46	24,79	14,37	24,54	1,71
PGSC0003DMT400075416	8,26	6,06	7,81	9,80	14,12	13,86	7,38	12,59	1,71
PGSC0003DMT400016087	12,07	9,81	12,03	21,28	18,95	17,60	11,30	19,28	1,71
PGSC0003DMT400028050	11,76	9,53	12,68	15,40	22,74	19,73	11,32	19,29	1,70
PGSC0003DMT400046653	6,99	11,84	8,78	15,40	14,81	16,80	9,20	15,67	1,70
PGSC0003DMT400026671	7,94	10,39	9,43	15,40	15,85	16,00	9,25	15,75	1,70
PGSC0003DMT400059346	6,99	5,48	4,88	11,20	10,33	8,00	5,78	9,84	1,70
PGSC0003DMT400024848	5,08	8,08	7,48	11,48	13,78	9,86	6,88	11,71	1,70
PGSC0003DMT400025985	36,86	45,61	45,53	76,99	76,47	64,25	42,67	72,57	1,70
PGSC0003DMT400038758	11,76	14,15	12,68	19,60	23,08	22,93	12,86	21,87	1,70
PGSC0003DMT400045906	16,20	19,34	17,24	36,95	30,31	22,39	17,59	29,88	1,70
PGSC0003DMT400039638	7,31	6,06	9,11	12,88	11,37	13,86	7,49	12,70	1,70
PGSC0003DMT400033053	5,40	7,22	4,88	10,08	7,58	12,00	5,83	9,89	1,69
PGSC0003DMT400071770	134,40	110,56	139,85	230,40	244,92	175,69	128,27	217,00	1,69
PGSC0003DMT400033079	13,98	10,39	12,36	21,56	19,98	20,53	12,24	20,69	1,69
PGSC0003DMT400047580	25,42	28,58	23,42	45,07	41,68	43,99	25,81	43,58	1,69
PGSC0003DMT400077282	6,99	5,48	8,78	12,60	9,65	13,60	7,08	11,95	1,69
PGSC0003DMT400004106	4,13	6,64	5,85	9,80	8,61	9,60	5,54	9,34	1,69

PGSC0003DMT400069320	16,52	18,76	21,79	37,79	31,35	26,93	19,02	32,02	1,68
PGSC0003DMT400011860	13,03	13,57	17,56	21,84	26,87	25,59	14,72	24,77	1,68
PGSC0003DMT400020271	34,63	27,42	33,82	56,55	51,67	53,05	31,96	53,76	1,68
PGSC0003DMT400029673	27,64	20,78	21,14	35,83	35,83	45,32	23,19	38,99	1,68
PGSC0003DMT400037664	10,17	10,97	7,48	14,00	17,57	16,53	9,54	16,03	1,68
PGSC0003DMT400041103	7,31	8,37	9,76	13,16	14,12	15,46	8,48	14,25	1,68
PGSC0003DMT400024688	8,90	11,26	7,15	19,04	11,37	15,46	9,10	15,29	1,68
PGSC0003DMT400071977	21,92	13,86	21,79	29,39	33,41	33,86	19,19	32,22	1,68
PGSC0003DMT400001250	9,53	9,24	11,38	16,80	14,81	18,93	10,05	16,85	1,68
PGSC0003DMT400069526	15,57	9,81	14,96	19,04	26,18	22,39	13,45	22,54	1,68
PGSC0003DMT400055111	8,90	8,37	7,81	15,12	15,16	11,73	8,36	14,00	1,68
PGSC0003DMT400056767	49,88	53,12	33,17	67,75	66,14	94,11	45,39	76,00	1,67
PGSC0003DMT400030976	66,09	82,27	74,48	128,22	129,87	114,90	74,28	124,33	1,67
PGSC0003DMT400042013	7,94	8,08	9,76	12,88	13,43	16,80	8,59	14,37	1,67
PGSC0003DMT400006783	8,26	12,12	11,71	20,16	17,22	16,26	10,70	17,88	1,67
PGSC0003DMT400014307	16,52	11,84	12,03	21,56	20,32	25,59	13,46	22,49	1,67
PGSC0003DMT400074096	25,10	26,56	32,52	44,51	46,50	49,59	28,06	46,87	1,67
PGSC0003DMT400065090	37,49	37,82	40,33	64,39	64,76	63,98	38,55	64,38	1,67
PGSC0003DMT400076663	12,71	8,66	11,38	17,64	18,60	18,40	10,92	18,21	1,67
PGSC0003DMT400050302	11,44	10,39	10,73	15,68	19,98	18,66	10,85	18,11	1,67
PGSC0003DMT400037420	14,62	14,15	15,61	22,68	28,94	22,39	14,79	24,67	1,67
PGSC0003DMT400003380	18,11	19,63	17,24	26,32	32,04	33,32	18,33	30,56	1,67
PGSC0003DMT400063026	22,56	28,58	25,04	39,47	46,16	41,32	25,39	42,32	1,67
PGSC0003DMT400040413	14,62	11,55	15,29	22,68	22,39	23,99	13,82	23,02	1,67
PGSC0003DMT400007072	6,67	5,77	8,78	12,88	12,06	10,40	7,07	11,78	1,67
PGSC0003DMT400048982	9,85	9,81	7,81	15,12	15,16	15,46	9,16	15,25	1,67
PGSC0003DMT400069883	5,40	6,93	6,50	8,96	9,30	13,06	6,28	10,44	1,66
PGSC0003DMT400000215	11,44	12,41	14,64	21,28	22,74	19,99	12,83	21,34	1,66
PGSC0003DMT400009189	29,55	27,14	19,84	34,99	37,89	54,39	25,51	42,42	1,66

PGSC0003DMT400030174	16,84	19,92	18,21	30,23	33,07	27,99	18,32	30,43	1,66
PGSC0003DMT400048358	14,93	12,41	10,08	21,28	20,32	20,53	12,47	20,71	1,66
PGSC0003DMT400049998	27,64	26,27	37,73	53,19	52,02	46,92	30,55	50,71	1,66
PGSC0003DMT400038321	12,39	11,26	10,73	21,28	18,95	16,80	11,46	19,01	1,66
PGSC0003DMT400053373	14,30	11,84	18,21	15,96	23,42	34,12	14,78	24,50	1,66
PGSC0003DMT400030288	9,21	7,22	8,46	13,44	14,47	13,33	8,30	13,75	1,66
PGSC0003DMT400060913	40,67	28,87	33,17	55,71	58,91	55,45	34,24	56,69	1,66
PGSC0003DMT400029039	7,31	8,37	5,85	12,60	11,02	12,00	7,18	11,87	1,65
PGSC0003DMT400076743	36,86	33,78	25,37	52,35	50,64	55,72	32,00	52,90	1,65
PGSC0003DMT400017518	21,92	29,73	26,34	44,23	45,13	39,46	26,00	42,94	1,65
PGSC0003DMT400065532	15,89	17,90	18,21	27,71	27,21	30,93	17,33	28,62	1,65
PGSC0003DMT400016235	20,65	26,27	20,49	31,07	39,61	40,52	22,47	37,07	1,65
PGSC0003DMT400070375	26,05	21,94	22,12	39,47	40,99	35,19	23,37	38,55	1,65
PGSC0003DMT400010467	39,40	32,62	36,43	55,71	70,62	52,52	36,15	59,62	1,65
PGSC0003DMT400057840	54,01	63,51	41,63	84,26	77,16	101,04	53,05	87,49	1,65
PGSC0003DMT400006173	20,97	28,58	27,32	43,95	36,51	46,12	25,62	42,19	1,65
PGSC0003DMT400022195	6,67	7,51	9,43	13,44	11,02	14,40	7,87	12,95	1,65
PGSC0003DMT400066312	15,25	13,86	13,33	24,08	23,08	22,66	14,15	23,27	1,65
PGSC0003DMT400033014	44,16	40,70	28,62	62,43	56,84	67,18	37,83	62,15	1,64
PGSC0003DMT400057502	31,46	41,28	30,90	45,35	49,26	75,45	34,55	56,69	1,64
PGSC0003DMT400018483	18,11	17,03	21,79	28,83	33,41	30,93	18,98	31,06	1,64
PGSC0003DMT400022798	21,29	20,78	19,19	34,71	30,31	35,19	20,42	33,40	1,64
PGSC0003DMT400024691	15,89	18,76	12,68	32,19	21,36	23,73	15,78	25,76	1,63
PGSC0003DMT400031223	25,74	21,94	20,49	44,23	34,79	32,26	22,72	37,09	1,63
PGSC0003DMT400000436	16,84	16,45	15,29	24,64	22,39	32,26	16,19	26,43	1,63
PGSC0003DMT400071659	12,71	10,97	12,68	18,76	20,32	20,26	12,12	19,78	1,63
PGSC0003DMT400067003	58,46	61,78	58,21	97,98	98,52	94,64	59,48	97,05	1,63
PGSC0003DMT400050547	13,34	12,70	16,26	19,88	21,70	27,19	14,10	22,92	1,63
PGSC0003DMT400073513	12,71	12,99	11,71	21,28	14,81	24,53	12,47	20,21	1,62

PGSC0003DMT400035658	9,53	9,24	10,73	18,20	12,75	16,80	9,83	15,92	1,62
----------------------	------	------	-------	-------	-------	-------	------	-------	------

**Cuadro S3.7: Genes regulados negativamente en restricción hídrica expresados diferencialmente en plantas Spunta.**

Genes	Control (bien regado)			R. hídrica			spunta_100%	spunta_35%	ratio spunta
	Spunta C1	Spunta C2	Spunta C3	Spunta H1	Spunta H2	Spunta H3			
PGSC0003DMT400031088	32,09	32,04	32,20	20,44	21,70	20,26	32,11	20,80	0,65
PGSC0003DMT400000151	116,92	127,88	132,04	90,70	87,15	66,12	125,61	81,32	0,65
PGSC0003DMT400066175	27,32	32,91	20,16	13,44	18,60	19,99	26,80	17,34	0,65
PGSC0003DMT400065182	121,05	131,35	87,81	71,39	73,03	75,45	113,40	73,29	0,65
PGSC0003DMT400025701	40,67	45,90	54,31	27,99	35,83	27,19	46,96	30,34	0,65
PGSC0003DMT400007510	29,23	25,69	30,25	15,68	20,67	18,66	28,39	18,34	0,65
PGSC0003DMT400041983	52,11	58,60	54,96	37,23	34,79	34,92	55,22	35,65	0,65
PGSC0003DMT400012676	46,39	60,62	65,37	42,55	32,73	35,99	57,46	37,09	0,65
PGSC0003DMT400058107	87,06	64,09	81,96	48,71	49,95	51,72	77,70	50,13	0,65
PGSC0003DMT400019325	58,46	61,49	54,31	38,35	35,14	38,92	58,09	37,47	0,65
PGSC0003DMT400058939	98,18	88,91	87,49	58,23	59,94	58,92	91,53	59,03	0,64
PGSC0003DMT400055753	15,57	17,61	12,36	10,64	9,65	9,06	15,18	9,78	0,64
PGSC0003DMT400050474	223,36	226,90	222,13	143,33	137,79	151,69	224,13	144,27	0,64
PGSC0003DMT400043794	101,99	86,60	76,43	52,91	46,16	71,45	88,34	56,84	0,64
PGSC0003DMT400063542	48,93	53,98	73,50	41,43	39,27	32,79	58,80	37,83	0,64
PGSC0003DMT400014747	34,95	42,15	54,64	29,39	28,94	26,39	43,91	28,24	0,64
PGSC0003DMT400006218	34,63	45,61	44,88	27,99	25,49	26,93	41,71	26,80	0,64
PGSC0003DMT400003548	79,43	77,08	75,13	50,39	45,13	53,32	77,21	49,61	0,64
PGSC0003DMT400090902	29,55	34,35	32,85	22,96	18,26	20,79	32,25	20,67	0,64
PGSC0003DMT400059123	65,77	51,38	60,17	36,95	33,76	42,92	59,11	37,88	0,64
PGSC0003DMT400063955	71,49	65,24	52,04	38,63	43,06	39,19	62,92	40,29	0,64
PGSC0003DMT400059237	44,16	52,54	52,69	32,47	29,28	33,86	49,80	31,87	0,64
PGSC0003DMT400044278	30,18	25,98	33,82	20,16	19,98	17,33	29,99	19,16	0,64
PGSC0003DMT400017886	28,60	34,35	34,47	19,04	14,12	29,06	32,47	20,74	0,64
PGSC0003DMT400014742	60,69	47,92	45,86	33,87	28,25	36,52	51,49	32,88	0,64
PGSC0003DMT400006434	51,79	51,10	39,35	32,75	25,15	32,79	47,41	30,23	0,64

PGSC0003DMT400002887	23,19	38,68	50,41	25,48	19,64	26,39	37,43	23,84	0,64
PGSC0003DMT400017733	151,24	160,21	183,10	115,34	98,86	100,77	164,85	104,99	0,64
PGSC0003DMT400065837	31,77	38,39	45,21	30,51	25,84	17,06	38,46	24,47	0,64
PGSC0003DMT400062061	9,85	15,01	19,51	10,08	10,68	7,46	14,79	9,41	0,64
PGSC0003DMT400010453	16,84	19,34	17,89	12,60	7,92	13,86	18,02	11,46	0,64
PGSC0003DMT400012679	106,12	87,76	81,63	61,31	49,26	64,52	91,84	58,36	0,64
PGSC0003DMT400075091	133,13	123,26	100,82	62,99	82,67	81,31	119,07	75,66	0,64
PGSC0003DMT400021390	20,02	20,21	21,79	11,48	13,78	14,13	20,67	13,13	0,64
PGSC0003DMT400020546	63,23	63,80	63,74	37,79	35,14	47,99	63,59	40,31	0,63
PGSC0003DMT400082073	29,87	45,61	46,51	29,67	24,46	23,19	40,66	25,77	0,63
PGSC0003DMT400046513	38,13	41,57	46,51	28,27	25,84	25,86	42,07	26,66	0,63
PGSC0003DMT400076709	85,15	84,87	91,06	55,99	54,43	54,92	87,03	55,11	0,63
PGSC0003DMT400020662	13,98	15,30	22,44	9,80	13,09	9,86	17,24	10,92	0,63
PGSC0003DMT400024437	22,56	25,98	32,85	18,20	16,53	16,80	27,13	17,18	0,63
PGSC0003DMT400038519	43,85	54,27	61,14	39,75	35,14	25,86	53,09	33,58	0,63
PGSC0003DMT400037918	196,36	183,89	200,99	125,14	131,25	111,17	193,75	122,52	0,63
PGSC0003DMT400070474	39,08	46,48	51,06	35,83	20,67	29,86	45,54	28,79	0,63
PGSC0003DMT400009991	29,23	34,06	31,55	18,76	19,29	21,86	31,61	19,97	0,63
PGSC0003DMT400027015	17,48	19,05	26,34	11,48	15,16	13,06	20,96	13,23	0,63
PGSC0003DMT400076695	15,89	13,28	20,81	12,60	8,27	10,66	16,66	10,51	0,63
PGSC0003DMT400028964	18,75	19,63	19,51	11,48	11,71	13,33	19,30	12,17	0,63
PGSC0003DMT400078207	14,62	18,48	26,02	13,16	9,99	14,13	19,71	12,43	0,63
PGSC0003DMT400028648	27,01	32,62	26,67	16,24	15,50	22,66	28,77	18,13	0,63
PGSC0003DMT400064542	31,46	29,44	37,40	22,12	20,32	19,46	32,77	20,63	0,63
PGSC0003DMT400071314	25,10	38,97	40,00	19,88	19,98	25,59	34,69	21,82	0,63
PGSC0003DMT400017844	40,03	48,50	48,46	31,07	26,52	28,53	45,66	28,71	0,63
PGSC0003DMT400024493	36,86	51,67	60,17	39,19	27,90	26,39	49,57	31,16	0,63
PGSC0003DMT400079085	9,85	16,45	11,71	8,96	8,27	6,66	12,67	7,96	0,63
PGSC0003DMT400023746	17,16	18,48	15,94	11,76	9,99	10,66	17,19	10,80	0,63



PGSC0003DMT400084198	13,66	9,53	9,76	5,88	6,55	8,26	10,98	6,90	0,63
PGSC0003DMT400020522	89,28	96,13	75,78	53,47	57,18	53,32	87,06	54,66	0,63
PGSC0003DMT400031836	17,48	20,21	16,59	12,88	9,99	11,20	18,09	11,36	0,63
PGSC0003DMT400035770	29,23	25,11	26,99	16,24	14,81	19,99	27,11	17,01	0,63
PGSC0003DMT400042944	14,62	18,76	22,44	10,64	9,99	14,40	18,61	11,68	0,63
PGSC0003DMT400006155	30,82	45,03	43,91	25,76	23,77	25,59	39,92	25,04	0,63
PGSC0003DMT400083153	54,01	53,69	52,36	37,23	34,10	29,06	53,35	33,46	0,63
PGSC0003DMT400017556	10,17	10,10	13,66	6,16	7,92	7,20	11,31	7,09	0,63
PGSC0003DMT400047182	77,21	89,78	106,67	72,23	48,92	50,39	91,22	57,18	0,63
PGSC0003DMT400011868	44,16	56,87	68,95	34,71	38,24	33,59	56,66	35,51	0,63
PGSC0003DMT400049596	31,14	22,52	25,04	20,44	11,02	17,86	26,23	16,44	0,63
PGSC0003DMT400013468	90,55	94,97	109,60	64,39	62,69	57,85	98,37	61,64	0,63
PGSC0003DMT400027257	45,75	49,65	59,52	31,63	32,04	33,32	51,64	32,33	0,63
PGSC0003DMT400046645	53,06	49,94	62,77	40,31	30,66	32,79	55,26	34,59	0,63
PGSC0003DMT400063125	35,90	42,44	55,61	30,51	25,84	27,46	44,65	27,94	0,63
PGSC0003DMT400029418	46,07	48,79	50,08	35,27	29,28	26,13	48,31	30,23	0,63
PGSC0003DMT400066737	29,55	24,54	20,81	18,20	13,43	15,20	24,97	15,61	0,63
PGSC0003DMT400004089	16,20	14,15	17,24	9,80	7,92	12,00	15,86	9,91	0,62
PGSC0003DMT400094671	21,92	34,06	37,73	18,76	17,57	22,13	31,24	19,49	0,62
PGSC0003DMT400023914	55,92	53,40	50,73	36,67	30,31	32,79	53,35	33,26	0,62
PGSC0003DMT400012413	17,79	20,21	13,01	8,40	10,33	13,06	17,00	10,60	0,62
PGSC0003DMT400064995	10,17	11,26	15,61	7,28	6,20	9,60	12,35	7,69	0,62
PGSC0003DMT400067356	13,34	11,26	10,41	7,00	6,55	8,26	11,67	7,27	0,62
PGSC0003DMT400012359	79,11	95,84	95,94	65,79	44,78	58,12	90,30	56,23	0,62
PGSC0003DMT400075656	10,17	9,24	9,76	5,60	7,23	5,33	9,72	6,05	0,62
PGSC0003DMT400041633	61,64	55,14	46,83	36,11	28,94	36,79	54,54	33,95	0,62
PGSC0003DMT400033128	22,56	23,67	33,17	15,96	18,26	15,20	26,47	16,47	0,62
PGSC0003DMT400022166	12,71	13,86	13,66	9,80	7,23	8,00	13,41	8,34	0,62
PGSC0003DMT400016940	33,36	29,44	33,50	18,76	19,29	21,86	32,10	19,97	0,62

PGSC0003DMT400057068	18,43	17,32	20,81	13,72	9,99	11,46	18,85	11,72	0,62
PGSC0003DMT400062284	29,87	33,20	27,64	22,12	17,22	17,06	30,24	18,80	0,62
PGSC0003DMT400020663	77,21	74,77	78,38	48,71	47,54	46,92	76,79	47,72	0,62
PGSC0003DMT400084735	22,24	28,58	26,34	17,36	13,78	16,80	25,72	15,98	0,62
PGSC0003DMT400060090	145,52	160,21	149,60	99,66	88,53	94,64	151,78	94,28	0,62
PGSC0003DMT400047177	46,71	67,55	79,68	44,51	37,55	38,39	64,65	40,15	0,62
PGSC0003DMT400004717	45,12	42,72	41,95	27,15	24,11	29,33	43,26	26,86	0,62
PGSC0003DMT400013488	23,83	19,92	24,07	14,56	11,02	16,53	22,61	14,04	0,62
PGSC0003DMT400070826	15,25	21,36	18,86	12,60	11,71	10,13	18,49	11,48	0,62
PGSC0003DMT400009860	35,90	32,62	48,78	26,60	22,74	23,46	39,10	24,27	0,62
PGSC0003DMT400060216	12,39	12,99	17,89	7,84	8,61	10,40	14,42	8,95	0,62
PGSC0003DMT400001898	14,62	12,99	21,79	9,80	9,65	11,20	16,47	10,22	0,62
PGSC0003DMT400075781	18,11	15,88	18,86	8,96	13,43	10,40	17,62	10,93	0,62
PGSC0003DMT400060473	83,56	100,17	113,18	64,39	64,76	54,92	98,97	61,36	0,62
PGSC0003DMT400009116	15,57	12,41	12,68	8,68	6,89	9,60	13,55	8,39	0,62
PGSC0003DMT400044868	122,64	114,60	99,84	67,47	76,82	64,25	112,36	69,51	0,62
PGSC0003DMT400048498	72,12	76,21	77,08	53,19	45,47	40,79	75,14	46,48	0,62
PGSC0003DMT400053236	27,01	17,90	14,96	12,04	10,33	14,66	19,96	12,34	0,62
PGSC0003DMT400058927	25,10	27,42	40,00	16,52	21,36	19,20	30,84	19,03	0,62
PGSC0003DMT400067998	33,68	34,93	37,08	22,12	23,08	19,99	35,23	21,73	0,62
PGSC0003DMT400024318	66,41	83,43	82,28	46,19	49,26	47,72	77,37	47,72	0,62
PGSC0003DMT400004914	13,03	13,86	12,03	9,52	6,20	8,26	12,97	7,99	0,62
PGSC0003DMT400032865	12,71	9,24	11,38	8,40	4,13	8,00	11,11	6,84	0,62
PGSC0003DMT400021127	15,57	17,61	18,54	9,24	12,75	9,86	17,24	10,62	0,62
PGSC0003DMT400019334	7,94	8,37	9,11	3,92	5,86	5,87	8,47	5,22	0,62
PGSC0003DMT400058477	16,52	16,17	17,24	10,36	8,61	11,73	16,64	10,23	0,61
PGSC0003DMT400010077	15,25	17,03	20,81	12,88	7,23	12,53	17,70	10,88	0,61
PGSC0003DMT400050122	42,89	45,03	34,80	26,32	20,32	28,79	40,91	25,14	0,61
PGSC0003DMT400008245	136,94	138,56	134,32	93,78	80,95	77,05	136,61	83,93	0,61

PGSC0003DMT400076712	12,71	22,81	24,39	14,28	7,58	14,93	19,97	12,26	0,61
PGSC0003DMT400052621	79,43	82,56	65,04	47,59	40,30	51,45	75,68	46,45	0,61
PGSC0003DMT400069670	27,01	26,56	31,22	20,72	15,85	15,46	28,26	17,34	0,61
PGSC0003DMT400035841	16,20	17,32	14,96	10,36	7,92	11,46	16,16	9,91	0,61
PGSC0003DMT400033477	46,71	39,84	35,77	28,55	23,77	22,66	40,77	24,99	0,61
PGSC0003DMT400047329	15,89	16,74	15,61	12,04	7,92	9,60	16,08	9,85	0,61
PGSC0003DMT400069927	66,41	53,40	60,82	34,99	35,83	39,72	60,21	36,85	0,61
PGSC0003DMT400047325	32,09	34,35	38,38	26,60	18,60	18,93	34,94	21,38	0,61
PGSC0003DMT400021600	16,84	18,76	27,32	13,44	14,12	10,93	20,97	12,83	0,61
PGSC0003DMT400081296	20,33	15,88	20,16	9,52	14,81	10,13	18,79	11,49	0,61
PGSC0003DMT400058583	12,07	21,94	21,14	12,32	12,06	9,33	18,38	11,24	0,61
PGSC0003DMT400020276	68,63	73,03	82,28	44,79	47,54	44,52	74,65	45,62	0,61
PGSC0003DMT400021028	17,79	19,63	20,16	10,08	10,68	14,40	19,19	11,72	0,61
PGSC0003DMT400072202	26,05	25,11	31,55	21,28	12,40	16,80	27,57	16,83	0,61
PGSC0003DMT400045025	20,97	24,54	40,33	24,36	11,71	16,26	28,61	17,44	0,61
PGSC0003DMT400058566	53,70	65,24	70,25	45,91	33,76	35,46	63,06	38,38	0,61
PGSC0003DMT400055239	28,28	35,80	38,70	24,08	20,32	18,13	34,26	20,84	0,61
PGSC0003DMT400009630	81,02	79,10	100,17	55,15	60,28	42,92	86,76	52,78	0,61
PGSC0003DMT400032086	42,58	40,99	45,53	28,55	26,18	23,73	43,03	26,15	0,61
PGSC0003DMT400054175	42,26	50,52	44,23	31,35	27,90	23,99	45,67	27,75	0,61
PGSC0003DMT400006461	64,82	68,70	82,61	41,99	47,88	41,32	72,04	43,73	0,61
PGSC0003DMT400003652	392,39	445,43	259,85	217,80	210,82	237,54	365,89	222,05	0,61
PGSC0003DMT400014518	17,16	12,99	13,98	10,36	8,96	7,46	14,71	8,93	0,61
PGSC0003DMT400037283	20,33	23,38	17,56	11,76	12,06	13,33	20,42	12,38	0,61
PGSC0003DMT400003464	67,36	66,40	66,35	43,95	36,51	40,79	66,70	40,42	0,61
PGSC0003DMT400012801	22,24	22,81	22,77	15,96	12,06	13,06	22,61	13,69	0,61
PGSC0003DMT400028908	13,03	8,66	9,43	7,28	5,17	6,40	10,37	6,28	0,61
PGSC0003DMT400071600	27,64	31,18	31,55	20,44	17,22	17,06	30,12	18,24	0,61
PGSC0003DMT400050201	14,62	12,99	12,68	8,12	8,27	8,00	13,43	8,13	0,61

PGSC0003DMT400018841	27,64	24,54	33,17	18,20	18,26	15,20	28,45	17,22	0,61
PGSC0003DMT400020381	28,28	44,46	42,93	30,79	16,53	22,66	38,56	23,33	0,60
PGSC0003DMT400055192	16,20	19,63	21,46	12,60	11,37	10,66	19,10	11,54	0,60
PGSC0003DMT400034899	10,49	10,68	10,73	7,28	5,86	6,13	10,63	6,42	0,60
PGSC0003DMT400022479	16,84	18,76	13,33	11,76	8,96	8,80	16,31	9,84	0,60
PGSC0003DMT400002599	227,18	252,01	289,12	179,17	146,75	137,56	256,10	154,49	0,60
PGSC0003DMT400040232	21,61	30,60	35,45	20,16	22,05	10,66	29,22	17,62	0,60
PGSC0003DMT400049648	16,84	20,50	22,44	14,84	9,99	11,20	19,93	12,01	0,60
PGSC0003DMT400009830	60,37	47,63	44,23	29,67	23,42	38,66	50,74	30,58	0,60
PGSC0003DMT400020667	38,45	43,59	54,64	25,48	33,07	23,73	45,56	27,43	0,60
PGSC0003DMT400051809	402,88	404,15	366,53	239,64	237,00	229,54	391,19	235,39	0,60
PGSC0003DMT400044684	32,73	41,57	48,46	22,96	25,84	25,06	40,92	24,62	0,60
PGSC0003DMT400055672	10,17	12,41	11,06	7,56	7,58	5,07	11,21	6,74	0,60
PGSC0003DMT400050664	47,66	42,72	25,69	19,88	17,57	32,26	38,69	23,24	0,60
PGSC0003DMT400042470	13,66	11,55	17,89	8,96	9,99	6,93	14,37	8,63	0,60
PGSC0003DMT400079848	19,70	24,25	35,45	19,04	12,06	16,53	26,47	15,88	0,60
PGSC0003DMT400014974	51,79	56,29	59,84	33,03	29,28	38,39	55,97	33,57	0,60
PGSC0003DMT400050770	171,89	165,41	152,53	96,86	91,63	105,04	163,28	97,84	0,60
PGSC0003DMT400069532	24,47	33,20	52,04	33,03	14,81	17,86	36,57	21,90	0,60
PGSC0003DMT400060046	24,47	30,60	30,25	19,88	14,12	17,06	28,44	17,02	0,60
PGSC0003DMT400026419	17,48	26,56	28,29	15,12	14,81	13,33	24,11	14,42	0,60
PGSC0003DMT400032880	97,22	79,39	67,00	40,59	42,72	62,38	81,20	48,56	0,60
PGSC0003DMT400038538	14,62	22,52	36,10	17,92	10,68	15,20	24,41	14,60	0,60
PGSC0003DMT400096863	51,47	49,94	53,34	36,39	31,35	24,79	51,58	30,84	0,60
PGSC0003DMT400023212	8,90	11,84	16,91	9,80	5,51	7,20	12,55	7,50	0,60
PGSC0003DMT400070680	32,41	37,24	33,17	17,92	16,88	26,66	34,27	20,49	0,60
PGSC0003DMT400033373	43,85	40,70	41,95	25,20	25,84	24,53	42,17	25,19	0,60
PGSC0003DMT400066588	36,54	38,68	38,70	19,32	24,46	24,26	37,97	22,68	0,60
PGSC0003DMT400000570	15,57	17,61	11,38	8,96	9,65	8,00	14,85	8,87	0,60

PGSC0003DMT400064306	63,86	66,97	56,91	34,99	37,89	39,19	62,58	37,36	0,60
PGSC0003DMT400035850	13,03	9,81	9,76	5,60	5,86	8,00	10,87	6,49	0,60
PGSC0003DMT400042401	71,17	75,34	77,08	48,71	46,85	37,86	74,53	44,47	0,60
PGSC0003DMT400081467	21,61	35,51	43,58	25,48	14,81	19,73	33,57	20,01	0,60
PGSC0003DMT400019758	18,43	21,36	15,94	12,04	8,61	12,53	18,58	11,06	0,60
PGSC0003DMT400051992	30,18	27,71	28,94	21,56	14,81	15,20	28,94	17,19	0,59
PGSC0003DMT400029793	141,71	146,07	142,12	92,38	83,71	79,18	143,30	85,09	0,59
PGSC0003DMT400050673	33,68	42,72	33,17	25,20	21,70	18,13	36,52	21,68	0,59
PGSC0003DMT400081407	44,16	42,72	40,00	31,91	18,60	24,79	42,29	25,10	0,59
PGSC0003DMT400033369	13,98	11,26	9,76	7,56	6,55	6,66	11,67	6,92	0,59
PGSC0003DMT400058778	20,97	30,89	38,70	16,24	18,26	19,20	30,19	17,90	0,59
PGSC0003DMT400049209	40,67	43,59	52,04	24,08	23,42	33,32	45,43	26,94	0,59
PGSC0003DMT400062969	8,58	10,10	14,64	8,40	4,13	7,20	11,11	6,58	0,59
PGSC0003DMT400042870	30,82	24,83	21,46	19,04	13,78	12,80	25,70	15,21	0,59
PGSC0003DMT400015090	12,71	11,84	18,86	9,52	8,96	7,20	14,47	8,56	0,59
PGSC0003DMT400082388	63,86	73,61	80,00	46,19	42,72	39,72	72,49	42,88	0,59
PGSC0003DMT400030299	39,40	35,80	41,63	27,43	22,74	18,93	38,94	23,03	0,59
PGSC0003DMT400018079	9,21	10,97	11,71	6,16	6,55	6,13	10,63	6,28	0,59
PGSC0003DMT400023325	33,04	49,65	52,69	34,15	23,08	22,66	45,13	26,63	0,59
PGSC0003DMT400034200	27,96	26,56	23,74	19,32	10,33	16,53	26,09	15,39	0,59
PGSC0003DMT400017478	9,85	10,97	11,71	5,60	5,86	7,73	10,84	6,40	0,59
PGSC0003DMT400010006	14,93	15,59	22,77	10,92	12,40	8,00	17,76	10,44	0,59
PGSC0003DMT400001745	147,11	142,03	136,27	89,86	77,51	82,38	141,80	83,25	0,59
PGSC0003DMT400006494	21,29	22,81	18,86	13,16	9,65	14,13	20,99	12,31	0,59
PGSC0003DMT400079902	39,72	37,82	43,25	26,60	21,01	23,19	40,26	23,60	0,59
PGSC0003DMT400097155	24,15	22,52	14,64	13,16	11,02	11,73	20,44	11,97	0,59
PGSC0003DMT400029745	27,01	30,89	39,68	19,88	17,22	19,99	32,53	19,03	0,59
PGSC0003DMT400074811	12,39	15,01	12,36	6,72	10,33	6,13	13,25	7,73	0,58
PGSC0003DMT400037717	13,34	8,95	15,94	5,32	8,96	8,00	12,74	7,43	0,58

PGSC0003DMT400083789	30,82	38,39	41,63	22,96	21,36	20,26	36,95	21,53	0,58
PGSC0003DMT400056190	11,12	11,84	14,96	8,96	6,20	6,93	12,64	7,36	0,58
PGSC0003DMT400032630	16,84	16,74	15,94	9,80	7,58	11,46	16,51	9,61	0,58
PGSC0003DMT400051159	13,66	17,03	18,21	11,48	10,33	6,66	16,30	9,49	0,58
PGSC0003DMT400042581	33,68	40,13	43,91	26,88	17,91	23,73	39,24	22,84	0,58
PGSC0003DMT400015102	81,02	66,40	61,14	43,67	35,83	41,86	69,52	40,45	0,58
PGSC0003DMT400009378	21,61	20,78	22,44	11,76	14,47	11,46	21,61	12,56	0,58
PGSC0003DMT400044958	10,49	12,41	20,81	10,64	7,23	7,46	14,57	8,44	0,58
PGSC0003DMT400073008	16,84	11,26	12,03	7,84	4,48	10,93	13,38	7,75	0,58
PGSC0003DMT400019834	27,32	30,60	27,64	17,92	16,19	15,46	28,52	16,52	0,58
PGSC0003DMT400035034	16,52	17,32	23,74	10,36	12,06	10,93	19,19	11,12	0,58
PGSC0003DMT400050364	11,76	16,17	13,01	6,72	10,33	6,66	13,65	7,90	0,58
PGSC0003DMT400068450	47,34	57,74	67,65	35,55	31,69	32,79	57,58	33,34	0,58
PGSC0003DMT400034193	9,85	16,74	16,26	7,00	8,96	8,80	14,28	8,25	0,58
PGSC0003DMT400030831	6,67	6,64	7,48	5,60	2,41	4,00	6,93	4,00	0,58
PGSC0003DMT400005186	48,93	64,09	64,39	37,79	29,97	34,66	59,14	34,14	0,58
PGSC0003DMT400019315	50,20	40,13	46,83	28,27	24,46	26,39	45,72	26,37	0,58
PGSC0003DMT400011598	36,22	32,04	35,45	22,96	20,32	16,53	34,57	19,94	0,58
PGSC0003DMT400020689	92,14	88,91	93,99	58,51	44,78	55,19	91,68	52,83	0,58
PGSC0003DMT400070252	189,05	181,58	166,51	100,22	95,42	113,84	179,05	103,16	0,58
PGSC0003DMT400058204	26,69	24,25	30,57	21,28	11,02	14,66	27,17	15,65	0,58
PGSC0003DMT400020770	10,80	13,28	15,61	7,28	8,61	6,93	13,23	7,61	0,57
PGSC0003DMT400083077	33,04	47,34	55,61	29,11	27,21	21,86	45,33	26,06	0,57
PGSC0003DMT400060225	29,55	36,95	41,30	22,96	20,32	18,66	35,93	20,65	0,57
PGSC0003DMT400022761	55,92	64,66	67,65	39,19	37,20	31,73	62,74	36,04	0,57
PGSC0003DMT400040485	26,05	27,42	17,24	13,44	11,71	15,46	23,57	13,54	0,57
PGSC0003DMT400022365	78,80	70,73	65,37	39,47	34,10	49,85	71,63	41,14	0,57
PGSC0003DMT400004170	20,97	25,69	26,02	12,04	13,43	16,26	24,23	13,91	0,57
PGSC0003DMT400086367	17,48	18,19	23,74	12,60	8,96	12,53	19,80	11,36	0,57

PGSC0003DMT400044706	52,43	84,00	111,23	48,43	46,50	46,92	82,55	47,28	0,57
PGSC0003DMT400001071	44,48	46,19	51,06	29,39	22,39	29,33	47,24	27,04	0,57
PGSC0003DMT400008105	35,27	38,68	58,87	25,76	22,74	27,46	44,27	25,32	0,57
PGSC0003DMT400046538	7,94	11,55	8,46	7,28	3,10	5,60	9,32	5,33	0,57
PGSC0003DMT400037297	15,25	13,28	12,36	8,68	5,86	8,80	13,63	7,78	0,57
PGSC0003DMT400050492	38,13	37,53	43,91	24,64	21,70	21,86	39,86	22,73	0,57
PGSC0003DMT400014828	15,57	21,07	21,79	12,88	11,37	9,06	19,48	11,10	0,57
PGSC0003DMT400011361	16,20	21,65	20,16	14,28	9,99	8,80	19,34	11,02	0,57
PGSC0003DMT400031568	291,99	274,24	252,37	164,05	139,51	162,62	272,87	155,39	0,57
PGSC0003DMT400046598	21,61	24,25	27,97	17,64	9,99	14,40	24,61	14,01	0,57
PGSC0003DMT400038273	57,51	55,14	32,85	17,92	24,11	40,79	48,50	27,61	0,57
PGSC0003DMT400039867	11,76	15,01	18,21	8,12	8,61	8,80	14,99	8,51	0,57
PGSC0003DMT400081769	6,04	10,97	13,33	6,16	5,17	5,87	10,11	5,73	0,57
PGSC0003DMT400012508	14,30	13,86	7,15	8,12	6,55	5,33	11,77	6,67	0,57
PGSC0003DMT400038146	9,21	8,95	11,06	5,60	4,82	6,13	9,74	5,52	0,57
PGSC0003DMT400034324	40,03	61,20	83,91	50,11	20,32	34,39	61,71	34,94	0,57
PGSC0003DMT400016458	20,97	32,04	25,04	15,12	14,12	14,93	26,02	14,72	0,57
PGSC0003DMT400058291	20,02	23,38	27,32	10,92	15,50	13,60	23,57	13,34	0,57
PGSC0003DMT400030594	13,03	15,30	14,96	9,52	7,23	7,73	14,43	8,16	0,57
PGSC0003DMT400011990	9,21	10,10	9,76	7,84	3,79	4,80	9,69	5,48	0,57
PGSC0003DMT400001247	13,34	14,15	17,56	10,08	7,92	7,46	15,02	8,49	0,57
PGSC0003DMT400080082	30,82	30,89	29,60	18,20	15,50	17,86	30,44	17,19	0,56
PGSC0003DMT400004117	44,16	54,85	57,24	35,55	27,90	24,53	52,08	29,33	0,56
PGSC0003DMT400020520	25,74	36,37	53,34	22,40	22,05	20,53	38,48	21,66	0,56
PGSC0003DMT400023163	7,94	16,74	15,94	8,12	9,65	5,07	13,54	7,61	0,56
PGSC0003DMT400077286	92,14	96,42	103,10	54,59	57,87	51,45	97,22	54,64	0,56
PGSC0003DMT400018805	15,57	16,45	13,98	8,40	9,99	7,46	15,33	8,62	0,56
PGSC0003DMT400001401	10,49	12,41	13,66	5,88	5,86	8,80	12,19	6,85	0,56
PGSC0003DMT400041657	9,53	10,68	10,08	3,08	6,20	7,73	10,10	5,67	0,56

PGSC0003DMT400011187	65,45	82,85	90,74	54,87	39,61	39,72	79,68	44,73	0,56
PGSC0003DMT400060736	84,20	81,41	71,22	42,83	46,50	43,46	78,94	44,26	0,56
PGSC0003DMT400077173	21,92	18,19	15,94	11,76	7,92	11,73	18,68	10,47	0,56
PGSC0003DMT400066855	6,67	12,99	8,78	4,20	5,86	5,87	9,48	5,31	0,56
PGSC0003DMT400000446	115,65	121,24	100,17	69,15	54,77	64,78	112,35	62,90	0,56
PGSC0003DMT400030164	84,83	98,44	81,96	53,47	47,19	47,72	88,41	49,46	0,56
PGSC0003DMT400068120	119,47	93,82	81,96	52,91	48,57	63,45	98,42	54,98	0,56
PGSC0003DMT400054457	40,67	45,61	53,99	29,39	25,15	23,73	46,76	26,09	0,56
PGSC0003DMT400026491	55,92	61,78	40,65	24,64	21,70	41,86	52,78	29,40	0,56
PGSC0003DMT400083245	13,03	12,70	11,06	6,44	7,92	6,13	12,26	6,83	0,56
PGSC0003DMT400020223	25,10	29,44	29,27	15,96	13,09	17,60	27,94	15,55	0,56
PGSC0003DMT400015633	50,84	62,93	73,50	37,79	27,21	39,19	62,42	34,73	0,56
PGSC0003DMT400040337	10,49	10,39	12,68	5,60	8,27	4,80	11,19	6,22	0,56
PGSC0003DMT400041700	12,07	15,01	16,26	11,20	5,17	7,73	14,45	8,03	0,56
PGSC0003DMT400044590	68,31	71,01	50,08	34,43	28,94	41,86	63,13	35,08	0,56
PGSC0003DMT400017372	25,42	40,70	31,55	16,80	18,26	19,20	32,56	18,09	0,56
PGSC0003DMT400056995	63,55	67,84	75,78	50,95	34,79	29,33	69,06	38,36	0,56
PGSC0003DMT400001033	11,12	12,70	16,59	8,12	8,96	5,33	13,47	7,47	0,55
PGSC0003DMT400057238	42,89	36,37	38,05	20,72	22,74	21,59	39,10	21,68	0,55
PGSC0003DMT400033202	97,22	106,52	122,28	62,43	58,22	59,98	108,67	60,21	0,55
PGSC0003DMT400064205	17,48	19,34	23,74	9,80	13,09	10,66	20,19	11,18	0,55
PGSC0003DMT400006643	29,55	36,95	40,98	19,60	22,05	17,86	35,83	19,84	0,55
PGSC0003DMT400054667	8,26	9,53	7,81	5,04	6,20	2,93	8,53	4,72	0,55
PGSC0003DMT400014779	18,43	21,36	19,19	10,64	8,61	13,33	19,66	10,86	0,55
PGSC0003DMT400007294	8,26	8,66	12,68	5,88	6,20	4,27	9,87	5,45	0,55
PGSC0003DMT400040122	18,75	35,51	37,73	17,92	16,88	16,00	30,66	16,93	0,55
PGSC0003DMT400055281	8,58	10,10	14,31	6,16	7,23	4,80	11,00	6,06	0,55
PGSC0003DMT400033637	63,55	80,83	71,55	50,95	32,38	35,72	71,98	39,68	0,55
PGSC0003DMT400054474	7,31	7,79	8,13	5,32	3,44	4,00	7,74	4,25	0,55



PGSC0003DMT400017243	8,26	7,79	9,76	3,92	5,17	5,07	8,60	4,72	0,55
PGSC0003DMT400024758	13,03	11,84	12,36	5,04	7,92	7,46	12,41	6,81	0,55
PGSC0003DMT400038216	11,76	8,95	8,13	4,48	4,13	7,20	9,61	5,27	0,55
PGSC0003DMT400006584	54,33	48,21	24,07	21,28	19,29	28,79	42,20	23,12	0,55
PGSC0003DMT400052217	18,11	27,71	30,25	15,68	9,99	16,00	25,36	13,89	0,55
PGSC0003DMT400083213	14,62	13,86	15,94	9,52	6,55	8,26	14,81	8,11	0,55
PGSC0003DMT400080154	16,52	19,63	14,64	9,24	8,96	9,60	16,93	9,27	0,55
PGSC0003DMT400018218	22,88	26,85	29,60	13,16	15,85	14,40	26,44	14,47	0,55
PGSC0003DMT400036188	17,48	16,17	23,74	10,64	9,30	11,46	19,13	10,47	0,55
PGSC0003DMT400063186	17,79	18,19	22,12	11,20	9,65	10,93	19,37	10,59	0,55
PGSC0003DMT400001296	8,26	10,68	9,43	5,04	6,20	4,27	9,46	5,17	0,55
PGSC0003DMT400052795	41,94	47,63	61,47	30,79	24,46	27,19	50,35	27,48	0,55
PGSC0003DMT400053479	66,09	78,23	83,58	41,99	43,06	39,19	75,97	41,41	0,55
PGSC0003DMT400061389	12,71	17,03	22,44	13,44	6,20	8,80	17,39	9,48	0,55
PGSC0003DMT400039555	15,89	10,10	18,86	8,96	8,27	7,20	14,95	8,14	0,54
PGSC0003DMT400026489	48,93	49,07	70,57	31,91	31,35	28,53	56,19	30,60	0,54
PGSC0003DMT400041056	16,84	22,23	23,74	12,32	11,71	10,13	20,94	11,39	0,54
PGSC0003DMT400028980	11,44	13,57	7,15	5,04	6,55	5,87	10,72	5,82	0,54
PGSC0003DMT400080097	70,54	75,34	60,17	46,19	26,87	38,66	68,68	37,24	0,54
PGSC0003DMT400062236	131,22	124,71	97,24	54,87	62,35	74,11	117,72	63,78	0,54
PGSC0003DMT400016703	6,04	5,48	7,15	3,08	2,76	4,27	6,22	3,37	0,54
PGSC0003DMT400063718	25,42	22,23	20,49	14,84	9,99	12,00	22,71	12,28	0,54
PGSC0003DMT400070732	97,22	101,33	89,44	51,51	53,74	50,39	96,00	51,88	0,54
PGSC0003DMT400054793	5,08	10,39	11,06	4,48	3,44	6,40	8,84	4,77	0,54
PGSC0003DMT400029522	14,62	10,39	9,11	5,04	4,82	8,53	11,37	6,13	0,54
PGSC0003DMT400035731	28,60	30,31	26,67	18,20	13,43	14,40	28,53	15,34	0,54
PGSC0003DMT400051893	13,34	19,92	25,69	13,72	7,58	10,40	19,65	10,57	0,54
PGSC0003DMT400078544	17,79	13,86	14,31	6,72	9,99	8,00	15,32	8,24	0,54
PGSC0003DMT400074842	217,01	214,20	199,04	115,34	115,06	107,97	210,08	112,79	0,54

PGSC0003DMT400001935	172,21	145,20	165,21	87,90	90,94	80,25	160,87	86,36	0,54
PGSC0003DMT400016590	23,19	24,54	32,52	15,96	13,78	13,33	26,75	14,36	0,54
PGSC0003DMT400057615	34,00	29,73	26,67	15,68	15,50	17,33	30,13	16,17	0,54
PGSC0003DMT400006452	30,50	25,98	16,91	14,84	10,68	13,86	24,46	13,13	0,54
PGSC0003DMT400025342	27,96	32,04	43,91	18,20	23,42	14,13	34,64	18,58	0,54
PGSC0003DMT400072208	23,83	22,52	19,51	11,48	9,65	14,13	21,95	11,75	0,54
PGSC0003DMT400019030	95,00	91,51	95,29	52,91	45,13	52,79	93,93	50,28	0,54
PGSC0003DMT400008312	14,93	7,79	11,38	5,88	5,17	7,20	11,37	6,08	0,54
PGSC0003DMT400012730	61,00	53,69	54,64	24,64	32,38	33,59	56,44	30,20	0,54
PGSC0003DMT400051424	13,98	13,28	14,31	8,40	6,89	6,93	13,86	7,41	0,53
PGSC0003DMT400001058	431,16	424,35	434,82	250,83	223,91	214,61	430,11	229,78	0,53
PGSC0003DMT400079665	78,48	111,43	132,37	64,67	61,32	45,85	107,43	57,28	0,53
PGSC0003DMT400041718	17,48	17,32	36,43	15,12	8,96	13,86	23,74	12,65	0,53
PGSC0003DMT400010570	16,84	16,74	16,91	9,80	7,23	9,86	16,83	8,96	0,53
PGSC0003DMT400012159	81,34	67,84	61,79	35,83	34,10	42,39	70,32	37,44	0,53
PGSC0003DMT400037917	6,04	13,57	16,26	7,56	6,20	5,33	11,96	6,36	0,53
PGSC0003DMT400063253	17,48	23,38	26,99	12,60	13,09	10,40	22,62	12,03	0,53
PGSC0003DMT400020973	44,80	53,12	65,04	30,23	33,76	22,66	54,32	28,88	0,53
PGSC0003DMT400069570	9,85	9,81	11,71	5,04	5,51	6,13	10,46	5,56	0,53
PGSC0003DMT400088065	6,99	6,93	8,13	4,20	3,79	3,73	7,35	3,91	0,53
PGSC0003DMT400061012	21,61	27,42	26,99	17,36	11,02	12,00	25,34	13,46	0,53
PGSC0003DMT400050795	11,44	17,03	14,64	7,00	8,96	6,93	14,37	7,63	0,53
PGSC0003DMT400071809	48,29	42,15	38,70	24,92	20,67	22,93	43,05	22,84	0,53
PGSC0003DMT400021072	5,72	5,20	8,46	3,64	3,44	3,20	6,46	3,43	0,53
PGSC0003DMT400044544	14,62	16,17	16,26	9,24	6,89	8,80	15,68	8,31	0,53
PGSC0003DMT400090346	22,88	32,91	41,30	23,24	12,40	15,73	32,36	17,12	0,53
PGSC0003DMT400063306	18,43	26,27	24,07	13,16	11,71	11,46	22,92	12,11	0,53
PGSC0003DMT400016625	6,35	5,48	7,81	3,64	3,79	2,93	6,55	3,45	0,53
PGSC0003DMT400032381	20,33	30,02	25,69	15,12	10,33	14,66	25,35	13,37	0,53

PGSC0003DMT400020408	14,62	17,61	16,59	8,40	9,30	8,00	16,27	8,57	0,53
PGSC0003DMT400089913	67,36	71,30	61,79	31,35	37,55	36,52	66,82	35,14	0,53
PGSC0003DMT400058565	10,17	12,41	8,13	5,32	3,10	7,73	10,24	5,38	0,53
PGSC0003DMT400057713	15,57	15,88	16,91	8,40	6,89	10,13	16,12	8,47	0,53
PGSC0003DMT400003214	28,91	27,14	20,49	13,16	13,43	13,60	25,51	13,40	0,53
PGSC0003DMT400076693	12,39	12,12	12,68	6,44	4,82	8,26	12,40	6,51	0,52
PGSC0003DMT400079158	3,81	11,26	8,46	2,52	4,48	5,33	7,84	4,11	0,52
PGSC0003DMT400002870	14,62	19,92	24,07	8,40	11,37	10,93	19,54	10,23	0,52
PGSC0003DMT400078979	16,20	25,98	40,00	23,24	7,23	12,53	27,39	14,33	0,52
PGSC0003DMT400055201	53,06	48,79	42,60	24,64	24,46	26,39	48,15	25,16	0,52
PGSC0003DMT400006511	4,13	5,20	5,53	3,36	1,72	2,67	4,95	2,58	0,52
PGSC0003DMT400012219	21,61	32,33	30,90	15,40	13,09	15,73	28,28	14,74	0,52
PGSC0003DMT400001335	11,76	12,41	14,31	7,84	4,48	7,73	12,83	6,68	0,52
PGSC0003DMT400024289	14,62	12,70	15,94	9,24	6,89	6,40	14,42	7,51	0,52
PGSC0003DMT400043599	32,41	36,66	44,23	19,04	22,05	17,86	37,77	19,65	0,52
PGSC0003DMT400063329	13,98	18,48	15,94	7,56	8,27	9,33	16,13	8,39	0,52
PGSC0003DMT400079230	35,90	38,11	43,58	19,32	21,01	20,79	39,20	20,37	0,52
PGSC0003DMT400000414	20,02	20,21	19,51	10,36	8,96	11,73	19,91	10,35	0,52
PGSC0003DMT400019046	18,75	25,40	34,80	11,76	18,60	10,66	26,32	13,67	0,52
PGSC0003DMT400040247	10,80	11,84	10,41	4,48	6,55	6,13	11,02	5,72	0,52
PGSC0003DMT400025000	9,85	12,70	12,36	5,88	6,89	5,33	11,64	6,03	0,52
PGSC0003DMT400017744	13,34	14,43	18,21	10,92	5,17	7,73	15,33	7,94	0,52
PGSC0003DMT400080588	343,46	391,44	333,35	196,52	174,31	182,35	356,08	184,39	0,52
PGSC0003DMT400060407	13,66	13,86	20,16	11,48	7,58	5,60	15,89	8,22	0,52
PGSC0003DMT400067577	21,61	25,69	38,70	23,24	6,55	14,66	28,67	14,82	0,52
PGSC0003DMT400001144	7,63	8,37	11,71	4,48	4,48	5,33	9,24	4,76	0,52
PGSC0003DMT400078796	5,40	9,81	5,53	2,52	3,10	5,07	6,91	3,56	0,52
PGSC0003DMT400020306	6,99	7,79	13,33	3,64	5,51	5,33	9,37	4,83	0,52
PGSC0003DMT400008624	14,62	21,07	14,64	8,40	7,92	9,60	16,78	8,64	0,52

PGSC0003DMT400073455	71,17	53,69	54,31	37,79	17,91	36,52	59,72	30,74	0,51
PGSC0003DMT400020834	22,24	31,18	28,94	20,72	12,06	9,60	27,45	14,13	0,51
PGSC0003DMT400002249	5,08	7,22	8,13	5,32	1,72	3,47	6,81	3,50	0,51
PGSC0003DMT400094578	6,67	6,64	5,20	2,80	1,38	5,33	6,17	3,17	0,51
PGSC0003DMT400000546	152,51	163,97	149,28	84,82	80,61	73,85	155,25	79,76	0,51
PGSC0003DMT400078341	54,33	46,19	40,00	22,68	22,05	27,46	46,84	24,06	0,51
PGSC0003DMT400068224	184,28	196,88	192,53	102,46	96,45	95,44	191,23	98,12	0,51
PGSC0003DMT400048535	38,13	41,57	49,76	20,16	16,53	29,59	43,15	22,09	0,51
PGSC0003DMT400065088	28,28	22,52	39,35	15,40	16,88	13,86	30,05	15,38	0,51
PGSC0003DMT400068047	40,67	52,83	57,24	27,43	28,59	21,06	50,25	25,69	0,51
PGSC0003DMT400009871	7,94	6,93	6,50	4,20	3,79	2,93	7,12	3,64	0,51
PGSC0003DMT400054692	8,58	7,51	12,36	7,28	1,38	5,87	9,48	4,84	0,51
PGSC0003DMT400075002	100,72	95,26	65,04	40,87	40,30	51,99	87,01	44,39	0,51
PGSC0003DMT400063308	5,08	7,22	9,76	3,92	4,13	3,20	7,35	3,75	0,51
PGSC0003DMT400037204	5,72	6,93	9,11	4,20	4,48	2,40	7,25	3,69	0,51
PGSC0003DMT400061927	39,40	33,78	25,69	18,20	14,81	17,33	32,96	16,78	0,51
PGSC0003DMT400028566	13,66	11,26	10,08	5,60	6,89	5,33	11,67	5,94	0,51
PGSC0003DMT400041637	5,40	6,64	6,18	3,08	3,79	2,40	6,07	3,09	0,51
PGSC0003DMT400054383	22,24	40,70	50,08	26,04	13,09	18,13	37,67	19,09	0,51
PGSC0003DMT400043067	5,40	4,91	5,53	2,52	3,10	2,40	5,28	2,67	0,51
PGSC0003DMT400038561	10,17	11,84	23,42	9,24	6,55	7,20	15,14	7,66	0,51
PGSC0003DMT400020297	10,17	7,79	8,78	5,32	4,48	3,73	8,91	4,51	0,51
PGSC0003DMT400040664	15,25	15,30	11,06	7,84	6,55	6,66	13,87	7,02	0,51
PGSC0003DMT400065698	6,67	15,01	14,31	6,72	4,82	6,66	12,00	6,07	0,51
PGSC0003DMT400015091	8,90	15,30	9,11	4,20	5,17	7,46	11,10	5,61	0,51
PGSC0003DMT400067616	20,97	23,09	19,84	12,88	8,96	10,40	21,30	10,75	0,50
PGSC0003DMT400014089	7,31	4,33	6,83	4,48	2,41	2,40	6,16	3,10	0,50
PGSC0003DMT400015346	10,80	14,15	10,41	7,28	5,17	5,33	11,79	5,93	0,50
PGSC0003DMT400075172	81,66	93,24	97,57	56,27	32,73	47,99	90,82	45,66	0,50

PGSC0003DMT400053846	5,40	10,10	12,03	3,64	6,20	4,00	9,18	4,61	0,50
PGSC0003DMT400051898	29,87	29,16	30,57	15,96	16,53	12,53	29,87	15,01	0,50
PGSC0003DMT400030772	158,55	160,50	142,45	81,74	59,59	90,11	153,83	77,15	0,50
PGSC0003DMT400052135	7,63	9,24	13,01	7,84	2,07	5,07	9,96	4,99	0,50
PGSC0003DMT400077702	24,15	27,42	30,57	17,08	11,02	13,06	27,38	13,72	0,50
PGSC0003DMT400038175	15,57	18,19	24,07	11,20	11,37	6,40	19,28	9,66	0,50
PGSC0003DMT400078766	8,26	7,51	7,15	2,80	4,13	4,53	7,64	3,82	0,50
PGSC0003DMT400022567	7,63	8,08	8,13	4,48	3,44	4,00	7,95	3,97	0,50
PGSC0003DMT400043340	44,48	58,60	56,59	25,76	25,49	28,53	53,22	26,59	0,50
PGSC0003DMT400078007	80,39	72,17	55,61	29,11	35,14	39,72	69,39	34,66	0,50
PGSC0003DMT400047825	11,12	17,32	20,16	13,44	3,10	7,73	16,20	8,09	0,50
PGSC0003DMT400039197	118,51	122,40	139,85	74,47	62,35	53,32	126,92	63,38	0,50
PGSC0003DMT400019012	7,31	8,95	7,15	5,32	3,44	2,93	7,80	3,90	0,50
PGSC0003DMT400014247	22,24	29,16	26,02	15,40	9,65	13,60	25,81	12,88	0,50
PGSC0003DMT400035554	4,77	6,64	3,58	3,36	1,72	2,40	5,00	2,49	0,50
PGSC0003DMT400043399	45,44	28,87	28,94	18,76	12,75	19,99	34,42	17,17	0,50
PGSC0003DMT400004186	11,76	8,37	8,46	3,08	3,44	7,73	9,53	4,75	0,50
PGSC0003DMT400045787	13,66	12,70	9,43	6,72	5,51	5,60	11,93	5,94	0,50
PGSC0003DMT400015076	8,58	10,68	20,49	7,28	5,86	6,66	13,25	6,60	0,50
PGSC0003DMT400048315	118,51	131,35	127,81	61,31	59,25	67,45	125,89	62,67	0,50
PGSC0003DMT400072211	10,17	19,05	27,64	15,40	5,17	7,73	18,95	9,43	0,50
PGSC0003DMT400026355	7,94	6,93	6,50	3,36	3,79	3,47	7,12	3,54	0,50
PGSC0003DMT400047084	6,35	7,79	8,46	4,20	2,76	4,27	7,53	3,74	0,50
PGSC0003DMT400066791	61,00	96,13	96,59	48,43	41,34	35,99	84,57	41,92	0,50
PGSC0003DMT400040893	37,17	42,15	43,91	29,67	10,33	21,06	41,08	20,35	0,50
PGSC0003DMT400005002	67,99	75,06	49,11	29,67	28,94	36,52	64,05	31,71	0,50
PGSC0003DMT400068444	7,63	10,10	7,81	4,20	3,10	5,33	8,51	4,21	0,49
PGSC0003DMT400010044	18,11	15,59	12,03	5,88	5,51	11,20	15,24	7,53	0,49
PGSC0003DMT400045965	10,49	15,88	15,94	6,72	7,23	6,93	14,10	6,96	0,49

PGSC0003DMT400031386	12,07	15,88	15,94	8,40	5,51	7,73	14,63	7,21	0,49
PGSC0003DMT400009365	9,53	15,30	28,29	12,60	3,44	10,13	17,71	8,72	0,49
PGSC0003DMT400055827	37,81	39,84	44,23	24,08	12,75	23,19	40,63	20,01	0,49
PGSC0003DMT400045129	11,12	10,39	12,03	4,76	2,41	9,33	11,18	5,50	0,49
PGSC0003DMT400086922	3,50	5,77	6,18	1,68	3,79	2,13	5,15	2,53	0,49
PGSC0003DMT400092392	41,30	32,62	26,02	16,52	14,47	18,13	33,31	16,37	0,49
PGSC0003DMT400050684	33,04	52,54	58,87	28,27	21,36	21,33	48,15	23,65	0,49
PGSC0003DMT400097242	17,79	32,62	21,14	13,72	9,65	11,73	23,85	11,70	0,49
PGSC0003DMT400034998	6,99	13,57	16,91	9,52	3,79	5,07	12,49	6,13	0,49
PGSC0003DMT400040422	7,94	9,24	7,15	4,76	3,44	3,73	8,11	3,98	0,49
PGSC0003DMT400022984	19,06	17,90	24,07	11,48	10,68	7,73	20,34	9,96	0,49
PGSC0003DMT400034851	118,51	153,29	127,49	66,35	65,11	63,98	133,10	65,15	0,49
PGSC0003DMT400034973	34,31	44,74	49,43	25,48	15,50	21,86	42,83	20,95	0,49
PGSC0003DMT400056161	5,08	6,06	4,55	3,36	1,38	2,93	5,23	2,56	0,49
PGSC0003DMT400025820	20,33	18,48	20,81	10,08	9,65	9,33	19,87	9,69	0,49
PGSC0003DMT400017199	32,73	26,56	14,31	7,00	9,65	19,20	24,53	11,95	0,49
PGSC0003DMT400065039	12,39	17,61	13,33	9,52	5,17	6,40	14,44	7,03	0,49
PGSC0003DMT400074397	3,18	6,06	4,55	2,24	2,07	2,40	4,60	2,24	0,49
PGSC0003DMT400014529	29,23	31,18	31,55	15,12	13,09	16,53	30,65	14,91	0,49
PGSC0003DMT400025973	69,58	79,96	73,50	41,71	31,69	34,66	74,35	36,02	0,48
PGSC0003DMT400061613	16,84	15,59	5,53	5,04	4,82	8,53	12,65	6,13	0,48
PGSC0003DMT400035453	19,70	19,63	25,04	12,04	10,33	8,80	21,46	10,39	0,48
PGSC0003DMT400032107	4,77	5,77	7,48	3,64	2,41	2,67	6,01	2,91	0,48
PGSC0003DMT400081443	32,41	33,49	41,63	17,92	17,57	16,53	35,84	17,34	0,48
PGSC0003DMT400079121	14,62	28,29	17,56	10,92	10,33	8,00	20,16	9,75	0,48
PGSC0003DMT400080580	237,66	281,17	227,66	126,82	113,68	120,50	248,83	120,33	0,48
PGSC0003DMT400019853	140,75	150,98	106,35	66,07	67,52	58,92	132,69	64,17	0,48
PGSC0003DMT400066765	102,31	96,71	73,50	44,79	45,13	41,86	90,84	43,93	0,48
PGSC0003DMT400055166	8,90	8,08	14,31	4,76	4,48	5,87	10,43	5,04	0,48

PGSC0003DMT400072585	35,59	49,65	53,34	27,99	22,39	16,53	46,19	22,30	0,48
PGSC0003DMT400080556	3,81	5,77	5,85	2,80	1,72	2,93	5,14	2,48	0,48
PGSC0003DMT400037555	35,59	40,41	40,65	26,04	14,81	15,20	38,88	18,68	0,48
PGSC0003DMT400067288	8,26	8,95	10,08	3,36	6,55	3,20	9,10	4,37	0,48
PGSC0003DMT400029420	3,81	6,35	5,85	2,80	2,76	2,13	5,34	2,56	0,48
PGSC0003DMT400078201	105,17	97,57	85,21	43,67	47,88	46,65	95,98	46,07	0,48
PGSC0003DMT400030737	13,98	21,36	20,16	8,96	8,61	9,06	18,50	8,88	0,48
PGSC0003DMT400009458	18,11	17,90	16,59	11,20	6,55	7,46	17,53	8,40	0,48
PGSC0003DMT400061878	6,67	5,20	6,50	4,20	1,38	3,20	6,12	2,93	0,48
PGSC0003DMT400001995	36,54	40,70	59,52	23,52	19,98	21,86	45,59	21,79	0,48
PGSC0003DMT400064270	28,60	27,14	27,64	14,56	12,75	12,53	27,79	13,28	0,48
PGSC0003DMT400018161	5,40	4,04	7,15	1,96	2,76	3,20	5,53	2,64	0,48
PGSC0003DMT400025041	23,51	14,43	15,61	10,08	4,82	10,66	17,85	8,52	0,48
PGSC0003DMT400012208	362,53	374,41	346,36	183,93	162,59	168,22	361,10	171,58	0,48
PGSC0003DMT400039985	26,69	28,29	27,64	16,24	8,61	14,40	27,54	13,08	0,48
PGSC0003DMT400023497	7,94	14,72	10,08	6,72	4,82	4,00	10,91	5,18	0,47
PGSC0003DMT400010187	3,81	7,22	9,43	2,80	3,44	3,47	6,82	3,24	0,47
PGSC0003DMT400062501	12,71	11,55	17,24	8,68	3,79	7,20	13,83	6,56	0,47
PGSC0003DMT400042507	5,40	6,93	11,71	5,04	2,07	4,27	8,01	3,79	0,47
PGSC0003DMT400066608	11,12	12,70	12,36	7,28	3,44	6,40	12,06	5,71	0,47
PGSC0003DMT400009277	29,55	30,60	29,92	19,32	11,02	12,26	30,02	14,20	0,47
PGSC0003DMT400058336	7,63	11,55	11,06	4,20	3,44	6,66	10,08	4,77	0,47
PGSC0003DMT400008365	10,80	9,53	12,36	4,20	3,79	7,46	10,90	5,15	0,47
PGSC0003DMT400036429	4,45	5,48	4,88	2,52	2,07	2,40	4,94	2,33	0,47
PGSC0003DMT400064740	9,21	13,28	18,54	9,52	3,44	6,40	13,68	6,45	0,47
PGSC0003DMT400001703	18,43	19,05	22,12	13,16	6,89	8,00	19,87	9,35	0,47
PGSC0003DMT400075163	45,44	56,00	38,38	22,40	16,19	27,19	46,61	21,93	0,47
PGSC0003DMT400006726	8,58	7,51	9,43	4,48	3,79	3,73	8,51	4,00	0,47
PGSC0003DMT400026996	5,08	8,08	9,76	4,20	3,10	3,47	7,64	3,59	0,47

PGSC0003DMT400047049	12,07	11,84	15,94	8,96	3,10	6,66	13,28	6,24	0,47
PGSC0003DMT400063313	22,24	20,78	27,64	12,60	12,06	8,53	23,55	11,06	0,47
PGSC0003DMT400013759	5,40	8,08	9,11	4,76	3,44	2,40	7,53	3,53	0,47
PGSC0003DMT400021958	13,34	15,30	12,68	9,52	5,86	4,00	13,77	6,46	0,47
PGSC0003DMT400031704	16,84	17,32	13,66	5,32	7,23	9,86	15,94	7,47	0,47
PGSC0003DMT400008532	6,67	10,10	8,13	5,32	2,07	4,27	8,30	3,89	0,47
PGSC0003DMT400002692	45,12	49,07	53,01	28,55	24,11	16,26	49,07	22,97	0,47
PGSC0003DMT400004187	8,58	10,39	11,38	5,88	3,79	4,53	10,12	4,73	0,47
PGSC0003DMT400057529	36,54	32,62	31,87	17,36	14,12	15,73	33,68	15,74	0,47
PGSC0003DMT400067513	10,49	11,55	10,41	6,16	2,07	6,93	10,82	5,05	0,47
PGSC0003DMT400039856	20,65	20,78	19,51	10,36	8,96	9,06	20,31	9,46	0,47
PGSC0003DMT400082499	7,63	6,93	5,20	3,36	3,44	2,40	6,59	3,07	0,47
PGSC0003DMT400061545	8,58	12,41	22,77	8,96	4,48	6,93	14,59	6,79	0,47
PGSC0003DMT400039494	10,17	24,54	23,09	7,28	8,96	10,66	19,27	8,97	0,47
PGSC0003DMT400072037	87,69	119,51	104,40	53,47	42,72	48,79	103,87	48,33	0,47
PGSC0003DMT400083187	4,13	6,64	5,85	3,08	1,72	2,93	5,54	2,58	0,47
PGSC0003DMT400067150	15,25	24,54	19,19	8,12	9,65	9,60	19,66	9,12	0,46
PGSC0003DMT400063728	13,34	20,78	19,51	11,48	6,20	7,20	17,88	8,29	0,46
PGSC0003DMT400076326	18,11	32,04	37,73	20,44	9,30	10,93	29,29	13,56	0,46
PGSC0003DMT400010576	19,70	23,96	27,64	13,16	8,61	11,20	23,77	10,99	0,46
PGSC0003DMT400079969	54,65	58,31	42,28	23,52	22,05	26,13	51,75	23,90	0,46
PGSC0003DMT400027906	5,72	6,93	6,50	3,92	1,72	3,20	6,38	2,95	0,46
PGSC0003DMT400012612	30,82	25,40	16,59	3,92	9,65	19,99	24,27	11,19	0,46
PGSC0003DMT400072365	13,34	11,84	17,24	7,56	5,86	6,13	14,14	6,52	0,46
PGSC0003DMT400011902	19,06	21,36	14,31	10,92	6,20	8,00	18,24	8,37	0,46
PGSC0003DMT400027077	12,71	10,68	13,98	7,28	5,86	4,00	12,46	5,71	0,46
PGSC0003DMT400005078	14,30	13,57	15,61	9,52	4,82	5,60	14,49	6,65	0,46
PGSC0003DMT400013022	12,39	24,83	24,07	8,40	9,30	10,40	20,43	9,37	0,46
PGSC0003DMT400027932	15,89	17,32	17,24	5,60	7,92	9,60	16,82	7,71	0,46



PGSC0003DMT400071399	19,70	17,03	16,91	9,52	7,58	7,46	17,88	8,19	0,46
PGSC0003DMT400051216	33,68	43,30	62,12	25,48	21,01	17,06	46,37	21,18	0,46
PGSC0003DMT400013221	7,94	12,99	14,96	5,88	5,17	5,33	11,96	5,46	0,46
PGSC0003DMT400037744	22,56	23,09	26,02	10,92	12,40	9,33	23,89	10,88	0,46
PGSC0003DMT400047304	7,31	12,99	25,04	10,92	1,72	8,00	15,11	6,88	0,46
PGSC0003DMT400012318	8,90	18,76	13,98	8,12	6,55	4,27	13,88	6,31	0,45
PGSC0003DMT400003443	9,85	13,86	21,14	9,52	2,07	8,80	14,95	6,80	0,45
PGSC0003DMT400013082	6,35	13,57	8,78	4,20	4,82	4,00	9,57	4,34	0,45
PGSC0003DMT400047206	6,35	4,04	5,20	2,52	2,41	2,13	5,20	2,35	0,45
PGSC0003DMT400077579	95,00	84,58	100,82	34,71	50,64	41,59	93,47	42,31	0,45
PGSC0003DMT400069680	22,88	25,69	31,87	11,76	15,85	8,80	26,81	12,14	0,45
PGSC0003DMT400069255	6,99	8,37	15,61	5,04	3,10	5,87	10,32	4,67	0,45
PGSC0003DMT400058256	4,45	6,35	6,18	2,52	2,76	2,40	5,66	2,56	0,45
PGSC0003DMT400010432	2,54	6,93	6,83	3,08	2,41	1,87	5,43	2,45	0,45
PGSC0003DMT400080148	5,72	5,48	6,18	3,64	2,07	2,13	5,79	2,61	0,45
PGSC0003DMT400011069	8,26	9,24	14,31	6,44	3,10	4,80	10,60	4,78	0,45
PGSC0003DMT400049542	17,48	16,74	19,51	6,72	8,96	8,53	17,91	8,07	0,45
PGSC0003DMT400023788	10,49	8,08	7,81	4,48	2,07	5,33	8,79	3,96	0,45
PGSC0003DMT400068062	9,53	5,77	11,06	4,20	2,07	5,60	8,79	3,96	0,45
PGSC0003DMT400078046	11,44	6,93	8,13	4,48	3,44	4,00	8,83	3,97	0,45
PGSC0003DMT400054502	11,12	13,28	6,50	2,24	5,51	6,13	10,30	4,63	0,45
PGSC0003DMT400081285	5,40	4,62	6,83	2,52	3,44	1,60	5,62	2,52	0,45
PGSC0003DMT400063111	4,45	8,37	7,15	2,52	2,41	4,00	6,66	2,98	0,45
PGSC0003DMT400026013	6,67	5,20	7,15	2,80	2,76	2,93	6,34	2,83	0,45
PGSC0003DMT400004027	53,70	61,78	85,21	34,99	34,79	19,73	66,90	29,84	0,45
PGSC0003DMT400003546	23,51	18,19	24,72	8,40	12,40	8,80	22,14	9,87	0,45
PGSC0003DMT400075051	5,08	7,51	9,11	1,68	5,86	2,13	7,23	3,22	0,45
PGSC0003DMT400043688	56,56	56,00	73,50	26,60	34,45	21,86	62,02	27,64	0,45
PGSC0003DMT400040198	14,30	12,70	13,66	6,72	5,51	5,87	13,55	6,03	0,45

PGSC0003DMT400062238	27,01	28,87	33,17	15,68	12,75	11,20	29,68	13,21	0,45
PGSC0003DMT400013627	45,12	34,06	49,11	17,08	27,21	12,80	42,76	19,03	0,45
PGSC0003DMT400057734	59,10	39,26	24,07	21,00	15,85	17,60	40,81	18,15	0,44
PGSC0003DMT400015950	8,90	5,20	6,50	2,52	3,44	3,20	6,87	3,05	0,44
PGSC0003DMT400064073	24,15	25,69	29,60	14,28	9,99	10,93	26,48	11,73	0,44
PGSC0003DMT400013351	33,36	30,89	45,21	12,04	19,64	16,80	36,49	16,16	0,44
PGSC0003DMT400015267	14,93	17,90	21,79	12,04	6,55	5,60	18,21	8,06	0,44
PGSC0003DMT400063509	60,37	53,69	33,82	21,84	20,67	22,93	49,29	21,81	0,44
PGSC0003DMT400007494	35,59	35,22	41,63	23,52	13,09	13,06	37,48	16,56	0,44
PGSC0003DMT400044605	42,26	34,35	29,27	15,96	14,81	16,00	35,29	15,59	0,44
PGSC0003DMT400082121	4,45	7,22	5,53	1,68	1,38	4,53	5,73	2,53	0,44
PGSC0003DMT400060056	17,16	14,15	27,32	12,32	3,10	10,40	19,54	8,61	0,44
PGSC0003DMT400002448	5,40	4,91	6,83	3,36	3,10	1,07	5,71	2,51	0,44
PGSC0003DMT400067602	8,58	9,24	10,08	5,32	3,44	3,47	9,30	4,08	0,44
PGSC0003DMT400009330	57,19	47,05	53,66	21,28	22,74	25,06	52,63	23,03	0,44
PGSC0003DMT400056316	52,43	68,99	58,54	33,59	20,32	24,79	59,99	26,23	0,44
PGSC0003DMT400076694	18,75	11,26	15,61	7,28	4,13	8,53	15,21	6,65	0,44
PGSC0003DMT400009723	9,53	7,51	7,48	2,24	2,07	6,40	8,17	3,57	0,44
PGSC0003DMT400008621	23,83	19,34	20,49	11,20	9,65	6,93	21,22	9,26	0,44
PGSC0003DMT400039887	14,30	13,57	13,66	9,80	3,79	4,53	13,84	6,04	0,44
PGSC0003DMT400025559	44,80	38,97	39,35	23,52	12,06	18,13	41,04	17,90	0,44
PGSC0003DMT400015945	32,73	37,82	34,15	16,52	16,88	12,26	34,90	15,22	0,44
PGSC0003DMT400057642	154,10	128,75	101,47	50,67	55,81	61,05	128,11	55,84	0,44
PGSC0003DMT400010401	15,57	13,28	22,12	6,16	9,65	6,40	16,99	7,40	0,44
PGSC0003DMT400043542	28,60	20,50	22,44	8,12	9,65	13,33	23,85	10,37	0,43
PGSC0003DMT400040854	2,86	4,91	2,93	1,40	1,38	1,87	3,57	1,55	0,43
PGSC0003DMT400076601	499,15	494,21	470,27	234,32	202,21	199,42	487,88	211,98	0,43
PGSC0003DMT400026836	10,80	4,62	5,85	4,76	2,07	2,40	7,09	3,08	0,43
PGSC0003DMT400081416	96,59	107,39	44,56	38,07	33,76	35,99	82,85	35,94	0,43

PGSC0003DMT400023308	4,45	4,91	9,11	2,24	3,10	2,67	6,16	2,67	0,43
PGSC0003DMT400041748	20,65	31,18	42,60	20,72	6,89	13,33	31,48	13,65	0,43
PGSC0003DMT400009380	10,80	10,10	11,06	6,44	4,48	2,93	10,65	4,62	0,43
PGSC0003DMT400013662	8,58	6,35	14,31	3,92	5,51	3,20	9,75	4,21	0,43
PGSC0003DMT400023120	2,22	4,33	7,81	2,80	2,07	1,33	4,79	2,07	0,43
PGSC0003DMT400020398	6,04	6,06	9,11	3,92	3,10	2,13	7,07	3,05	0,43
PGSC0003DMT400062848	9,85	11,84	14,31	3,36	5,51	6,66	12,00	5,18	0,43
PGSC0003DMT400069530	27,96	25,98	33,82	12,04	14,81	10,93	29,25	12,59	0,43
PGSC0003DMT400005677	4,77	4,33	6,50	2,80	3,10	0,80	5,20	2,23	0,43
PGSC0003DMT400038560	55,92	46,77	42,60	18,48	22,05	21,86	48,43	20,80	0,43
PGSC0003DMT400010343	31,46	35,51	41,30	18,20	16,53	11,73	36,09	15,49	0,43
PGSC0003DMT400045643	6,67	7,22	7,15	4,48	2,41	2,13	7,01	3,01	0,43
PGSC0003DMT400076957	32,41	28,29	23,09	11,76	8,96	15,20	27,93	11,97	0,43
PGSC0003DMT400032693	15,57	9,53	10,73	3,92	5,51	5,87	11,94	5,10	0,43
PGSC0003DMT400045523	177,93	167,43	147,65	74,47	67,17	68,78	164,34	70,14	0,43
PGSC0003DMT400083142	8,90	13,28	18,21	7,84	3,79	5,60	13,46	5,74	0,43
PGSC0003DMT400079598	13,66	17,32	29,60	14,00	1,38	10,40	20,19	8,59	0,43
PGSC0003DMT400036621	107,39	101,33	89,44	41,99	40,30	44,52	99,39	42,27	0,43
PGSC0003DMT400032085	29,23	19,92	15,29	11,20	10,33	5,87	21,48	9,13	0,43
PGSC0003DMT400043699	85,47	81,41	105,37	43,67	39,27	32,79	90,75	38,58	0,43
PGSC0003DMT400027884	3,50	6,06	5,85	2,24	1,38	2,93	5,14	2,18	0,43
PGSC0003DMT400048713	66,09	50,23	58,54	19,32	24,80	30,13	58,29	24,75	0,42
PGSC0003DMT400079209	5,40	12,70	7,81	4,76	2,76	3,47	8,64	3,66	0,42
PGSC0003DMT400067709	2,86	4,91	5,20	2,52	1,38	1,60	4,32	1,83	0,42
PGSC0003DMT400063855	54,97	60,04	50,41	28,55	19,98	21,59	55,14	23,37	0,42
PGSC0003DMT400037628	6,35	9,53	12,03	4,20	3,10	4,53	9,30	3,94	0,42
PGSC0003DMT400026051	175,70	178,69	166,51	85,66	59,94	75,18	173,63	73,59	0,42
PGSC0003DMT400077068	24,47	37,82	38,70	14,28	11,71	16,80	33,66	14,26	0,42
PGSC0003DMT400042613	8,90	10,39	5,85	6,16	2,07	2,40	8,38	3,54	0,42

PGSC0003DMT400035346	5,08	6,93	9,43	2,80	5,17	1,07	7,15	3,01	0,42
PGSC0003DMT400023454	4,45	6,35	6,50	2,80	2,07	2,40	5,77	2,42	0,42
PGSC0003DMT400017939	6,67	8,95	12,68	5,32	3,10	3,47	9,43	3,96	0,42
PGSC0003DMT400075635	8,26	4,04	5,20	2,80	2,41	2,13	5,83	2,45	0,42
PGSC0003DMT400095425	21,61	22,23	27,32	10,64	11,71	7,46	23,72	9,94	0,42
PGSC0003DMT400003537	12,71	11,84	7,81	5,60	2,07	5,87	10,79	4,51	0,42
PGSC0003DMT400032692	7,94	2,89	8,46	1,96	3,44	2,67	6,43	2,69	0,42
PGSC0003DMT400025575	18,43	19,34	19,84	10,64	7,58	5,87	19,20	8,03	0,42
PGSC0003DMT400056986	23,19	21,36	17,89	8,96	8,61	8,53	20,81	8,70	0,42
PGSC0003DMT400055866	25,10	27,71	33,50	12,88	11,71	11,46	28,77	12,02	0,42
PGSC0003DMT400084751	17,16	10,97	6,83	5,04	4,48	5,07	11,65	4,86	0,42
PGSC0003DMT400061578	4,77	4,33	4,88	0,56	2,07	3,20	4,66	1,94	0,42
PGSC0003DMT400034896	6,67	8,66	11,71	5,04	2,76	3,47	9,01	3,76	0,42
PGSC0003DMT400036586	19,70	15,30	29,92	8,96	8,96	9,06	21,64	8,99	0,42
PGSC0003DMT400027544	6,67	6,35	5,85	3,08	1,03	3,73	6,29	2,61	0,42
PGSC0003DMT400013135	57,51	62,35	38,38	24,64	18,60	22,39	52,75	21,88	0,41
PGSC0003DMT400029702	36,54	45,03	37,73	16,80	13,43	19,20	39,77	16,48	0,41
PGSC0003DMT400004090	8,90	9,53	8,78	5,04	2,76	3,47	9,07	3,76	0,41
PGSC0003DMT400044232	10,17	9,24	8,46	5,04	2,76	3,73	9,29	3,84	0,41
PGSC0003DMT400065322	2,22	3,46	3,58	1,12	1,38	1,33	3,09	1,28	0,41
PGSC0003DMT400074078	7,94	7,79	6,18	1,96	3,10	4,00	7,30	3,02	0,41
PGSC0003DMT400076909	51,47	40,99	33,17	15,40	13,43	22,93	41,88	17,25	0,41
PGSC0003DMT400048000	27,64	36,66	31,22	18,76	8,27	12,26	31,84	13,10	0,41
PGSC0003DMT400033749	25,10	16,17	16,91	8,96	4,82	10,13	19,39	7,97	0,41
PGSC0003DMT400031252	92,78	96,71	79,03	34,43	38,58	37,32	89,51	36,78	0,41
PGSC0003DMT400078369	2,86	4,04	4,88	1,40	1,03	2,40	3,93	1,61	0,41
PGSC0003DMT400063407	15,57	16,45	18,54	10,64	4,48	5,60	16,85	6,91	0,41
PGSC0003DMT400060105	13,98	18,76	25,04	9,80	5,86	8,00	19,26	7,89	0,41
PGSC0003DMT400045472	29,23	41,86	46,51	21,56	11,37	15,20	39,20	16,04	0,41

PGSC0003DMT400060171	133,13	135,39	91,06	50,11	47,19	49,85	119,86	49,05	0,41
PGSC0003DMT400030898	19,06	24,83	33,82	12,04	8,27	11,46	25,90	10,59	0,41
PGSC0003DMT400037864	6,99	9,53	8,78	4,20	3,44	2,67	8,43	3,44	0,41
PGSC0003DMT400004792	30,18	34,64	37,08	15,40	14,12	12,00	33,97	13,84	0,41
PGSC0003DMT400058744	9,85	11,55	17,89	4,76	7,23	4,00	13,10	5,33	0,41
PGSC0003DMT400015719	124,23	128,75	69,60	44,51	38,24	48,52	107,53	43,76	0,41
PGSC0003DMT400007951	17,48	17,32	20,81	11,76	5,51	5,33	18,54	7,53	0,41
PGSC0003DMT400060472	13,34	18,48	20,16	5,88	7,23	8,00	17,33	7,04	0,41
PGSC0003DMT400042516	4,77	3,75	5,20	2,52	1,72	1,33	4,57	1,86	0,41
PGSC0003DMT400065262	8,90	6,06	7,15	2,24	3,79	2,93	7,37	2,99	0,41
PGSC0003DMT400015006	10,80	7,22	3,58	2,52	2,76	3,47	7,20	2,92	0,41
PGSC0003DMT400016688	4,13	4,04	4,23	1,96	1,72	1,33	4,13	1,67	0,40
PGSC0003DMT400043083	8,90	9,24	9,43	2,80	3,79	4,53	9,19	3,71	0,40
PGSC0003DMT400036707	8,26	19,05	19,84	10,08	4,13	4,80	15,72	6,34	0,40
PGSC0003DMT400070005	3,81	3,75	3,58	1,40	0,69	2,40	3,71	1,50	0,40
PGSC0003DMT400022827	30,82	13,57	17,56	8,68	5,86	10,40	20,65	8,31	0,40
PGSC0003DMT400074322	9,53	6,93	11,38	4,48	3,79	2,93	9,28	3,73	0,40
PGSC0003DMT400066524	6,35	2,02	7,81	0,84	3,79	1,87	5,39	2,17	0,40
PGSC0003DMT400022189	2,22	2,89	4,23	1,12	1,03	1,60	3,11	1,25	0,40
PGSC0003DMT400042213	21,29	23,38	25,37	11,20	9,99	6,93	23,35	9,37	0,40
PGSC0003DMT400005783	2,86	5,77	8,46	2,80	1,38	2,67	5,70	2,28	0,40
PGSC0003DMT400015923	5,40	6,64	6,18	3,08	2,07	2,13	6,07	2,43	0,40
PGSC0003DMT400079535	15,89	26,56	34,80	9,80	8,96	12,00	25,75	10,25	0,40
PGSC0003DMT400063237	16,52	21,94	30,25	7,00	9,65	10,66	22,90	9,10	0,40
PGSC0003DMT400045319	16,52	11,55	7,15	6,16	2,76	5,07	11,74	4,66	0,40
PGSC0003DMT400005484	10,49	8,66	17,24	4,20	5,17	5,07	12,13	4,81	0,40
PGSC0003DMT400015982	36,86	46,48	48,13	24,08	16,88	11,20	43,82	17,39	0,40
PGSC0003DMT400058224	32,73	28,87	14,96	10,08	8,96	11,20	25,52	10,08	0,39
PGSC0003DMT400017804	33,36	15,30	24,07	7,84	8,27	12,53	24,24	9,55	0,39

PGSC0003DMT400036885	36,54	35,22	19,51	9,52	9,30	17,06	30,42	11,96	0,39
PGSC0003DMT400011693	122,96	129,33	122,93	52,91	45,82	48,52	125,07	49,08	0,39
PGSC0003DMT400065015	16,52	18,76	18,54	8,40	5,51	7,20	17,94	7,04	0,39
PGSC0003DMT400026096	9,85	8,95	6,50	2,24	4,48	3,20	8,43	3,31	0,39
PGSC0003DMT400044724	34,95	30,02	29,60	13,16	12,06	11,73	31,52	12,32	0,39
PGSC0003DMT400010052	7,94	6,35	4,55	2,24	1,38	3,73	6,28	2,45	0,39
PGSC0003DMT400043117	34,95	36,37	43,58	20,16	12,40	12,26	38,30	14,94	0,39
PGSC0003DMT400078583	6,99	6,64	12,36	5,32	2,41	2,40	8,66	3,38	0,39
PGSC0003DMT400080942	32,73	47,63	54,64	18,76	17,57	16,26	45,00	17,53	0,39
PGSC0003DMT400013376	75,30	90,07	77,73	32,47	30,66	31,46	81,03	31,53	0,39
PGSC0003DMT400060932	14,30	18,76	23,74	10,36	5,86	5,87	18,93	7,36	0,39
PGSC0003DMT400074499	30,50	33,78	49,11	15,96	14,12	13,86	37,80	14,65	0,39
PGSC0003DMT400038659	61,64	46,48	45,21	18,48	18,60	22,13	51,11	19,74	0,39
PGSC0003DMT400025719	32,73	36,66	44,88	17,92	11,71	14,40	38,09	14,68	0,39
PGSC0003DMT400032166	49,25	38,11	37,40	17,36	13,09	17,60	41,59	16,02	0,39
PGSC0003DMT400078022	300,25	294,74	260,50	120,66	107,48	101,31	285,16	109,82	0,39
PGSC0003DMT400055256	4,77	5,77	2,93	2,24	2,41	0,53	4,49	1,73	0,38
PGSC0003DMT400065103	5,40	11,26	12,68	4,48	1,72	5,07	9,78	3,76	0,38
PGSC0003DMT400018580	17,16	10,10	13,01	4,48	4,82	6,13	13,42	5,14	0,38
PGSC0003DMT400036833	77,53	72,17	67,97	26,04	28,25	29,06	72,56	27,78	0,38
PGSC0003DMT400073335	19,06	17,32	17,24	8,40	4,13	8,00	17,87	6,84	0,38
PGSC0003DMT400027074	5,72	6,06	12,36	4,76	2,07	2,40	8,05	3,08	0,38
PGSC0003DMT400065263	5,40	3,75	3,58	1,96	1,03	1,87	4,24	1,62	0,38
PGSC0003DMT400024250	6,67	5,48	5,53	2,24	1,03	3,47	5,89	2,25	0,38
PGSC0003DMT400062931	20,97	24,25	17,24	8,96	5,51	9,33	20,82	7,93	0,38
PGSC0003DMT400052475	9,53	8,66	10,08	4,20	3,10	3,47	9,42	3,59	0,38
PGSC0003DMT400084332	26,69	28,58	20,16	8,40	7,23	13,06	25,14	9,56	0,38
PGSC0003DMT400026229	6,99	5,77	6,83	2,80	1,72	2,93	6,53	2,48	0,38
PGSC0003DMT400023921	5,40	4,33	1,95	1,12	1,72	1,60	3,89	1,48	0,38

PGSC0003DMT400035809	4,77	11,26	13,33	3,92	2,41	4,80	9,79	3,71	0,38
PGSC0003DMT400009450	12,71	13,57	13,66	6,16	3,10	5,87	13,31	5,04	0,38
PGSC0003DMT400001259	9,85	10,68	6,18	3,08	2,76	4,27	8,90	3,37	0,38
PGSC0003DMT400019324	16,84	20,21	30,90	9,80	8,96	6,93	22,65	8,56	0,38
PGSC0003DMT400079728	19,06	18,76	18,86	8,40	6,89	6,13	18,89	7,14	0,38
PGSC0003DMT400049875	2,86	2,89	3,90	1,12	1,72	0,80	3,22	1,21	0,38
PGSC0003DMT400015306	13,98	14,72	11,71	4,48	3,79	6,93	13,47	5,07	0,38
PGSC0003DMT400031070	7,63	14,15	10,73	4,20	3,44	4,53	10,84	4,06	0,37
PGSC0003DMT400014178	3,81	3,75	2,28	1,12	0,69	1,87	3,28	1,23	0,37
PGSC0003DMT400077927	64,50	65,24	48,78	24,92	22,05	19,73	59,51	22,23	0,37
PGSC0003DMT400073334	3,50	4,62	5,85	1,96	1,38	1,87	4,66	1,74	0,37
PGSC0003DMT400025690	14,30	15,59	21,46	7,84	5,17	6,13	17,12	6,38	0,37
PGSC0003DMT400011908	2,22	3,75	8,13	2,80	1,38	1,07	4,70	1,75	0,37
PGSC0003DMT400068478	2,54	3,18	3,58	1,68	0,69	1,07	3,10	1,15	0,37
PGSC0003DMT400022484	4,77	7,22	7,48	3,08	1,72	2,40	6,49	2,40	0,37
PGSC0003DMT400025813	4,77	2,89	5,85	2,52	0,34	2,13	4,50	1,66	0,37
PGSC0003DMT400064413	115,97	111,72	96,59	43,95	33,41	42,39	108,09	39,92	0,37
PGSC0003DMT400068040	11,44	13,28	14,64	5,88	1,72	6,93	13,12	4,84	0,37
PGSC0003DMT400044185	16,20	20,50	25,04	8,12	4,48	10,13	20,58	7,58	0,37
PGSC0003DMT400062461	10,17	17,03	31,22	8,40	7,23	5,87	19,47	7,17	0,37
PGSC0003DMT400020558	4,13	4,33	7,15	1,96	1,38	2,40	5,20	1,91	0,37
PGSC0003DMT400078008	109,62	109,70	64,07	27,43	35,14	41,59	94,46	34,72	0,37
PGSC0003DMT400082764	6,04	7,51	9,11	2,52	2,07	3,73	7,55	2,77	0,37
PGSC0003DMT400040456	9,21	9,53	8,78	6,16	2,07	1,87	9,17	3,37	0,37
PGSC0003DMT400006558	62,91	56,29	48,46	14,56	17,91	29,06	55,89	20,51	0,37
PGSC0003DMT400021142	70,85	71,88	68,95	24,64	25,84	27,19	70,56	25,89	0,37
PGSC0003DMT400060970	6,04	5,20	4,55	2,80	1,38	1,60	5,26	1,93	0,37
PGSC0003DMT400021064	3,18	4,91	5,85	0,56	2,41	2,13	4,65	1,70	0,37
PGSC0003DMT400060724	40,67	42,15	32,85	15,12	13,78	13,33	38,56	14,08	0,37

PGSC0003DMT400045958	3,81	5,77	7,15	3,36	0,34	2,40	5,58	2,03	0,36
PGSC0003DMT400028000	2,54	3,75	4,88	1,96	1,03	1,07	3,72	1,35	0,36
PGSC0003DMT400079394	47,02	37,82	33,17	18,48	7,58	16,80	39,34	14,29	0,36
PGSC0003DMT400010093	6,99	7,22	5,20	3,64	2,07	1,33	6,47	2,35	0,36
PGSC0003DMT400013128	5,72	2,60	3,90	0,84	1,72	1,87	4,07	1,48	0,36
PGSC0003DMT400061535	25,74	17,61	18,86	8,68	5,86	8,00	20,74	7,51	0,36
PGSC0003DMT400030107	11,76	5,48	8,46	1,68	3,10	4,53	8,57	3,10	0,36
PGSC0003DMT400074935	1,27	3,46	3,25	1,40	0,69	0,80	2,66	0,96	0,36
PGSC0003DMT400058277	4,45	4,33	5,85	1,96	1,72	1,60	4,88	1,76	0,36
PGSC0003DMT400000042	3,81	6,64	5,85	1,68	2,07	2,13	5,43	1,96	0,36
PGSC0003DMT400043219	10,49	6,93	8,46	2,52	4,13	2,67	8,63	3,11	0,36
PGSC0003DMT400052476	6,04	6,64	8,78	4,20	1,38	2,13	7,15	2,57	0,36
PGSC0003DMT400069577	84,83	75,34	80,33	29,39	29,28	27,73	80,17	28,80	0,36
PGSC0003DMT400040125	14,93	16,17	11,06	4,76	3,44	6,93	14,05	5,04	0,36
PGSC0003DMT400063461	10,17	6,35	4,55	2,52	3,44	1,60	7,02	2,52	0,36
PGSC0003DMT400056985	16,20	14,72	11,38	5,88	3,10	6,13	14,10	5,04	0,36
PGSC0003DMT400057936	2,54	5,48	8,78	3,08	1,03	1,87	5,60	1,99	0,36
PGSC0003DMT400017206	5,40	6,06	8,13	2,52	3,10	1,33	6,53	2,32	0,35
PGSC0003DMT400013718	2,22	2,02	3,58	1,12	1,38	0,27	2,61	0,92	0,35
PGSC0003DMT400011224	2,54	3,18	2,60	0,84	1,03	1,07	2,77	0,98	0,35
PGSC0003DMT400022748	213,20	217,37	144,72	71,95	61,32	69,85	191,76	67,71	0,35
PGSC0003DMT400062404	21,61	24,83	17,89	7,56	7,92	7,20	21,44	7,56	0,35
PGSC0003DMT400088558	4,13	5,48	6,83	1,40	1,72	2,67	5,48	1,93	0,35
PGSC0003DMT400010294	153,14	150,40	114,48	54,59	41,68	50,92	139,34	49,06	0,35
PGSC0003DMT400066949	5,72	3,75	11,38	2,52	2,41	2,40	6,95	2,44	0,35
PGSC0003DMT400070986	56,24	90,93	41,95	19,88	21,70	24,53	63,04	22,04	0,35
PGSC0003DMT400001376	20,33	21,07	10,41	6,16	5,51	6,40	17,27	6,02	0,35
PGSC0003DMT400007587	88,33	93,53	56,59	23,80	27,21	31,99	79,48	27,67	0,35
PGSC0003DMT400000051	4,13	7,51	6,83	1,68	2,07	2,67	6,16	2,14	0,35



PGSC0003DMT400009575	21,61	22,81	26,67	9,80	6,89	8,00	23,70	8,23	0,35
PGSC0003DMT400015775	5,72	6,64	7,48	3,08	0,34	3,47	6,61	2,30	0,35
PGSC0003DMT400069000	14,93	18,48	22,44	7,00	5,17	7,20	18,62	6,46	0,35
PGSC0003DMT400048609	48,61	49,65	37,73	13,44	15,16	18,40	45,33	15,67	0,35
PGSC0003DMT400009196	1,59	3,46	6,83	1,12	1,38	1,60	3,96	1,37	0,35
PGSC0003DMT400066123	149,97	153,00	64,72	43,39	35,48	47,19	122,56	42,02	0,34
PGSC0003DMT400068395	5,40	4,91	2,60	1,40	0,34	2,67	4,30	1,47	0,34
PGSC0003DMT400022011	2,22	3,18	1,95	0,84	0,34	1,33	2,45	0,84	0,34
PGSC0003DMT400057519	7,31	10,68	6,83	3,08	3,79	1,60	8,27	2,82	0,34
PGSC0003DMT400078219	6,67	8,95	4,55	1,96	1,72	3,20	6,72	2,29	0,34
PGSC0003DMT400024594	450,22	456,40	304,41	140,53	125,73	145,83	403,68	137,36	0,34
PGSC0003DMT400045765	67,36	45,03	25,04	15,96	12,40	18,40	45,81	15,59	0,34
PGSC0003DMT400058674	5,08	4,91	5,20	1,68	2,41	1,07	5,06	1,72	0,34
PGSC0003DMT400045857	3,18	4,62	5,20	1,96	1,38	1,07	4,33	1,47	0,34
PGSC0003DMT400080350	4,45	5,20	5,20	2,24	1,72	1,07	4,95	1,68	0,34
PGSC0003DMT400008692	15,25	13,86	25,69	7,28	7,23	4,00	18,27	6,17	0,34
PGSC0003DMT400031783	2,86	1,73	3,58	0,84	1,38	0,53	2,72	0,92	0,34
PGSC0003DMT400036925	20,65	19,92	5,20	4,48	4,48	6,40	15,26	5,12	0,34
PGSC0003DMT400047340	19,70	12,99	5,20	4,48	4,48	3,73	12,63	4,23	0,33
PGSC0003DMT400031803	73,71	43,01	30,25	13,16	14,12	21,86	48,99	16,38	0,33
PGSC0003DMT400014217	108,35	104,21	100,49	35,27	29,97	39,19	104,35	34,81	0,33
PGSC0003DMT400078006	127,73	123,26	100,49	35,55	33,76	47,72	117,16	39,01	0,33
PGSC0003DMT400002156	5,72	3,75	12,36	1,12	2,41	3,73	7,28	2,42	0,33
PGSC0003DMT400032793	1,59	4,62	6,83	1,96	1,03	1,33	4,35	1,44	0,33
PGSC0003DMT400004212	15,57	23,38	25,69	9,52	6,55	5,33	21,55	7,13	0,33
PGSC0003DMT400016038	4,77	4,33	0,65	1,12	1,03	1,07	3,25	1,07	0,33
PGSC0003DMT400079206	4,45	10,68	6,50	3,36	1,38	2,40	7,21	2,38	0,33
PGSC0003DMT400055930	142,34	146,94	100,17	45,63	36,51	46,39	129,82	42,84	0,33
PGSC0003DMT400049703	186,19	174,36	128,46	53,47	49,26	58,12	163,00	53,62	0,33

PGSC0003DMT400086118	5,72	8,95	6,50	1,96	2,07	2,93	7,06	2,32	0,33
PGSC0003DMT400014404	3,50	4,91	3,90	1,40	1,03	1,60	4,10	1,34	0,33
PGSC0003DMT400066694	6,67	8,95	10,41	2,52	2,76	3,20	8,68	2,83	0,33
PGSC0003DMT400066762	98,50	105,66	70,25	31,91	22,74	34,66	91,47	29,77	0,33
PGSC0003DMT400048136	3,50	4,91	3,25	1,96	1,03	0,80	3,89	1,26	0,33
PGSC0003DMT400005594	32,73	56,29	68,95	18,48	13,09	19,73	52,66	17,10	0,32
PGSC0003DMT400040010	4,13	11,26	9,76	4,20	2,07	1,87	8,38	2,71	0,32
PGSC0003DMT400032096	5,40	7,51	4,23	1,12	1,72	2,67	5,71	1,84	0,32
PGSC0003DMT400016741	8,90	6,35	5,85	2,24	2,41	2,13	7,03	2,26	0,32
PGSC0003DMT400022474	5,40	6,35	7,48	2,52	0,69	2,93	6,41	2,05	0,32
PGSC0003DMT400022743	38,45	34,06	24,39	9,24	8,61	13,06	32,30	10,30	0,32
PGSC0003DMT400019032	6,99	9,81	7,81	2,24	2,41	3,20	8,20	2,62	0,32
PGSC0003DMT400006800	11,12	14,72	20,81	3,92	4,82	6,13	15,55	4,96	0,32
PGSC0003DMT400036505	2,22	1,73	2,93	1,12	0,00	1,07	2,29	0,73	0,32
PGSC0003DMT400004325	4,13	8,08	5,20	3,08	1,38	1,07	5,80	1,84	0,32
PGSC0003DMT400011345	3,81	8,08	2,28	1,68	0,69	2,13	4,72	1,50	0,32
PGSC0003DMT400009359	3,81	7,51	10,08	3,08	1,03	2,67	7,13	2,26	0,32
PGSC0003DMT400015077	4,13	5,20	7,81	2,80	1,03	1,60	5,71	1,81	0,32
PGSC0003DMT400072433	3,50	2,31	4,88	0,56	0,69	2,13	3,56	1,13	0,32
PGSC0003DMT400071774	6,04	5,20	5,20	2,24	2,41	0,53	5,48	1,73	0,32
PGSC0003DMT400050270	34,00	33,78	15,94	7,84	7,23	11,20	27,91	8,76	0,31
PGSC0003DMT400039557	2,22	2,60	3,25	1,12	0,34	1,07	2,69	0,84	0,31
PGSC0003DMT400062402	3,50	8,95	6,18	2,52	1,72	1,60	6,21	1,95	0,31
PGSC0003DMT400079507	2,22	3,18	2,28	0,84	1,03	0,53	2,56	0,80	0,31
PGSC0003DMT400082405	4,45	4,33	4,23	1,96	1,03	1,07	4,34	1,35	0,31
PGSC0003DMT400064813	17,16	18,48	13,01	7,00	4,13	4,00	16,22	5,04	0,31
PGSC0003DMT400037336	399,70	399,82	383,11	139,41	111,27	114,90	394,21	121,86	0,31
PGSC0003DMT400035264	21,29	14,15	26,99	7,28	5,86	6,13	20,81	6,42	0,31
PGSC0003DMT400014515	2,86	4,04	1,95	0,28	1,38	1,07	2,95	0,91	0,31

PGSC0003DMT400037745	5,40	5,77	7,48	2,24	1,38	2,13	6,22	1,92	0,31
PGSC0003DMT400083090	8,58	6,64	10,08	1,40	3,44	2,93	8,43	2,59	0,31
PGSC0003DMT400037057	18,75	25,11	32,52	10,64	6,89	5,87	25,46	7,80	0,31
PGSC0003DMT400032878	2,22	6,35	3,25	1,40	0,34	1,87	3,94	1,20	0,31
PGSC0003DMT400058045	3,81	2,31	3,25	0,84	0,69	1,33	3,12	0,95	0,31
PGSC0003DMT400017770	1,27	4,04	3,90	0,56	1,72	0,53	3,07	0,94	0,31
PGSC0003DMT400029320	3,50	3,18	3,58	0,84	0,69	1,60	3,42	1,04	0,31
PGSC0003DMT400021420	21,61	38,97	42,93	10,08	8,96	12,53	34,50	10,52	0,30
PGSC0003DMT400047369	118,51	93,82	75,78	38,35	24,46	25,06	96,04	29,29	0,30
PGSC0003DMT400078463	209,06	170,03	141,47	60,75	44,09	53,85	173,52	52,90	0,30
PGSC0003DMT400055551	3,50	4,33	3,90	1,12	1,38	1,07	3,91	1,19	0,30
PGSC0003DMT400081452	4,77	9,24	14,64	3,08	2,41	3,20	9,55	2,90	0,30
PGSC0003DMT400083903	86,74	62,64	78,70	21,28	21,70	26,13	76,03	23,04	0,30
PGSC0003DMT400057164	3,81	3,46	3,25	1,68	0,69	0,80	3,51	1,06	0,30
PGSC0003DMT400032829	9,53	5,48	7,48	1,96	2,41	2,40	7,50	2,26	0,30
PGSC0003DMT400063599	6,67	8,37	12,36	3,92	1,38	2,93	9,13	2,74	0,30
PGSC0003DMT400042972	2,22	3,75	3,90	1,12	1,03	0,80	3,29	0,98	0,30
PGSC0003DMT400031967	10,17	20,78	20,16	7,56	3,10	4,53	17,04	5,06	0,30
PGSC0003DMT400027154	4,45	7,22	5,53	1,96	2,07	1,07	5,73	1,70	0,30
PGSC0003DMT400016511	5,40	5,20	4,23	1,40	1,38	1,60	4,94	1,46	0,30
PGSC0003DMT400021234	339,97	316,39	246,52	99,94	83,02	82,38	300,96	88,45	0,29
PGSC0003DMT400069733	79,11	44,74	26,02	13,16	16,19	14,66	49,96	14,67	0,29
PGSC0003DMT400063222	2,22	2,89	2,93	1,40	0,69	0,27	2,68	0,79	0,29
PGSC0003DMT400025617	11,12	16,17	13,98	3,36	4,13	4,53	13,76	4,01	0,29
PGSC0003DMT400001502	9,85	11,26	15,61	2,24	5,51	2,93	12,24	3,56	0,29
PGSC0003DMT400043513	6,67	8,08	5,85	3,08	1,03	1,87	6,87	1,99	0,29
PGSC0003DMT400030422	1,91	2,02	3,25	1,12	0,69	0,27	2,39	0,69	0,29
PGSC0003DMT400056145	28,60	26,27	28,29	5,04	9,99	9,06	27,72	8,03	0,29
PGSC0003DMT400002370	1,27	2,60	2,28	0,56	0,69	0,53	2,05	0,59	0,29

PGSC0003DMT400001933	1,91	2,31	7,48	0,56	0,69	2,13	3,90	1,13	0,29
PGSC0003DMT400060518	2,22	4,33	2,60	1,40	0,69	0,53	3,05	0,87	0,29
PGSC0003DMT400020206	1,59	3,75	4,88	0,56	1,03	1,33	3,41	0,97	0,29
PGSC0003DMT400030387	90,55	90,93	75,78	26,32	19,29	27,73	85,75	24,45	0,29
PGSC0003DMT400042356	64,82	48,79	27,64	15,68	10,33	14,13	47,08	13,38	0,28
PGSC0003DMT400082004	6,99	6,06	4,55	1,68	1,72	1,60	5,87	1,67	0,28
PGSC0003DMT400007053	96,91	92,09	67,97	29,39	24,11	19,46	85,66	24,32	0,28
PGSC0003DMT400030386	65,45	60,91	55,29	19,60	12,75	19,20	60,55	17,18	0,28
PGSC0003DMT400011286	6,04	6,93	7,48	1,68	1,72	2,40	6,82	1,93	0,28
PGSC0003DMT400028257	3,81	4,33	6,50	0,56	1,72	1,87	4,88	1,38	0,28
PGSC0003DMT400005933	10,49	8,95	10,73	2,52	3,10	2,93	10,06	2,85	0,28
PGSC0003DMT400062427	2,54	2,02	1,30	1,12	0,00	0,53	1,95	0,55	0,28
PGSC0003DMT400024267	182,06	170,90	139,52	52,63	40,30	45,59	164,16	46,17	0,28
PGSC0003DMT400009832	6,04	6,64	3,90	1,68	1,38	1,60	5,53	1,55	0,28
PGSC0003DMT400030381	75,62	72,17	62,77	22,96	14,81	20,79	70,19	19,52	0,28
PGSC0003DMT400023672	0,95	2,31	3,90	0,00	1,72	0,27	2,39	0,66	0,28
PGSC0003DMT400012237	2,22	8,08	4,23	1,40	1,03	1,60	4,84	1,34	0,28
PGSC0003DMT400012249	200,49	195,43	177,25	59,91	43,75	54,12	191,06	52,59	0,28
PGSC0003DMT400052439	11,12	10,10	11,06	3,36	3,10	2,40	10,76	2,95	0,27
PGSC0003DMT400074120	59,10	56,00	37,08	12,32	11,02	18,40	50,73	13,91	0,27
PGSC0003DMT400073687	38,76	31,47	45,53	10,92	11,02	9,60	38,59	10,51	0,27
PGSC0003DMT400056174	1,91	1,73	1,95	0,28	0,69	0,53	1,86	0,50	0,27
PGSC0003DMT400035267	2,22	2,02	3,25	0,00	1,72	0,27	2,50	0,66	0,27
PGSC0003DMT400031416	2,54	3,18	5,53	1,40	1,03	0,53	3,75	0,99	0,26
PGSC0003DMT400069712	2,22	3,75	3,25	0,84	1,03	0,53	3,07	0,80	0,26
PGSC0003DMT400018063	1,91	2,02	3,58	0,28	0,34	1,33	2,50	0,65	0,26
PGSC0003DMT400061736	4,13	10,97	12,36	1,96	2,76	2,40	9,15	2,37	0,26
PGSC0003DMT400031762	24,78	19,92	12,03	4,76	3,79	6,13	18,91	4,89	0,26
PGSC0003DMT400091458	271,66	230,07	203,59	83,42	51,33	47,72	235,11	60,82	0,26

PGSC0003DMT400014929	6,35	4,04	8,78	1,96	1,38	1,60	6,39	1,65	0,26
PGSC0003DMT400065213	27,01	24,54	25,04	5,60	6,55	7,46	25,53	6,54	0,26
PGSC0003DMT400056122	2,22	2,31	3,25	1,12	0,34	0,53	2,59	0,66	0,26
PGSC0003DMT400046825	43,85	42,72	29,60	8,68	7,92	12,80	38,72	9,80	0,25
PGSC0003DMT400084228	2,86	2,89	1,30	0,56	0,69	0,53	2,35	0,59	0,25
PGSC0003DMT400066686	2,54	1,15	10,73	1,96	0,34	1,33	4,81	1,21	0,25
PGSC0003DMT400010340	5,72	4,33	7,81	1,68	1,72	1,07	5,95	1,49	0,25
PGSC0003DMT400038861	1,59	3,46	2,93	0,84	0,34	0,80	2,66	0,66	0,25
PGSC0003DMT400003001	76,25	71,01	50,08	18,20	15,50	14,93	65,78	16,21	0,25
PGSC0003DMT400033445	0,95	1,73	4,23	0,56	0,34	0,80	2,30	0,57	0,25
PGSC0003DMT400065656	30,50	25,40	15,61	5,04	5,86	6,66	23,84	5,85	0,25
PGSC0003DMT400076796	1,91	2,31	2,60	0,28	1,38	0,00	2,27	0,55	0,24
PGSC0003DMT400059934	6,35	4,62	1,63	0,56	0,34	2,13	4,20	1,01	0,24
PGSC0003DMT400022974	45,12	45,03	35,45	12,04	8,96	9,06	41,87	10,02	0,24
PGSC0003DMT400016040	233,21	247,68	165,21	53,75	47,54	53,32	215,37	51,54	0,24
PGSC0003DMT400050441	20,02	30,02	24,72	5,60	8,27	4,00	24,92	5,96	0,24
PGSC0003DMT400029422	10,80	9,24	8,13	1,96	2,07	2,67	9,39	2,23	0,24
PGSC0003DMT400015922	15,89	12,70	16,91	1,96	3,44	5,33	15,17	3,58	0,24
PGSC0003DMT400010643	38,13	25,69	24,07	5,88	5,86	8,80	29,30	6,85	0,23
PGSC0003DMT400054669	238,61	232,67	160,34	60,75	36,86	49,59	210,54	49,07	0,23
PGSC0003DMT400010384	1,91	5,20	8,78	1,68	0,69	1,33	5,30	1,23	0,23
PGSC0003DMT400021751	7,63	9,81	18,21	3,08	2,76	2,40	11,88	2,75	0,23
PGSC0003DMT400023932	81,34	101,61	48,78	12,04	18,26	23,19	77,24	17,83	0,23
PGSC0003DMT400011280	2,86	2,60	3,25	1,40	0,34	0,27	2,90	0,67	0,23
PGSC0003DMT400063296	5,40	10,68	15,29	1,96	2,07	3,20	10,46	2,41	0,23
PGSC0003DMT400028619	62,91	65,53	40,65	10,92	7,23	20,79	56,36	12,98	0,23
PGSC0003DMT400069576	6,04	5,20	2,93	0,28	1,38	1,60	4,72	1,09	0,23
PGSC0003DMT400042096	27,01	14,72	8,46	3,92	4,13	3,47	16,73	3,84	0,23
PGSC0003DMT400023333	10,17	12,70	18,21	3,08	2,76	3,47	13,69	3,10	0,23

PGSC0003DMT400035464	15,89	25,69	36,43	6,44	3,44	7,73	26,00	5,87	0,23
PGSC0003DMT400053402	148,70	141,16	115,78	28,55	23,42	38,39	135,21	30,12	0,22
PGSC0003DMT400013504	6,35	7,79	9,11	2,80	1,03	1,33	7,75	1,72	0,22
PGSC0003DMT400031769	6,67	9,24	6,83	1,40	0,69	2,93	7,58	1,67	0,22
PGSC0003DMT400044379	10,17	9,24	2,93	1,12	0,34	3,47	7,45	1,64	0,22
PGSC0003DMT400041206	5,72	4,62	5,85	2,24	0,00	1,33	5,40	1,19	0,22
PGSC0003DMT400065291	3,81	4,04	4,23	0,56	1,03	1,07	4,03	0,89	0,22
PGSC0003DMT400010945	5,08	2,31	1,63	0,56	0,34	1,07	3,01	0,66	0,22
PGSC0003DMT400074482	2,22	2,31	4,55	0,84	0,34	0,80	3,03	0,66	0,22
PGSC0003DMT400021864	3,50	2,31	6,50	0,84	1,03	0,80	4,10	0,89	0,22
PGSC0003DMT400022188	5,72	5,77	3,90	1,12	1,38	0,80	5,13	1,10	0,21
PGSC0003DMT400030385	60,37	56,87	33,50	10,08	9,65	12,26	50,25	10,66	0,21
PGSC0003DMT400060374	9,21	7,22	8,78	2,52	0,69	2,13	8,40	1,78	0,21
PGSC0003DMT400073862	4,13	15,59	29,60	2,52	3,10	4,80	16,44	3,47	0,21
PGSC0003DMT400012074	12,39	8,66	8,78	2,24	2,41	1,60	9,94	2,08	0,21
PGSC0003DMT400003558	3,18	3,75	2,60	1,12	0,34	0,53	3,18	0,66	0,21
PGSC0003DMT400069897	5,08	3,46	2,93	0,28	1,03	1,07	3,82	0,79	0,21
PGSC0003DMT400059272	4,13	2,02	0,65	0,00	0,34	1,07	2,27	0,47	0,21
PGSC0003DMT400049383	1,91	2,60	2,60	1,12	0,34	0,00	2,37	0,49	0,21
PGSC0003DMT400007728	318,05	301,09	268,31	67,47	57,87	55,72	295,82	60,35	0,20
PGSC0003DMT400074377	276,11	269,62	248,80	60,19	43,06	58,65	264,84	53,97	0,20
PGSC0003DMT400072332	4,77	5,48	3,90	1,12	0,69	1,07	4,72	0,96	0,20
PGSC0003DMT400010084	97,22	82,56	48,78	14,84	14,12	17,33	76,19	15,43	0,20
PGSC0003DMT400071337	373,97	384,23	352,54	99,66	53,39	70,65	370,25	74,57	0,20
PGSC0003DMT400020887	1,91	3,18	2,93	0,28	0,00	1,33	2,67	0,54	0,20
PGSC0003DMT400008346	24,15	14,43	2,93	3,36	2,76	2,13	13,84	2,75	0,20
PGSC0003DMT400062992	29,87	37,82	7,48	4,48	3,79	6,66	25,06	4,98	0,20
PGSC0003DMT400059467	20,02	18,19	10,41	3,36	2,76	3,47	16,21	3,20	0,20
PGSC0003DMT400076572	130,27	113,45	84,56	27,71	17,57	19,20	109,43	21,49	0,20

PGSC0003DMT400081223	224,00	206,69	145,05	41,15	33,07	37,86	191,91	37,36	0,19
PGSC0003DMT400045208	0,95	1,44	2,60	0,28	0,69	0,00	1,66	0,32	0,19
PGSC0003DMT400001180	197,63	185,62	159,03	44,51	28,94	31,19	180,76	34,88	0,19
PGSC0003DMT400009439	1,91	2,31	1,95	0,56	0,34	0,27	2,06	0,39	0,19
PGSC0003DMT400025867	0,64	3,18	1,95	0,56	0,00	0,53	1,92	0,36	0,19
PGSC0003DMT400011563	1,27	2,60	1,95	0,28	0,00	0,80	1,94	0,36	0,19
PGSC0003DMT400069511	273,25	254,32	179,52	50,11	41,34	38,92	235,70	43,46	0,18
PGSC0003DMT400042533	5,08	3,75	2,28	1,40	0,34	0,27	3,70	0,67	0,18
PGSC0003DMT400012996	2,86	2,02	2,93	0,00	0,34	1,07	2,60	0,47	0,18
PGSC0003DMT400032851	15,57	30,02	7,15	2,24	2,76	4,27	17,58	3,09	0,18
PGSC0003DMT400069617	1,91	1,73	0,98	0,28	0,00	0,53	1,54	0,27	0,18
PGSC0003DMT400046636	13,34	14,72	3,90	2,80	1,72	1,07	10,65	1,86	0,17
PGSC0003DMT400079159	5,40	15,01	5,53	1,96	0,69	1,87	8,65	1,51	0,17
PGSC0003DMT400046198	7,31	6,64	4,23	0,56	1,72	0,80	6,06	1,03	0,17
PGSC0003DMT400062882	61,96	72,46	21,79	4,20	7,58	14,66	52,07	8,81	0,17
PGSC0003DMT400037143	5,08	3,75	1,30	0,84	0,34	0,53	3,38	0,57	0,17
PGSC0003DMT400056380	2,54	3,75	3,25	0,28	0,00	1,33	3,18	0,54	0,17
PGSC0003DMT400010489	0,95	3,46	2,60	0,84	0,34	0,00	2,34	0,39	0,17
PGSC0003DMT400078202	63,55	65,53	40,65	7,00	6,55	14,66	56,58	9,40	0,17
PGSC0003DMT400042155	1,59	2,31	3,58	0,28	0,69	0,27	2,49	0,41	0,17
PGSC0003DMT400047173	4,45	7,51	3,25	0,28	0,34	1,87	5,07	0,83	0,16
PGSC0003DMT400071057	23,83	36,66	8,78	2,52	2,41	6,40	23,09	3,78	0,16
PGSC0003DMT400064079	0,95	1,44	2,93	0,00	0,34	0,53	1,77	0,29	0,16
PGSC0003DMT400029446	2,86	4,33	3,25	0,56	0,34	0,80	3,48	0,57	0,16
PGSC0003DMT400035603	213,20	159,06	80,00	26,88	22,74	23,73	150,75	24,45	0,16
PGSC0003DMT400050139	2,22	0,29	7,15	0,56	0,69	0,27	3,22	0,51	0,16
PGSC0003DMT400066576	42,89	22,52	5,20	2,52	4,48	4,00	23,54	3,67	0,16
PGSC0003DMT400069936	4,77	6,35	4,88	1,12	1,03	0,27	5,33	0,81	0,15
PGSC0003DMT400045722	54,33	67,55	5,85	4,48	6,89	7,73	42,58	6,37	0,15

PGSC0003DMT400078163	409,87	393,18	323,92	73,07	39,27	55,45	375,66	55,93	0,15
PGSC0003DMT400073713	224,95	213,62	86,18	22,40	24,46	27,73	174,92	24,86	0,14
PGSC0003DMT400069641	19,06	14,15	4,23	2,52	1,38	1,33	12,48	1,74	0,14
PGSC0003DMT400073475	2,54	2,02	4,23	0,00	0,69	0,53	2,93	0,41	0,14
PGSC0003DMT400075259	0,64	3,18	1,30	0,00	0,69	0,00	1,71	0,23	0,13
PGSC0003DMT400055958	51,79	45,32	37,08	6,72	4,82	6,40	44,73	5,98	0,13
PGSC0003DMT400028113	35,27	32,04	26,34	4,76	3,10	4,27	31,22	4,04	0,13
PGSC0003DMT400038889	7,31	13,86	18,54	2,52	1,38	1,07	13,24	1,66	0,13
PGSC0003DMT400020282	0,64	1,44	2,93	0,28	0,34	0,00	1,67	0,21	0,12
PGSC0003DMT400060400	6,67	7,51	8,46	1,12	0,34	1,33	7,55	0,93	0,12
PGSC0003DMT400087980	1,27	2,31	0,98	0,56	0,00	0,00	1,52	0,19	0,12
PGSC0003DMT400070969	0,95	3,18	4,88	0,56	0,00	0,53	3,00	0,36	0,12
PGSC0003DMT400030382	100,40	91,22	70,25	12,04	7,23	12,00	87,29	10,42	0,12
PGSC0003DMT400088908	4,45	4,91	2,93	1,12	0,34	0,00	4,10	0,49	0,12
PGSC0003DMT400063236	0,95	1,44	2,28	0,28	0,00	0,27	1,56	0,18	0,12
PGSC0003DMT400073689	54,33	60,62	7,81	2,52	7,58	4,27	40,92	4,79	0,12
PGSC0003DMT400022972	111,20	168,01	146,68	21,56	10,33	17,86	141,96	16,58	0,12
PGSC0003DMT400060263	21,61	11,84	4,23	1,68	1,38	1,33	12,56	1,46	0,12
PGSC0003DMT400082122	27,32	21,94	11,38	1,40	1,38	4,27	20,21	2,35	0,12
PGSC0003DMT400049226	52,11	45,03	43,58	7,28	5,17	3,47	46,91	5,31	0,11
PGSC0003DMT400059469	20,97	12,12	5,85	0,84	1,38	2,13	12,98	1,45	0,11
PGSC0003DMT400079441	22,56	13,86	24,07	3,36	1,72	1,60	20,16	2,23	0,11
PGSC0003DMT400022037	1,27	1,15	3,25	0,28	0,34	0,00	1,89	0,21	0,11
PGSC0003DMT400068048	0,32	2,02	3,25	0,00	0,34	0,27	1,86	0,20	0,11
PGSC0003DMT400077357	304,07	311,77	142,12	27,15	23,42	30,39	252,65	26,99	0,11
PGSC0003DMT400039974	6,04	6,64	6,83	0,28	0,69	1,07	6,50	0,68	0,10
PGSC0003DMT400063352	664,05	651,83	553,53	78,95	50,64	65,58	623,14	65,06	0,10
PGSC0003DMT400069276	11,44	9,53	2,60	0,56	0,00	1,87	7,86	0,81	0,10
PGSC0003DMT400036856	387,31	363,73	243,27	29,39	21,36	43,72	331,44	31,49	0,10



PGSC0003DMT400007895	209,38	170,90	125,54	25,20	8,27	12,53	168,61	15,33	0,09
PGSC0003DMT400031668	2,22	1,73	2,28	0,28	0,00	0,27	2,08	0,18	0,09
PGSC0003DMT400092352	1,91	4,62	1,30	0,00	0,69	0,00	2,61	0,23	0,09
PGSC0003DMT400080935	207,48	251,44	170,09	18,76	15,85	20,79	209,67	18,47	0,09
PGSC0003DMT400034964	13,98	8,95	6,18	0,28	1,72	0,53	9,70	0,84	0,09
PGSC0003DMT400044066	14,62	14,15	2,60	1,12	0,69	0,80	10,46	0,87	0,08
PGSC0003DMT400049181	19,38	13,28	4,23	0,84	1,03	0,80	12,30	0,89	0,07
PGSC0003DMT400029694	40,67	21,07	6,50	1,68	1,03	1,87	22,75	1,53	0,07
PGSC0003DMT400077934	3,81	3,75	0,65	0,00	0,00	0,53	2,74	0,18	0,06
PGSC0003DMT400040877	3,50	4,91	10,41	0,56	0,00	0,53	6,27	0,36	0,06
PGSC0003DMT400078217	5,40	5,20	1,63	0,00	0,34	0,27	4,08	0,20	0,05
PGSC0003DMT400013500	73,71	47,34	74,15	2,80	3,10	3,73	65,07	3,21	0,05
PGSC0003DMT400081406	73,40	65,24	37,73	3,08	2,07	2,93	58,79	2,69	0,05
PGSC0003DMT400024834	0,64	0,87	4,55	0,00	0,00	0,27	2,02	0,09	0,04
PGSC0003DMT400049987	1,91	2,60	1,95	0,28	0,00	0,00	2,15	0,09	0,04
PGSC0003DMT400030926	12,39	14,15	5,53	0,56	0,00	0,80	10,69	0,45	0,04
PGSC0003DMT400049795	141,39	113,74	85,86	5,04	4,13	4,00	113,66	4,39	0,04
PGSC0003DMT400049803	30,82	28,29	20,81	1,12	0,34	0,53	26,64	0,66	0,02
PGSC0003DMT400049793	167,44	147,22	130,41	5,04	2,76	3,20	148,36	3,67	0,02
PGSC0003DMT400027123	106,76	86,03	43,58	3,08	1,72	0,80	78,79	1,87	0,02

**Cuadro S3.8: Genes regulados negativamente expresados diferencialmente en restricción hídrica entre plantas Spunta y *BBX21-OE* (Cluster 1).**

Down Cluster 1 probe set	Control (bien regado)					R. hídrica						Homólogo de Arabidopsis	
	Spunta C3	Spunta C1	Spunta C2	CH2 C1	CH2 C2		Spunta H3	Spunta H1	Spunta H2	CH2 H1	CH2 H2	AGI	annotation
PGSC0003DMT4000 27123	43,58	106,76	86,03	11,62	8,69	0,8	3,08	1,72	4,95	3,77	AT1G12060	ATBAG5_BAG5__BCL-2-associated athanogene 5 5ATBAG5_BAG5__BCL-2-associated athanogene 5	
PGSC0003DMT4000 49793	130,41	167,44	147,22	76,58	53,07	3,2	5,04	2,76	14,85	9,16	AT2G26150	ATHSFA2_HSFA2__heat shock transcription factor A2ATHSFA2_HSFA2__	
PGSC0003DMT4000 49803	20,81	30,82	28,29	8,94	7,14	0,53	1,12	0,34	0,93	1,35	AT3G22830	AT-HSFA6B_HSFA6B__heat shock transcription factor A6B	
PGSC0003DMT4000 49795	85,86	141,39	113,74	52,44	42,21	4	5,04	4,13	13,3	13,47	AT2G26150	ATHSFA2_HSFA2__heat shock transcription factor	
PGSC0003DMT4000 30926	5,53	12,39	14,15	0	0,93	0,8	0,56	0	2,47	2,16			
PGSC0003DMT4000 81406	37,73	73,4	65,24	13,11	11,17	2,93	3,08	2,07	3,4	5,12	AT1G56300	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 78217	1,63	5,4	5,2	1,49	0	0,27	0	0,34	0,62	0			
PGSC0003DMT4000 77934	0,65	3,81	3,75	0	0,93	0,53	0	0	1,24	0,81	AT3G46070	C2H2-type zinc finger family protein	
PGSC0003DMT4000 29694	6,5	40,67	21,07	2,98	4,97	1,87	1,68	1,03	2,47	2,69	AT5G06690	WCRKC1__WCRKC thioredoxin 1	
PGSC0003DMT4000 49181	4,23	19,38	13,28	1,19	0,93	0,8	0,84	1,03	1,55	0,27			
PGSC0003DMT4000 44066	2,6	14,62	14,15	0,6	1,24	0,8	1,12	0,69	0,31	0,27	AT5G59720	HSP18.2__heat shock protein 18.2 HSP18.2__heat shock protein 18.2	
PGSC0003DMT4000 80935	170,09	207,48	251,44	18,77	36,31	20,79	18,76	15,85	11,76	17,25	AT5G48570	ATFKBP65_FKBP65_ROF2__FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein	
PGSC0003DMT4000 92352	1,3	1,91	4,62	0,6	0,93	0	0	0,69	0,31	0,27	AT1G27650	ATU2AF35A__U2 snRNP auxiliary factor small subunit, putative ATU2AF35A__U2 snRNP auxiliary factor small subunit, putative	
PGSC0003DMT4000 07895	125,54	209,38	170,9	71,81	62,38	12,53	25,2	8,27	39,29	42,31	AT4G11660	AT-HSFB2B_HSF7_HSFB2B__winged-helix DNA-binding transcription factor family protein	
PGSC0003DMT4000 36856	243,27	387,31	363,73	49,76	27,93	43,72	29,39	21,36	30,63	23,98	AT3G12580	ATHSP70_HSC70-4_HSP70__heat shock protein	

Down Cluster 1	Control (bien regado)					R. hídrica						Homólogo de Arabidopsis	
	Spunta C3	Spunta C1	Spunta C2	CH2 C1	CH2 C2							Spunta H3	Spunta H1
PGSC0003DMT4000 69276	2,6	11,44	9,53	0	0	1,87	0,56	0	0,62	0,27	AT1G14 700	ATPAP3_PAP3__purple acid phosphatase 3	
PGSC0003DMT4000 63352	553,53	664,05	651,83	251,49	241,78	65,58	78,95	50,64	125,91	121,27	AT1G74 310	ATHSP101_HOT1_HSP101__heat shock protein 101	
PGSC0003DMT4000 77357	142,12	304,07	311,77	25,63	28,24	30,39	27,15	23,42	19,49	22,64	AT2G32 120	HSP70T-2__heat-shock protein 70T-2	
PGSC0003DMT4000 59469	5,85	20,97	12,12	1,19	1,55	2,13	0,84	1,38	1,55	1,35			
PGSC0003DMT4000 82122	11,38	27,32	21,94	10,73	8,69	4,27	1,4	1,38	5,88	4,58	AT2G32 030	Acyl-CoA N-acyltransferases (NAT) superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 60263	4,23	21,61	11,84	0,89	1,55	1,33	1,68	1,38	1,86	1,89	AT5G63 650	SNRK2-5_SNRK2.5_SRK2H__SNF1-related protein kinase 2.5	
PGSC0003DMT4000 22972	146,68	111,2	168,01	62,87	54,94	17,86	21,56	10,33	17,02	21,56	AT3G55 580	TCF1__Regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein	
PGSC0003DMT4000 73689	7,81	54,33	60,62	0,6	0,93	4,27	2,52	7,58	1,86	1,62	AT1G52 560	HSP20-like chaperones superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 88908	2,93	4,45	4,91	0,6	0,62	0	1,12	0,34	0,31	0	AT3G46 230	ATHSP17.4_HSP17.4__heat shock protein	
PGSC0003DMT4000 30382	70,25	100,4	91,22	26,22	22,97	12	12,04	7,23	10,83	15,09	AT3G46 230	ATHSP17.4_HSP17.4__heat shock protein 17.4	
PGSC0003DMT4000 28113	26,34	35,27	32,04	19,37	14,59	4,27	4,76	3,1	5,57	6,2			
PGSC0003DMT4000 55958	37,08	51,79	45,32	11,32	12,1	6,4	6,72	4,82	7,42	5,66	AT5G12 020	HSP17.6II__17.6 kDa class II heat shock proteinHSP17.6II__ 17.6 kDa class II heat shock protein	
PGSC0003DMT4000 75259	1,3	0,64	3,18	0,6	0,62	0	0	0,69	0,31	0,54	AT2G43 970	AtLARP6b_LARP6b__RNA-binding protein	
PGSC0003DMT4000 69641	4,23	19,06	14,15	3,58	3,1	1,33	2,52	1,38	1,86	1,89	AT5G63 130	Octicosapeptide/Phox/Bem1p family protein	
PGSC0003DMT4000 73713	86,18	224,95	213,62	16,39	18	27,73	22,4	24,46	23,51	24,79	AT3G12 580	ATHSP70_HSC70-4_HSP70__heat shock protein	
PGSC0003DMT4000 78163	323,92	409,87	393,18	196,37	179,08	55,45	73,07	39,27	107,97	117,49	AT5G02 500	AT-HSC70-1_AtHsp70-1_HSC70_HSC70- 1_HSP70-1__ heat shock cognate protein 70-1	
PGSC0003DMT4000 45722	5,85	54,33	67,55	3,28	1,86	7,73	4,48	6,89	6,19	4,58	AT5G15 250	ATFTSH6_FTSH6__FTSH protease 6	
PGSC0003DMT4000 66576	5,2	42,89	22,52	5,36	3,1	4	2,52	4,48	4,33	3,23	AT4G34 135	UGT73B2__UDP-glucosyltransferase 73B2	
PGSC0003DMT4000	80	213,2	159,06	40,82	36	23,73	26,88	22,74	35,27	36,65	AT5G35		

Down Cluster 1	Control (bien regado)					R. hídrica					Homólogo de Arabidopsis		
	Spunta C3	Spunta C1	Spunta C2	CH2 C1	CH2 C2						Spunta H3	Spunta H1	Spunta H2
35603												320	
PGSC0003DMT4000 71057	8,78	23,83	36,66	1,19	2,48	6,4	2,52	2,41	2,78	2,43	AT1G17 180	ATGSTU25_GSTU25__glutathione S-transferase TAU 25	
PGSC0003DMT4000 47173	3,25	4,45	7,51	2,09	0,62	1,87	0,28	0,34	1,24	1,08			
PGSC0003DMT4000 78202	40,65	63,55	65,53	5,36	2,17	14,66	7	6,55	4,64	3,23	AT1G07 400	HSP20-like chaperones superfamily proteinHSP20-like chaperones superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 62882	21,79	61,96	72,46	0,3	0,62	14,66	4,2	7,58	1,55	1,89	AT4G10 250	ATHSP22.0__HSP20-like chaperones superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 46636	3,9	13,34	14,72	2,38	1,86	1,07	2,8	1,72	2,47	2,16	AT5G40 390	RS5_SIP1__Raffinose synthase family protein	
PGSC0003DMT4000 32851	7,15	15,57	30,02	3,58	3,41	4,27	2,24	2,76	3,4	2,16	AT1G53 540	HSP20-like chaperones superfamily proteinHSP20-like chaperones superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 69511	179,52	273,25	254,32	129,92	107,08	38,92	50,11	41,34	69,3	78,15	AT3G03 200	anac045_NAC045_NAC45__NAC domain containing protein 45	
PGSC0003DMT4000 01180	159,03	197,63	185,62	76,58	79,45	31,19	44,51	28,94	52,59	52,28	AT3G12 580	ATHSP70_HSC70-4_HSP70__heat shock protein	
PGSC0003DMT4000 81223	145,05	224	206,69	64,36	59,9	37,86	41,15	33,07	49,19	49,31	AT2G20 560	DNAJ heat shock family proteinDNAJ heat shock family protein	
PGSC0003DMT4000 76572	84,56	130,27	113,45	31,29	26,69	19,2	27,71	17,57	25,37	24,79	AT3G24 500	ATMBF1C_MBF1C__multiprotein bridging factor 1C	
PGSC0003DMT4000 59467	10,41	20,02	18,19	4,17	4,03	3,47	3,36	2,76	2,17	4,58	AT3G07 150		
PGSC0003DMT4000 62992	7,48	29,87	37,82	4,17	3,41	6,66	4,48	3,79	4,95	4,85	AT5G08 180	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein	
PGSC0003DMT4000 08346	2,93	24,15	14,43	2,68	4,66	2,13	3,36	2,76	7,12	3,5			
PGSC0003DMT4000 71337	352,54	373,97	384,23	137,96	145,25	70,65	99,66	53,39	79,82	90,01	AT3G12 580	ATHSP70_HSC70-4_HSP70__heat shock protein	
PGSC0003DMT4000 10084	48,78	97,22	82,56	33,08	36,31	17,33	14,84	14,12	25,37	26,68	AT4G12 040	AtSAP7_SAP7__A20/AN1-like zinc finger family protein	
PGSC0003DMT4000 74377	248,8	276,11	269,62	109,06	106,15	58,65	60,19	43,06	57,85	64,14	AT5G52 640	ATHS83_AtHsp90-1_ATHSP90.1_HSP81- 1_HSP81.1_ HSP83_HSP90.1__heat shock protein 90.1	
PGSC0003DMT4000 07728	268,31	318,05	301,09	112,04	121,35	55,72	67,47	57,87	78,58	83	AT3G44 110	ATJ_ATJ3_J3__DNAJ homologue 3	
PGSC0003DMT4000 59272	0,65	4,13	2,02	0,6	1,24	1,07	0	0,34	1,86	0,54	AT1G21 550	Calcium-binding EF-hand family protein	

Down Cluster 1	Control (bien regado)					R. hídrica						Homólogo de Arabidopsis	
	Spunta C3	Spunta C1	Spunta C2	CH2 C1	CH2 C2							Spunta H3	Spunta H1
PGSC0003DMT4000 69897	2,93	5,08	3,46	2,38	1,86	1,07	0,28	1,03	1,24	0,81	AT2G39 980	HXXXD-type acyl-transferase family protein	
PGSC0003DMT4000 30385	33,5	60,37	56,87	9,24	9,31	12,26	10,08	9,65	9,59	7,28	AT3G46 230	ATHSP17.4_HSP17.4__heat shock protein 17.4	
PGSC0003DMT4000 44379	2,93	10,17	9,24	2,68	4,97	3,47	1,12	0,34	4,33	4,04	AT3G23 240	AtERF#092_ERF1_ERF1B__ethylene response factor 1	
PGSC0003DMT4000 53402	115,78	148,7	141,16	32,48	31,97	38,39	28,55	23,42	18,56	17,52	AT4G10 250	ATHSP22.0__HSP20-like chaperones superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 42096	8,46	27,01	14,72	5,07	4,97	3,47	3,92	4,13	3,09	6,74	AT4G14 450	PH1	
PGSC0003DMT4000 23932	48,78	81,34	101,61	4,47	2,17	23,19	12,04	18,26	8,97	7,01	AT4G10 250	ATHSP22.0__HSP20-like chaperones superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 54669	160,34	238,61	232,67	118,6	103,04	49,59	60,75	36,86	66,82	77,07	AT1G31 290	AGO3__ARGONAUTE 3	
PGSC0003DMT4000 50441	24,72	20,02	30,02	7,75	9,93	4	5,6	8,27	4,95	5,12	AT4G27 890	HSP20-like chaperones superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 16040	165,21	233,21	247,68	86,41	82,87	53,32	53,75	47,54	55,38	58,75	AT3G08 970	ATERDJ3A_TMS1__DNAJ heat shock N-termina l domain-containing protein	
PGSC0003DMT4000 59934	1,63	6,35	4,62	0,89	2,17	2,13	0,56	0,34	0,93	1,08	AT1G66 080		
PGSC0003DMT4000 65656	15,61	30,5	25,4	6,56	5,59	6,66	5,04	5,86	6,19	6,74			
PGSC0003DMT4000 03001	50,08	76,25	71,01	30,39	28,24	14,93	18,2	15,5	19,49	17,79	AT2G23 780	RING/U-box superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 46825	29,6	43,85	42,72	25,03	20,48	12,8	8,68	7,92	16,71	14,55	AT5G27 420	ATL31_CNII__carbon/nitrogen insensitive 1	
PGSC0003DMT4000 91458	203,59	271,66	230,07	116,21	103,35	47,72	83,42	51,33	81,98	83,27	AT1G12 060	ATBAG5_BAG5__BCL-2-associated athanogene 5ATBAG5_BAG5__BCL-2-associated athanogene 5	
PGSC0003DMT4000 12249	177,25	200,49	195,43	77,77	73,87	54,12	59,91	43,75	63,73	56,59	AT4G25 200	ATHSP23.6-MITO_HSP23.6-MITO__mitochondrion-localized small heat shock protein 23.6	
PGSC0003DMT4000 30381	62,77	75,62	72,17	22,65	19,55	20,79	22,96	14,81	13,3	18,32	AT1G53 540	HSP20-like chaperones superfamily proteinHSP20-like chaperones superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 24267	139,52	182,06	170,9	88,8	81,63	45,59	52,63	40,3	62,49	65,75	AT2G20 560	DNAJ heat shock family proteinDNAJ heat shock family protein	
PGSC0003DMT4000 30386	55,29	65,45	60,91	15,79	14,59	19,2	19,6	12,75	13,61	16,17	AT3G46 230	ATHSP17.4_HSP17.4__heat shock protein	
PGSC0003DMT4000 07053	67,97	96,91	92,09	23,84	30,42	19,46	29,39	24,11	21,04	21,83	AT3G10 020		

Down Cluster 1	Control (bien regado)					R. hídrica						Homólogo de Arabidopsis	
	Spunta C3	Spunta C1	Spunta C2	CH2 C1	CH2 C2							Spunta H3	Spunta H1
PGSC0003DMT4000 42356	27,64	64,82	48,79	32,48	23,59	14,13	15,68	10,33	17,02	20,75			
PGSC0003DMT4000 30387	75,78	90,55	90,93	30,39	23,59	27,73	26,32	19,29	17,94	17,25	AT3G46 230	ATHSP17.4_HSP17.4__heat shock protein	
PGSC0003DMT4000 60518	2,6	2,22	4,33	0,6	1,24	0,53	1,4	0,69	2,17	0,54			
PGSC0003DMT4000 69733	26,02	79,11	44,74	12,22	13,35	14,66	13,16	16,19	11,76	14,01	AT5G05 410	DREB2_DREB2A__DRE-binding protein 2A	
PGSC0003DMT4000 21234	246,52	339,97	316,39	178,79	175,36	82,38	99,94	83,02	134,58	135,01	AT2G26 150	ATHSFA2_HSFA2__heat shock transcription factor	
PGSC0003DMT4000 78463	141,47	209,06	170,03	91,18	84,73	53,85	60,75	44,09	74,56	66,29	AT1G71 000	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 47369	75,78	118,51	93,82	49,17	40,97	25,06	38,35	24,46	36,2	36,38	AT1G26 800	MPSR1__RING/U-box superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 14515	1,95	2,86	4,04	2,38	1,86	1,07	0,28	1,38	1,24	0,81	AT1G79 960	ATOFP14_OF14__ovate family protein 14	
PGSC0003DMT4000 64813	13,01	17,16	18,48	9,54	7,76	4	7	4,13	5,26	7,01			
PGSC0003DMT4000 32096	4,23	5,4	7,51	3,87	1,55	2,67	1,12	1,72	2,17	4,04	AT4G11 280	ACS6_ATACS6__1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (acc) synthase 6	
PGSC0003DMT4000 66762	70,25	98,5	105,66	27,71	32,9	34,66	31,91	22,74	30,01	32,61	AT4G22 740	glycine-rich proteinglycine-rich protein	
PGSC0003DMT4000 49703	128,46	186,19	174,36	73	68,9	58,12	53,47	49,26	53,83	61,71	AT3G63 310	AtLFG2_BIL4_LFG2__Bax inhibitor-1 family protein	
PGSC0003DMT4000 55930	100,17	142,34	146,94	33,97	42,52	46,39	45,63	36,51	45,17	40,69	AT4G21 320	HSA32__Aldolase-type TIM barrel family protein	
PGSC0003DMT4000 78006	100,49	127,73	123,26	27,71	16,45	47,72	35,55	33,76	28,77	21,56	AT1G07 400	HSP20-like chaperones superfamily proteinHSP20-like chaperones superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 14217	100,49	108,35	104,21	53,64	45,62	39,19	35,27	29,97	28,77	37,46	AT5G52 640	ATHS83_AtHsp90-1_ATHSP90.1_HSP81-1_HSP81.1_HSP83_HSP90.1__heat shock protein 90.1	
PGSC0003DMT4000 31803	30,25	73,71	43,01	25,63	26,38	21,86	13,16	14,12	22,89	20,48	AT5G41 330	BTB/POZ domain with WD40/YVTN repeat-like protein	
PGSC0003DMT4000 47340	5,2	19,7	12,99	2,38	1,86	3,73	4,48	4,48	3,71	2,16	AT4G10 265	Wound-responsive family protein	
PGSC0003DMT4000 36925	5,2	20,65	19,92	0,6	0,31	6,4	4,48	4,48	1,86	2,96	AT5G07 330		
PGSC0003DMT4000	25,04	67,36	45,03	11,62	11,79	18,4	15,96	12,4	19,49	16,17			

Down Cluster 1	Control (bien regado)					R. hídrica						Homólogo de Arabidopsis	
	Spunta C3	Spunta C1	Spunta C2	CH2 C1	CH2 C2							Spunta H3	Spunta H1
45765													
PGSC0003DMT4000 24594	304,41	450,22	456,4	122,47	85,04	145,83	140,53	125,73	127,15	110,22	AT5G52 640	ATHS83_AtHsp90-1_ATHSP90.1_HSP81- 1_HSP81.1_HSP83_ HSP90.1__heat shock protein 90.1	
PGSC0003DMT4000 78219	4,55	6,67	8,95	0,89	2,79	3,2	1,96	1,72	2,17	2,96	AT5G04 110	GYRB3__DNA GYRASE B3	
PGSC0003DMT4000 66123	64,72	149,97	153	15,2	17,07	47,19	43,39	35,48	41,46	33,15	AT5G35 220	AMOS1_EGY1__Peptidase M50 family protein	
PGSC0003DMT4000 07587	56,59	88,33	93,53	15,49	10,86	31,99	23,8	27,21	25,37	18,59	AT3G46 230	ATHSP17.4_HSP17.4__heat shock protein 17.4ATHSP17.4_ HSP17.4__heat shock protein 17.4	
PGSC0003DMT4000 01376	10,41	20,33	21,07	12,22	10,24	6,4	6,16	5,51	8,04	6,47	AT3G28 210	PMZ_SAP12__zinc finger (AN1-like) family protein	
PGSC0003DMT4000 70986	41,95	56,24	90,93	11,32	7,14	24,53	19,88	21,7	13,3	9,43	AT5G49 910	cpHsc70-2_HSC70-7__chloroplast heat shock protein 70-2	
PGSC0003DMT4000 10294	114,48	153,14	150,4	87,31	79,14	50,92	54,59	41,68	66,52	64,41	AT2G26 150	ATHSFA2_HSFA2__heat shock transcription factor A2ATHSFA2_HSFA2__heat shock transcription factor	
PGSC0003DMT4000 22748	144,72	213,2	217,37	82,24	82,25	69,85	71,95	61,32	66,52	70,6	AT3G09 350	Fes1A__Fes1A	
PGSC0003DMT4000 43219	8,46	10,49	6,93	3,87	3,72	2,67	2,52	4,13	4,33	4,04	AT2G15 490	UGT73B4__UDP-glycosyltransferase 73B4	
PGSC0003DMT4000 60724	32,85	40,67	42,15	14,3	12,41	13,33	15,12	13,78	16,71	15,9	AT3G03 270	HRU1__Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 21142	68,95	70,85	71,88	26,52	27,93	27,19	24,64	25,84	28,15	22,64	AT5G12 020	HSP17.6II__17.6 kDa class II heat shock proteinHSP17.6II_ 17.6 kDa class II heat shock protein	
PGSC0003DMT4000 78008	64,07	109,62	109,7	14,9	18	41,59	27,43	35,14	27,22	21,02	AT1G07 400	HSP20-like chaperones superfamily proteinHSP20-like chaperones superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 14178	2,28	3,81	3,75	2,09	1,86	1,87	1,12	0,69	2,47	1,62			
PGSC0003DMT4000 01259	6,18	9,85	10,68	2,68	1,24	4,27	3,08	2,76	2,47	3,23			
PGSC0003DMT4000 84332	20,16	26,69	28,58	11,92	11,79	13,06	8,4	7,23	12,68	11,05	AT3G52 320	F-box and associated interaction domains- containing protein	
PGSC0003DMT4000 78022	260,5	300,25	294,74	175,81	163,25	101,31	120,66	107,48	148,5	137,43	AT4G35 785	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	

Down Cluster 1	Control (bien regado)					R. hídrica						Homólogo de Arabidopsis	
	Spunta C3	Spunta C1	Spunta C2	CH2 C1	CH2 C2							Spunta H3	Spunta H1
PGSC0003DMT4000 13376	77,73	75,3	90,07	26,52	31,97	31,46	32,47	30,66	18,25	33,42	AT2G47 180	AtGolS1_GolS1__galactinol synthase 1	
PGSC0003DMT4000 10052	4,55	7,94	6,35	3,28	5,28	3,73	2,24	1,38	3,4	3,23	AT5G67 090	SBT1.9__Subtilisin-like serine endopeptidase family protein	
PGSC0003DMT4000 11693	122,93	122,96	129,33	75,98	72,01	48,52	52,91	45,82	52,59	55,24	AT3G16 920	ATCTL2_CTL2__chitinase-like protein 2	
PGSC0003DMT4000 36885	19,51	36,54	35,22	24,14	27,62	17,06	9,52	9,3	23,2	18,86	AT3G14 250	RING/U-box superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 58224	14,96	32,73	28,87	23,84	13,35	11,2	10,08	8,96	13,92	14,82	AT1G70 090	GATL9_LGT8__glucosyl transferase family 8	
PGSC0003DMT4000 15006	3,58	10,8	7,22	2,98	2,48	3,47	2,52	2,76	3,4	2,43	AT4G05 460	AtSKIP19_SKIP19__RNI-like superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 15719	69,6	124,23	128,75	55,72	53,38	48,52	44,51	38,24	45,48	40,69	AT2G29 070	Ubiquitin fusion degradation UFD1 family protein	
PGSC0003DMT4000 60171	91,06	133,13	135,39	50,95	56,8	49,85	50,11	47,19	59,4	58,48	AT3G04 500	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	
PGSC0003DMT4000 31252	79,03	92,78	96,71	21,45	23,28	37,32	34,43	38,58	26,3	11,32	AT4G27 670	HSP21__heat shock protein 21	
PGSC0003DMT4000 29702	37,73	36,54	45,03	24,43	20,79	19,2	16,8	13,43	14,85	21,02	AT2G41 945	RED1	
PGSC0003DMT4000 27544	5,85	6,67	6,35	2,98	2,79	3,73	3,08	1,03	4,02	3,77	AT1G59 590	ZCF37__ZCF37	
PGSC0003DMT4000 84751	6,83	17,16	10,97	8,94	4,03	5,07	5,04	4,48	5,26	4,58	AT1G27 730	STZ_ZAT10__salt tolerance zinc finger	
PGSC0003DMT4000 42613	5,85	8,9	10,39	4,77	4,66	2,4	6,16	2,07	2,47	5,12	AT3G16 240	AQP1_ATTIP2;1_DELTA-TIP_DELTA-TIP1_TIP2;1_delta tonoplast integral protein	
PGSC0003DMT4000 32085	15,29	29,23	19,92	8,94	7,14	5,87	11,2	10,33	8,97	9,43			
PGSC0003DMT4000 36621	89,44	107,39	101,33	63,47	54	44,52	41,99	40,3	46,72	47,16	AT2G32 070	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 45523	147,65	177,93	167,43	97,14	100,25	68,78	74,47	67,17	74,25	77,88	AT3G07 090	PPPDE putative thiol peptidase family protein	
PGSC0003DMT4000 81416	44,56	96,59	107,39	44,1	44,69	35,99	38,07	33,76	33,1	38	AT1G02 700		
PGSC0003DMT4000 40854	2,93	2,86	4,91	1,19	0,62	1,87	1,4	1,38	1,86	2,43	AT4G23 340	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 57642	101,47	154,1	128,75	77,77	82,87	61,05	50,67	55,81	70,54	77,34	AT4G27 460	CBSX5__Cystathionine beta-synthase (CBS) family protein	



Down Cluster 1	Control (bien regado)					R. hídrica					Homólogo de Arabidopsis	
	Spunta C3	Spunta C1	Spunta C2	CH2 C1	CH2 C2						Spunta H3	Spunta H1
PGSC0003DMT4000 63509	33,82	60,37	53,69	41,72	31,97	22,93	21,84	20,67	36,2	29,91	AT1G09 070	(AT)SRC2_AtSRC2_SRC2__soybean gene regulated by cold-2
PGSC0003DMT4000 57734	24,07	59,1	39,26	23,54	19,24	17,6	21	15,85	19,49	18,59	AT1G61 260	Protein of unknown function (DUF761)
PGSC0003DMT4000 23788	7,81	10,49	8,08	4,47	6,21	5,33	4,48	2,07	5,88	5,12	AT3G06 240	F-box family protein
PGSC0003DMT4000 79969	42,28	54,65	58,31	12,52	13,97	26,13	23,52	22,05	18,87	19,13	AT4G02 450	p23-1__HSP20-like chaperones superfamily protein
PGSC0003DMT4000 75163	38,38	45,44	56	27,12	27,62	27,19	22,4	16,19	30,01	28,3	AT2G26 690	AtNPF6.2_NPF6.2__Major facilitator superfamily protein
PGSC0003DMT4000 12208	346,36	362,53	374,41	237,49	216,95	168,22	183,93	162,59	189,96	187,02	AT1G62 740	Hop2__stress-inducible protein, putative HSP20-like chaperones superfamily proteinHSP20-like chaperones superfamily protein
PGSC0003DMT4000 78201	85,21	105,17	97,57	35,46	34,45	46,65	43,67	47,88	43,62	35,57	AT1G07 400	glycine-rich proteinglycine-rich protein
PGSC0003DMT4000 66765	73,5	102,31	96,71	35,76	36,93	41,86	44,79	45,13	46,1	43,93	AT4G22 740	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
PGSC0003DMT4000 19853	106,35	140,75	150,98	74,49	64,87	58,92	66,07	67,52	71,47	76,53	AT1G10 740	ATFD3_FD3__ferredoxin 3
PGSC0003DMT4000 80580	227,66	237,66	281,17	147,8	161,08	120,5	126,82	113,68	119,42	127,73	AT1G79 930	TPPH__Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein
PGSC0003DMT4000 79121	17,56	14,62	28,29	11,92	12,73	8	10,92	10,33	8,66	9,97	AT4G14 240	Agenet domain-containing protein
PGSC0003DMT4000 61613	5,53	16,84	15,59	4,17	3,72	8,53	5,04	4,82	5,88	7,81	AT2G27 510	AtHBP2_HBP2_SOUL-1__SOUL heme-binding family protein
PGSC0003DMT4000 65039	13,33	12,39	17,61	8,64	8,07	6,4	9,52	5,17	8,04	7,28		SBT1.8__Subtilase family protein
PGSC0003DMT4000 56161	4,55	5,08	6,06	3,58	4,03	2,93	3,36	1,38	3,4	3,77	AT4G39 770	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein
PGSC0003DMT4000 34851	127,49	118,51	153,29	86,71	76,35	63,98	66,35	65,11	73,01	76,26	AT5G52 070	
PGSC0003DMT4000 92392	26,02	41,3	32,62	24,43	20,48	18,13	16,52	14,47	12,37	10,51	AT2G37 970	
PGSC0003DMT4000 10044	12,03	18,11	15,59	10,13	12,1	11,2	5,88	5,51	6,81	8,62	AT2G05 920	
PGSC0003DMT4000 05002	49,11	67,99	75,06	52,74	41,9	36,52	29,67	28,94	38,98	34,49	AT3G44 190	
PGSC0003DMT4000 45787	9,43	13,66	12,7	6,26	4,66	5,6	6,72	5,51	6,81	5,12		

Down Cluster 1	Control (bien regado)					R. hídrica						Homólogo de Arabidopsis	
	Spunta C3	Spunta C1	Spunta C2	CH2 C1	CH2 C2		Spunta H3	Spunta H1	Spunta H2	CH2 H1	CH2 H2	AGI	annotation
PGSC0003DMT4000 19012	7,15	7,31	8,95	2,98	1,86	2,93	5,32	3,44	2,78	4,31			
PGSC0003DMT4000 78007	55,61	80,39	72,17	16,69	9,93	39,72	29,11	35,14	30,63	28,3	AT1G07 400	HSP20-like chaperones superfamily proteinHSP20-like chaperones superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 40664	11,06	15,25	15,3	8,64	4,35	6,66	7,84	6,55	7,73	10,51			
PGSC0003DMT4000 28566	10,08	13,66	11,26	4,47	8,69	5,33	5,6	6,89	5,57	5,93	AT2G39 020	NATA2__Acyl-CoA N-acyltransferases (NAT) superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 68224	192,53	184,28	196,88	131,41	126,94	95,44	102,46	96,45	104,88	112,64	AT1G27 650	ATU2AF35A__U2 snRNP auxiliary factor small subunit , putativeATU2AF35A__U2 snRNP auxiliary factor small subunit, putative	
PGSC0003DMT4000 78341	40	54,33	46,19	23,84	20,48	27,46	22,68	22,05	32,17	30,72	AT2G01 410	NHL domain-containing protein	
PGSC0003DMT4000 00546	149,28	152,51	163,97	96,25	91,25	73,85	84,82	80,61	87,24	83,54	AT5G52 660	RVE6__Homeodomain-like superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 73455	54,31	71,17	53,69	30,1	30,11	36,52	37,79	17,91	21,04	29,64	AT5G20 190	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 80588	333,35	343,46	391,44	227,36	219,12	182,35	196,52	174,31	184,7	190,79	AT1G79 920	AtHsp70-15__Hsp70-15__Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein	
PGSC0003DMT4000 55201	42,6	53,06	48,79	30,99	33,83	26,39	24,64	24,46	30,01	25,06	AT5G13 970		
PGSC0003DMT4000 03214	20,49	28,91	27,14	18,18	11,48	13,6	13,16	13,43	13,92	12,13			
PGSC0003DMT4000 89913	61,79	67,36	71,3	26,22	23,9	36,52	31,35	37,55	28,46	30,72	AT5G59 720	HSP18.2__heat shock protein 18.2HSP18.2__heat shock protein 18.2	
PGSC0003DMT4000 06452	16,91	30,5	25,98	12,81	11,17	13,86	14,84	10,68	8,04	10,51	AT3G21 330	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 74842	199,04	217,01	214,2	122,17	137,49	107,97	115,34	115,06	111,68	102,67	AT1G67 360	LDAP1__SRP1__Rubber elongation factor protein (REF)	
PGSC0003DMT4000 62236	97,24	131,22	124,71	98,63	73,25	74,11	54,87	62,35	81,06	74,38	AT4G18 010	5PTASE2__AT5PTASE2__IP5PIL__myo-inositol polyphosphate 5-phosphatase 2	
PGSC0003DMT4000 80154	14,64	16,52	19,63	11,32	6,83	9,6	9,24	8,96	9,28	7,55	AT1G56 720	Protein kinase superfamily protein	

Down Cluster 1	Control (bien regado)					R. hídrica						Homólogo de Arabidopsis	
	Spunta C3	Spunta C1	Spunta C2	CH2 C1	CH2 C2							Spunta H3	Spunta H1
PGSC0003DMT4000 06584	24,07	54,33	48,21	32,18	30,11	28,79	21,28	19,29	41,46	36,65	AT1G80 440	KFB20_KMD1__Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 54667	7,81	8,26	9,53	5,07	6,52	2,93	5,04	6,2	4,02	5,39	AT1G31 280	AGO2_AtAGO2__Argonaute family protein	
PGSC0003DMT4000 44590	50,08	68,31	71,01	44,7	49,97	41,86	34,43	28,94	55,69	49,31	AT3G07 600	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 83245	11,06	13,03	12,7	9,24	6,52	6,13	6,44	7,92	8,04	7,28	AT4G35 160	ASMT__O-methyltransferase family protein	
PGSC0003DMT4000 30164	81,96	84,83	98,44	62,28	64,25	47,72	53,47	47,19	49,5	49,05	AT1G27 760	ATSAT32_SAT32__interferon-related developmental regulator family protein / IFRD protein family	
PGSC0003DMT4000 00446	100,17	115,65	121,24	82,24	81,94	64,78	69,15	54,77	69,92	68,99	AT4G00 550	DGD2__digalactosyl diacylglycerol deficient 2	
PGSC0003DMT4000 60736	71,22	84,2	81,41	27,71	31,04	43,46	42,83	46,5	38,05	35,03	AT5G37 670	HSP20-like chaperones superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 12508	7,15	14,3	13,86	8,34	6,83	5,33	8,12	6,55	6,5	6,74	AT4G34 110	ATPAB2_PAB2_PABP2__poly(A) binding protein 2	
PGSC0003DMT4000 70252	166,51	189,05	181,58	120,68	121,66	113,84	100,22	95,42	111,37	103,75	AT3G57 810	Cysteine proteinases superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 97155	14,64	24,15	22,52	11,62	9,93	11,73	13,16	11,02	17,94	14,01	AT1G30 200	F-box family protein	
PGSC0003DMT4000 29793	142,12	141,71	146,07	86,71	88,77	79,18	92,38	83,71	86,01	82,46	AT3G12 050	Aha1 domain-containing protein	
PGSC0003DMT4000 51809	366,53	402,88	404,15	251,49	264,44	229,54	239,64	237	235,12	244,69	AT5G48 570	ATFKBP65_FKBP65_ROF2__FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein	
PGSC0003DMT4000 12801	22,77	22,24	22,81	14,9	15,83	13,06	15,96	12,06	12,68	14,55	AT4G23 760	Cox19-like CHCH family protein	
PGSC0003DMT4000 37283	17,56	20,33	23,38	15,2	18,93	13,33	11,76	12,06	18,87	12,67			
PGSC0003DMT4000 03652	259,85	392,39	445,43	177,89	175,98	237,54	217,8	210,82	223,06	187,02	AT5G15 450	APG6_AtCLPB3_CLPB-P_CLPB3__casein lytic proteinase B3	
PGSC0003DMT4000 33477	35,77	46,71	39,84	30,39	27,31	22,66	28,55	23,77	29,08	28,56	AT3G20 300	Protein of unknown function (DUF3537)	
PGSC0003DMT4000 44868	99,84	122,64	114,6	70,03	72,32	64,25	67,47	76,82	67,13	76,53	AT3G13 224	RBGD3__RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	
PGSC0003DMT4000 60090	149,6	145,52	160,21	119,79	117,63	94,64	99,66	88,53	103,02	99,98	AT5G04 410	anac078_NAC2_NAC78_NTL11__NAC domain containing protein 2	
PGSC0003DMT4000	10,41	13,34	11,26	8,94	6,52	8,26	7	6,55	7,73	8,62	AT3G09		

Down Cluster 1	Control (bien regado)					R. hídrica					Homólogo de Arabidopsis		
	Spunta C3	Spunta C1	Spunta C2	CH2 C1	CH2 C2						Spunta H3	Spunta H1	Spunta H2
67356												280	
PGSC0003DMT4000 66737	20,81	29,55	24,54	15,2	12,41	15,2	18,2	13,43	13,92	13,74	AT1G49 450	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 31836	16,59	17,48	20,21	15,2	9,93	11,2	12,88	9,99	14,85	14,82			
PGSC0003DMT4000 20522	75,78	89,28	96,13	47,97	46,25	53,32	53,47	57,18	59,71	52,55	AT5G47 830		
PGSC0003DMT4000 06434	39,35	51,79	51,1	30,69	29,17	32,79	32,75	25,15	35,58	32,88	AT5G11 730	Core-2/I-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein	
PGSC0003DMT4000 63955	52,04	71,49	65,24	44,99	41,28	39,19	38,63	43,06	49,81	47,43	AT1G21 410	SKP2A__F-box/RNI-like superfamily protein	
PGSC0003DMT4000 90902	32,85	29,55	34,35	19,96	23,59	20,79	22,96	18,26	22,58	22,64	AT3G45 210	Protein of unknown function, DUF584	
PGSC0003DMT4000 55753	12,36	15,57	17,61	12,81	11,17	9,06	10,64	9,65	6,5	6,2	AT1G01 480	ACS2_AT-ACC2__1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 2	
PGSC0003DMT4000 19325	54,31	58,46	61,49	46,48	43,45	38,92	38,35	35,14	38,98	42,31	AT1G13 310	Endosomal targeting BRO1-like domain-containing protein	
PGSC0003DMT4000 65182	87,81	121,05	131,35	80,75	89,39	75,45	71,39	73,03	77,96	87,04	AT1G69 850	AIT1_AtNPF4.6_ATNRT1:2_NPF4.6_NRT1.2_NRT1:2_NTL1__nitrate transporter 1:2	
PGSC0003DMT4000 66175	20,16	27,32	32,91	20,26	24,21	19,99	13,44	18,6	21,97	21,83	AT4G33 920	APD5__Protein phosphatase 2C family protein	

**Cuadro S3.9: Genes regulados positivamente expresados diferencialmente en restricción hídrica entre plantas Spunta y *BBX21-OE* (Cluster 1).**

Up Cluster 1 probe set	Control (bien regado)					R. hídrica						Homólogo de Arabidopsis	
	Spunta C3	Spunta C1	Spunta C2	CH2 C1	CH2 C2	Spunta H3	Spunta H1	Spunta H2	CH2 H1	CH2 H2	AGI	annotation	
PGSC0003DMT4000472 99	10,8	5,77	3,9	0,6	0,93	17,08	9,65	20,26	0	1,89	AT3G1899 0	REM39_VRN1__AP2/B3-like transcriptional factor family protein	
PGSC0003DMT4000799 29	1,59	1,44	1,3	2,38	3,72	14,56	7,92	16	1,86	4,85	AT2G1837 0	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	
PGSC0003DMT4000531 56	0,64	1,15	0	0,6	0,62	3,08	2,41	2,13	0,62	0,81	AT5G6509 0	BST1_DER4_MRH3__DNase I-like superfamily protein	
PGSC0003DMT4000352 84	0,64	1,44	1,3	0,6	0,93	4,48	3,1	4,53	0,93	1,35	AT1G0724 0	UGT71C5__UDP-glucosyl transferase 71C5	
PGSC0003DMT4000323 19	0,64	0,58	0,33	0	0,62	2,8	1,72	1,87	0,93	0,54	AT5G5385 0	DEP1__haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	
PGSC0003DMT4000562 55	4,77	6,06	4,88	4,47	6,52	15,4	12,75	13,6	5,57	4,31	AT5G4419 0	ATGLK2_GLK2_GPRI2__GOLDEN2- like 2	
PGSC0003DMT4000234 36	0,64	1,15	0,33	0,89	1,86	2,52	3,1	2,93	1,24	0,81	AT5G5319 0	AtSWEET3_SWEET3__Nodulin MtN3 family protein	
PGSC0003DMT4000011 84	0,95	0,58	0,65	0,6	0,62	2,8	1,72	3,2	1,24	0,81			
PGSC0003DMT4000743 56	4,45	3,18	1,95	2,09	2,48	15,12	11,37	19,73	8,66	5,66	AT5G2408 0	Protein kinase superfamily protein	
PGSC0003DMT4000458 38	5,72	4,33	5,2	2,38	2,79	11,2	9,99	8,53	4,33	5,12	AT3G1881 0	AtPERK6_PERK6__	
PGSC0003DMT4000750 55	3,81	2,02	3,9	4,17	3,41	7,84	7,23	7,46	3,4	3,77	AT3G5175 0		
PGSC0003DMT4000693 92	7,94	5,77	6,18	4,77	12,1	12,32	14,81	16,8	8,66	5,66	AT5G6316 0	BT1__BTB and TAZ domain protein 1	
PGSC0003DMT4000595 25	7,31	4,33	4,23	3,28	4,97	16,52	13,78	22,39	10,21	9,7	AT1G1821 0	Calcium-binding EF-hand family protein	
PGSC0003DMT4000330 77	5,08	4,91	4,55	4,77	5,59	8,68	10,68	9,33	6,19	4,85	AT3G0632 0	Ribosomal protein L33 family protein	
PGSC0003DMT4000839 78	12,07	12,7	11,71	7,15	20,79	22,68	21,36	28,79	16,09	12,13	AT3G1779 0	ATACP5_ATPAP17_PAP17__purple acid phosphatase 17	
PGSC0003DMT4000513 49	9,53	9,24	7,15	9,24	7,76	16,52	12,06	18,66	9,59	9,43	AT2G4039 0		
PGSC0003DMT4000481 01	2,22	1,44	3,58	2,68	4,66	5,6	6,89	6,66	4,95	3,23	AT1G7940 0	ATCHX2_CHX2__cation/H+ exchanger 2	
PGSC0003DMT4000227 98	21,29	20,78	19,19	17,28	19,55	34,71	30,31	35,19	25,37	22,64			
PGSC0003DMT4000307	13,34	8,37	10,73	8,64	14,9	17,36	19,64	24,26	17,63	13,47	AT5G0101		

Up Cluster 1	Control (bien regado)					R. hídrica	Spunta H3	Spunta H1	Spunta H2	CH2 H1	CH2 H2	Homólogo de Arabidopsis	
	Spunta C3	Spunta C1	Spunta C2	CH2 C1	CH2 C2							AGI	annotation
96												5	
PGSC0003DMT400002189	8,9	8,37	8,13	5,66	12,41	12,32	15,5	16,53	12,07	11,05	AT4G35160	ASMT__O-methyltransferase family protein	
PGSC0003DMT400045507	6,04	4,33	6,5	5,36	8,69	8,12	10,68	10,93	8,04	8,62	AT5G48820	ICK6_KRP3__inhibitor/interactor with cyclin-dependent kinase	

**Cuadro S3.10: Genes regulados negativamente expresados diferencialmente en restricción hídrica entre plantas Spunta y *BBX21-OE* (Cluster 2).**

Down Cluster 2	Control (bien regado)					R. hídrica	Spunta H3	Spunta H1	Spunta H2	CH2 H1	CH2 H2	Homólogo Arabidopsis		
	Spunta C3	Spunta C1	Spunta C2	CH2 C1	CH2 C2							AGI	annotation	
PGSC0003DMT400063236	2,28	0,95	1,44	1,49	2,17	0,27	0,28	0			2,17	1,08	AT2G16890	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
PGSC0003DMT400076796	2,6	1,91	2,31	4,17	2,79	0	0,28	1,38			2,47	4,58	AT5G39420	cdc2cAt__CDC2C
PGSC0003DMT400021864	6,5	3,5	2,31	4,77	8,38	0,8	0,84	1,03			2,47	8,62	AT5G24030	SLAH3__SLAC1 homologue 3
PGSC0003DMT400035267	3,25	2,22	2,02	1,19	1,86	0,27	0	1,72			1,55	4,31	AT5G20820	AtSAUR76__SAUR76
PGSC0003DMT400061578	4,88	4,77	4,33	5,07	9,31	3,2	0,56	2,07			6,5	7,28	AT3G52710	
PGSC0003DMT400016688	4,23	4,13	4,04	4,77	5,9	1,33	1,96	1,72			3,71	7,01	AT3G50150	Plant protein of unknown function (DUF247)
PGSC0003DMT400023921	1,95	5,4	4,33	0,89	3,1	1,6	1,12	1,72			3,09	5,39	AT1G80830	ATNRAMP1_NRAM P1_PMIT1__natural resistance-associated macrophage protein 1
PGSC0003DMT400072433	4,88	3,5	2,31	1,79	5,9	2,13	0,56	0,69			3,09	2,96	AT2G39210	Major facilitator superfamily protein
PGSC0003DMT400068478	3,58	2,54	3,18	2,38	3,72	1,07	1,68	0,69			2,17	3,77	AT3G15030	MEE35__TCP4__TCP family

Down Cluster 2	Control (bien regado)			CH 2 C1	CH 2 C2	R. hídrica	Spunta H2	CH2 H1	CH 2 H2	Homólogo Arabidopsis		
	Spunta C3	Spunta C1	Spunta C2							AGI	annotation	
											transcription factor 4	
PGSC0003DMT400042944	22,44	14,62	18,76	27,41	36,93	14,4	10,64	9,99	26,3	30,18	AT2G40610	ATEXP8_ATEXPA8_ATHEXP ALPHA 1.11_EXP8_EXPA8_expansin A8
PGSC0003DMT400026096	6,5	9,85	8,95	5,66	5,9	3,2	2,24	4,48	7,42	8,35	AT2G03500	EFM_HHO4__Homeo domain-like superfamily protein
PGSC0003DMT400032693	10,73	15,57	9,53	4,47	10,86	5,87	3,92	5,51	12,07	12,13	AT1G02170	ATMC1_AtMCP1b_ATMCPB1 _L3_MC1_MCP1b __metacaspase 1
PGSC0003DMT400064306	56,91	63,86	66,97	61,38	49,66	39,19	34,99	37,89	66,52	64,94	AT4G37260	ATMYB73_MYB73__myb domain protein 73
PGSC0003DMT400040337	12,68	10,49	10,39	11,92	11,17	4,8	5,6	8,27	6,81	15,09		
PGSC0003DMT400075781	18,86	18,11	15,88	15,2	16,14	10,4	8,96	13,43	16,09	20,75	AT2G01770	ATVIT1_VIT1__vacuolar iron transporter 1