



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**“CDPKs en dos procesos de desarrollo: la
tuberización en *Solanum tuberosum* y la
nodulación en *Medicago* spp.”**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad
de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Pablo Rubén Gargantini

Director de tesis: Rita M. Ulloa

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y
Biología Molecular (INGEBI)

Buenos Aires, 2006

“CDPKs en dos procesos de desarrollo: la tuberización en *Solanum tuberosum* y la nodulación en *Medicago spp.*”

RESUMEN

En este trabajo se estudió la participación de las CDPKs en dos procesos de desarrollo: la tuberización y la nodulación.

Por un lado se obtuvo la secuencia genómica de StCDPK1, se determinó su estructura y organización génica y se la comparó con otras quinasas pertenecientes al grupo II-A de las CDPKs. La localización cromosómica más probable de este gen resultó ser el extremo distal “inferior” del cromosoma 12. Además se obtuvo un anticuerpo policlonal anti-StCDPK1 con el cual se confirmó la presencia de esta isoforma en las fracciones solubles y particuladas de estolones inducidos, siendo mayor en la fracción asociada a membranas. Se observó que la proteína StCDPK1 aumenta en respuesta a concentraciones crecientes de sacarosa en forma gradual, alcanzando el máximo a 8% sacarosa (condiciones inductoras de tuberización).

Se obtuvieron plantas transgénicas con expresión disminuida de *StCDPK1* ($\beta 7$) que mostraron cierta insensibilidad a las giberelinas (GAs). Además, presentaron una respuesta más temprana a las condiciones inductoras de la tuberización y una sensibilidad aumentada a las altas concentraciones de sacarosa. En presencia de hormonas inductoras de la tuberización (ácido abscísico - ABA y bencilaminopurina - BAP) la expresión de *StCDPK1* no se vio afectada en la línea transgénica $\beta 7$, pero sí en las plantas salvajes, lo mismo ocurrió al estudiar el efecto de las GAs a tiempos cortos. Nuestros datos sugieren que *StCDPK1* podría estar involucrada en la tuberización, y que la sacarosa y las fitohormonas ABA y BAP estimulan su transcripción, actuando como un regulador negativo de este proceso de desarrollo.

Por otra parte en *Medicago truncatula* se identificó una CDPK (*MtCPK3*) que se expresa principalmente en raíces en desarrollo. Estudios de expresión de *MtCPK3* y otra isoforma de alfalfa estrechamente relacionada (*MsCPK3*), junto con datos de actividad quinasa dependiente de calcio, indicaron que estas isoformas pueden participar en los eventos de fosforilación que ocurren durante la formación del nódulo. Ensayos de expresión transitoria mostraron que la miristoilación y

palmitoilación son necesarias para la localización en membrana plasmática de estas isoformas.

Se detectó una inducción temprana (10 minutos) de *MtCPK3* en raíces inoculadas con *Rhizobium* sp. que resultó estar asociada a una respuesta al estrés inducido por la infección. Asimismo las citoquininas indujeron la expresión de *MtCPK3*, sugiriendo que esta isoforma podría ser un componente común en las señales de transducción disparada por *Rhizobium* sp., citoquininas y estrés abiótico.

Raíces transgénicas con expresión disminuida de *MtCPK3* produjeron un número significativamente mayor de nódulos que las plantas control, sugiriendo que esta quinasa podría regular negativamente la acción de señales vegetales que controlan la relación entre los tejidos proveedores de energía y aquellos de reserva.

Palabras claves: tuberización, nodulación, *Solanum tuberosum*, *Medicago truncatula*, quinasa de proteínas dependiente de calcio (CDPK), fosforilación, giberelinas, citoquininas, plantas transgénicas.

“CDPKs in two developmental processes: the tuberization in *Solanum tuberosum* and the nodulation in *Medicago* spp.”

ABSTRACT

In this work the participation of CDPKs in two developmental processes: the tuberization and the nodulation was studied.

On one side the genomic sequence of StCDPK1 was obtained, its structure and genetic organization was determined and compared with others kinases of the CDPKs group II-A. The most probable chromosomic location of this gene turned out to be the distal end of chromosome 12. In addition, a polyclonal antibody against StCDPK1 was obtained and the presence of this isoform in the soluble and particulate fractions of induced stolons was confirmed, being greater in the membrane-associated fraction. It was observed that the StCDPK1 protein increased in the presence of different sucrose concentrations, being highest at 8% sucrose (tuber inducing conditions). Transgenic plants with diminished expression of StCDPK1 ($\beta 7$) showed certain insensibility to gibberellins (GAs). In addition, they displayed an earlier response to tuber inducing conditions and an increased sensitivity to high sucrose concentrations. In the presence of tuber inducing hormones (abscisic acid - ABA and benzilaminopurine - BAP) *StCDPK1* expression was not affected in the transgenic line $\beta 7$, but it increased in wild type plants; the same happened when studying the early response to GAs. Our data suggest that StCDPK1 could be a negative regulator of tuberization eventhough sucrose and the phytohormones ABA and BAP stimulate its transcription.

On the other hand, we identified a *Medicago truncatula* CDPK (*MtCPK3*) that is mainly expressed in developing roots. Expression studies of *MtCPK3* and *MsCPK3* (a closely related isoform in alfalfa), along with calcium dependent protein kinase activity assays indicated that these isoforms could participate in the phosphorylation events triggered during nodule formation. Transient expression studies showed that myristoylation and palmitoylation are necessary for the plasma membrane localization of these isoforms. An early *MtCPK3* induction (10 minutes) was detected in *Rhizobium* sp. inoculated roots, but turned out to be associated to a stress response induced by the infection. Cytokinins also induced *MtCPK3* expression,

suggesting that this isoform could be a common component in the transduction pathways triggered by *Rhizobium* sp., cytokinins and abiotic stress. Transgenics roots with diminished *MtCPK3* expression produced more nodules (x 3) than control plants, suggesting that this kinase could negatively regulate the action of plant signals that control sink-source interactions.

Key words: tuberization, nodulation, *Solanum tuberosum*, *Medicago truncatula*, calcium dependent protein kinase (CDPK), phosphorylation, gibberellins, cytokinins, transgenic plants.

AGRADECIMIENTOS

Al CONICET, por la beca otorgada para la realización del Doctorado.

A la Dra. Rita Ulloa, por haberme brindado la posibilidad de comenzar mi formación científica y poder realizar esta Tesis Doctoral bajo su dirección.

Al Dr. Héctor Torres y la Dra. Mirtha Flawiá por haberme permitido ser parte de la gran familia que es el INGEBI.

A la Dra. M. Teresa Téllez-Iñón, por hacerme sentir un becario más en su laboratorio y confiar en mí.

Al Dr. Martín Crespi y todas las personas de su laboratorio, en especial a Florian y Silvina, por haber compartido esa linda experiencia de trabajar en otro país.

Al Dr. Fernando Bravo, por su ayuda con las plantas transgénicas.

A mis compañeros del 211: Vero, Fede, Dani, Esteban, Marina, Nati, Ezequiel, Marina y a los que una vez formaron parte del laboratorio, por ser no sólo mis compañeros de mesada sino también mis amigos.

Al resto de compañeros del INGEBI, por todos los momentos compartidos, las charlas, los consejos y hacerme sentir un compañero más en cada laboratorio.

A Briardo (sí, es un nombre) por su amistad y alegría.

A los miembros de la secretaría del INGEBI, por su ayuda y cariño.

A Mari, Francisco, Gladis y Leo, por su ayuda incondicional con nuestro trabajo cotidiano.

A mi hermano del alma Juancho, por su interés en mis cosas y por estar siempre presente a la distancia.

A Dani, Diego, Joaquín y Manuel, por ayudarme siempre con todo. Sin ustedes hubiera sido imposible el estar hoy aquí.

A mis padres, no alcanzarían las palabras para agradecer su cariño y apoyo. Son un ejemplo de vida, la mejor enseñanza que recibí, aquella que ningún libro puede transmitir.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN

Transducción de señales en células vegetales

1. Aspectos generales	1
1.1 ¿Qué conocemos acerca del circuito control que gobierna tan compleja señalización?	2
1.2 Las células vegetales contienen dos sistemas de información: genético y epigenético	3
1.3 La especificidad de la transducción de señales surge de la localización espacial específica de los elementos involucrados	3
1.4 La transducción de señales utiliza redes de interacción en las células, entre células y en toda la planta	4
2. Calcio	6
2.1 La señalización mediada por Ca^{2+} involucra una separación de las diferentes concentraciones de Ca^{2+} por membranas	7
2.2 Especificidad de la respuesta	8
2.3 El calcio activa enzimas: La función de “interruptor” químico	9
2.4 Sensores de Calcio	9
2.4.1 Calmodulina	10
2.4.2 Proteínas que unen CaM	10
2.4.3 Proteínas similares a CaM	11
2.4.4 Otras proteínas que unen Ca^{2+}	11
3. Quinasas de proteínas Serina/Treonina en plantas	12
3.1 Clasificación de las quinasas de proteínas	12
3.1.1 Subfamilia de Quinasas de Proteínas relacionadas con SNF1	14
3.1.2 Subfamilia de Quinasas Semejantes a Receptores (RLKs)	15
3.1.3 Subfamilias MAP Quinasa (MAPK), MAP Quinasa Quinasa (MAPK K) y MAP Quinasa Quinasa Quinasa (MAPKKK)	15
3.1.4 Subfamilia de Quinasas Dependiente de Ciclina (CDK)	16
3.1.5 Subfamilias de Quinasas de Caseína I (CK1) y Quinasas de Caseína II (CK2)	17
3.1.6 Subfamilia GSK3/Shaggy	17
3.2 Subfamilia de Quinasas de Proteínas Dependientes de Calcio (CDPK)	18
El proceso de tuberización	
4. La tuberización	26
4.1 Control de la tuberización por la duración del día	27
4.1.1 La duración del día es percibido en las hojas	27
4.1.2 Fitocromos	28
4.2 Altos niveles de nitrógeno inhiben la tuberización	28
4.3 Altas temperaturas inhiben la tuberización	29
4.4 Las giberelinas retrasan la tuberización	29
4.5 Otras señales hormonales	30
4.5.1 Acido Abscísico	30
4.5.2 Acido Jasmónico	31
4.5.3 Citoquininas	31
4.6 Expresión génica durante el desarrollo del tubérculo	32
Resultados previos	
5. CDPKs y tuberización	34
5.1 Identificación de CDPKs en <i>Solanum tuberosum</i>	34

5.2 Caracterización de StCDPK1	35
5.3 Isoformas de CDPK presentes durante la tuberización	35
5.4 Localización subcelular de StCDPK1	36
5.5 Efecto de reguladores de tuberización sobre la expresión y actividad de CDPKs	37
El proceso de nodulación	
6. La nodulación	40
6.1 Señalización de factores Nod	41
6.2 Receptores de factores Nod	43
6.3 Componentes de señalización comunes en simbiosis	43
6.4 Respuesta a factores Nod	43
6.5 Genes regulando el número de nódulos	44
6.6 Otros genes involucrados	45
6.7 Citoquininas y nodulación	45
OBJETIVOS GENERALES	48
MATERIALES y MÉTODOS	49
Materiales	
1. Cepas	49
1.1 Cepas bacterianas de E.coli	49
1.2 Cepa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	49
1.3 Cepa de <i>Agrobacterium rhizógenes</i>	49
1.4 Cepas de <i>Sinorhizobium meliloti</i>	49
2. Medios de cultivo	49
2.1 Cultivo de bacterias	49
2.2 Cultivo de plantas	50
3. Material Vegetal	50
3.1 Plantas de papa	49
3.1.1 Sistema de tuberización <i>in vitro</i>	50
3.1.2 Cultivo de plantas de invernadero	50
3.2 Plantas de alfalfa	50
4. Soluciones generales	50
4.1 Soluciones empleadas en técnicas de ADN y ARN	50
4.2 Soluciones empleadas en técnicas de proteínas	51
5. Oligonucleótidos	51
5.1 Clonado StCDPK1 en vectores binarios	51
5.2 Generales	51
5.3 Específicos StCDPKs	51
5.4 PCRs semicuantitativas de StCDPKs	52
5.5 Expresión de StCDPK1 en pET22b+	52
5.6 Localización cromosómica de StCDPK1	52
5.7 Clonado de <i>MtCPK3</i>	52
5.8 Transformación de <i>M. truncatula</i>	52
5.9 PCRs semicuantitativas de <i>MsCPK3</i>	52
5.10 Clonado de <i>MsCPK3 ::GFP</i>	52
5.11 Real Time qRT-PCR	52
6. Plásmidos	52
7. Sondas	53
7.1 Ensayos de Southern Blot	53
7.2 Rastreo de la biblioteca genómica	53
7.3 RT-PCRS semicuantitativas	53
8. Bibliotecas genómica	53
9. Anticuerpos	53
10. Inhibidores	53

Métodos	
1. Identificación de genes	54
1.1 Preparación y transformación de bacterias competentes	54
1.2 Purificación de plásmidos	55
1.3 Rastreo de la biblioteca genómica	56
1.4 Escisión <i>in vivo</i> de fagos positivos	57
1.5 Secuenciación y análisis de las secuencias	57
1.6 Marcación de sondas radioactivas	57
2. Técnicas generales	58
2.1 Subclonado en pGEMT-easy	58
2.2 Otras reacciones de ligación	58
2.3 Corte con enzimas de restricción	58
2.4 Amplificaciones por PCR	58
2.5 Electroforesis de ADN	58
2.6 Purificación de fragmentos de ADN de geles	58
2.7 Purificación y precipitación de ácidos nucleicos	59
2.8 Localización cromosómica de StCDPK1	59
2.8.1 Geles de secuencia MDE (Mutation Detection Enhancement)	59
2.8.2 Corrida electroforética	59
2.8.3 Tinción con plata	59
3. Caracterización molecular de genes identificados	60
3.1 Cuantificación de ácidos nucleicos	60
3.2 Extracción de ADN genómico	60
3.3 Ensayos de Southern Blot	60
3.4 Extracción de ARN total	61
3.5 Electroforesis de ARN	61
3.6 Ensayos de Northern Blot	61
3.7 Transcripción reversa	62
3.8 PCRs semicuantitativas	62
4. Estudios bioquímicos	63
4.1 Extracción de proteínas	63
4.2 Cuantificación de proteínas	63
4.3 Electroforesis de proteínas	63
4.4 Ensayos de actividad CDPK	63
4.5 Ensayos de Western Blot	64
4.6 Stripping de membranas de nitrocelulosa	64
5. Proteínas recombinantes StCDPK1	64
5.1 Expresión de proteínas recombinantes	64
5.2 Purificación de proteínas recombinantes en condiciones desnaturalizantes	65
5.3 Obtención de Anticuerpos	65
5.4 Purificación de anticuerpos	65
6. Determinación de clorofila	66
7. Transformación de discos de papa vía <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	66
8. Transformación de raíces de <i>M. truncatula</i> vía <i>Agrobacterium rhizogenes</i> (Hairy roots)	66
9. Inoculación con bacterias simbióticas	67
10. Tratamiento de <i>Medicago truncatula</i>	67
11. Análisis por Real Time qRT-PCR	67
12. Estudios de localización de MsCPK3. Transformación transitoria de células de cebolla	67
13. Tratamiento con fosfatasa	68
14. Inmunolocalización	68

RESULTADOS	69
1 - Obtención del clon genómico para StCDPK1	69
1.1 – Obtención de la secuencia genómica de StCDPK1	69
1.1.1 – Rastreo de una biblioteca genómica	69
1.1.2 – Obtención de la secuencia genómica completa	71
1.2 – Estructura genómica de StCDPK1	73
1.3 – Localización cromosómica de StCDPK1	76
2 - Producción de un anticuerpo policlonal que reconozca StCDPK1	79
2.1 – Obtención del anticuerpo policlonal anti-StCDPK1	79
2.1.1 – Clonado de la región amino terminal de StCDPK1	79
2.1.2 – Expresión de StCDPK1 recombinante en bacterias	80
2.1.3 – Purificación de la proteína recombinante StCDPK1-His6x	81
2.1.4 – Producción de anticuerpos policlonales anti-StCDPK1	81
2.2 - Detección de StCDPK1 en extractos de papa	82
2.2.1 – Ensayo de Western blot	82
2.3 - Inmunolocalización de StCDPK1	84
2.3.1 – Inmunolocalización en cortes histológicos de <i>S. tuberosum</i>	84
3 - Obtención de plantas transgénicas para StCDPK1	86
3.1 – Construcciones	86
3.1.1 – Estrategias de clonado	86
3.2 – Transformación de agrobacterias	88
3.3 – Transformación de discos de papa	89
3.4 – Estudio de la expresión del transgén	91
3.5 – Selección de plantas con expresión alterada de StCDPK1	92
3.5.1 – Análisis por Western blot	93
3.5.2 – Análisis de plantas con expresión alterada de StCDPK1 en diferentes condiciones de tuberización	93
3.5.3 – Efecto de la concentración de sacarosa	97
3.5.4 – Tratamiento con diferentes hormonas	98
3.6 – Características de las plantas $\beta 7$ cultivadas <i>in vitro</i>	100
3.7 – Efecto de las giberelinas sobre plantas salvajes	101
4 – CDPKs en el proceso de nodulación	103
4.1 – Obtención de <i>MtCPK3</i>	103
4.2 – Expresión de <i>MtCPK3</i> en diferentes órganos	105
4.3 – Ensayos de Western blot	106
4.4 – Medición de la actividad quinasa dependiente de calcio	107
4.5 – Expresión de <i>MsCPK3</i> en raíces de alfalfa inoculadas con <i>Sinorhizobium meliloti</i>	109
4.6 – Localización subcelular de <i>MsCPK3</i> en células de cebolla	110
4.7 – Inmunolocalización de <i>MtCPK3</i> en raíces de <i>M. truncatula</i>	112
4.8 – Expresión de <i>MtCPK3</i> en raíces de <i>M. truncatula</i> durante la nodulación	112
4.9 - Analisis de actividad CDPK en extractos de plantas inoculadas	115
4.10 – Expresión de <i>MtCPK3</i> en raíces de <i>M. truncatula</i> ante diferentes estreses abióticos	116
4.11 – Expresión de <i>MtCPK3</i> en raíces de <i>M. truncatula</i> ante el tratamiento con citoquininas	117
4.12 – Obtención de raíces transgénicas <i>MtCPK3</i> -RNAi	119
DISCUSIÓN	122
CONCLUSIONES	135
BIBLIOGRAFÍA	137

INTRODUCCIÓN

Transducción de señales en células vegetales

1 – Aspectos generales

A través de su ciclo de vida las plantas y células vegetales responden continuamente a señales externas e internas que afectan su fisiología, morfología y desarrollo. Su evolución las ha optimizado para que, en su estilo de vida sedentario, obtengan el máximo provecho de su contacto con el medio ambiente. Si bien es necesaria cierta distribución de funciones entre diferentes tipos celulares, la mayoría de las células vegetales son capaces de sensor casi todas las señales a las que la planta puede responder.

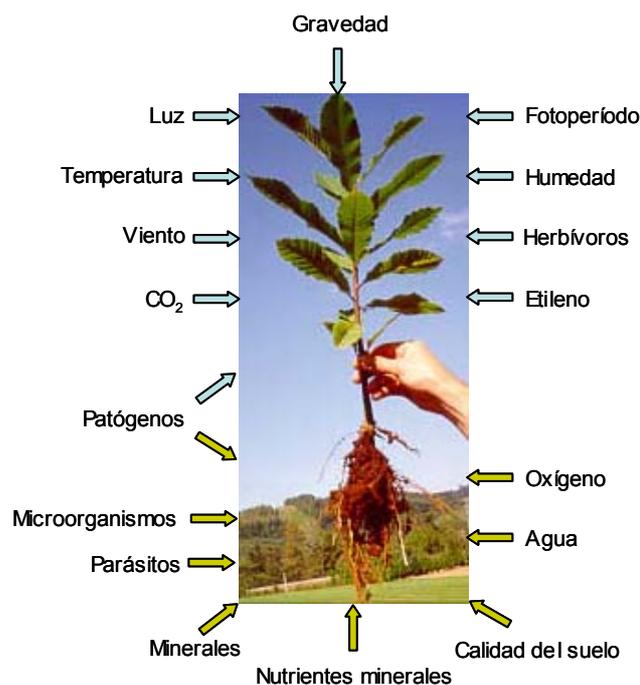


Figura 1 - Señales externas que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas. (Adaptada de Gilroy y Trewavas, 2001)

La percepción de las señales es llevada a cabo en el contexto de un medio ambiente que cambia minuto a minuto. Como se observa en la Figura 1 existen numerosas señales diferentes y cada una es a su vez capaz de influir en la respuesta a las demás. Entre los estímulos que transmiten información a las plantas están: la luz, los nutrientes minerales, los metabolitos orgánicos, la gravedad, el contenido de agua, el turgor, la calidad del suelo, las tensiones mecánicas, el viento,

el calor, el frío, las heladas, los reguladores de crecimiento y hormonas, el pH, los gases (CO_2 , O_2 , C_2H_4), el daño y las enfermedades (Gilroy y Trewavas, 2001).

A su vez existe una gran variedad de señales internas que modifican el metabolismo, crecimiento y desarrollo celular de las plantas. La habilidad de las células a responder a estas señales no está confinada a las células que se encuentren aún en crecimiento y desarrollo. Las células maduras pueden también iniciar respuestas metabólicas y pueden a su vez reiniciar el crecimiento y la división en respuesta a la información recibida.

Las señales pueden variar en calidad y cantidad de minuto a minuto. Las respuestas de las plantas a estos estímulos están moduladas por la edad de desarrollo, la experiencia ambiental previa, y los relojes internos que especifican el tiempo del año y el tiempo del día. Para células maduras, la respuesta puede ser fisiológica y bioquímica; para células en crecimiento ésta puede ser morfológica y de desarrollo. Las rutas de transducción de señales conducen los estímulos ambientales hacia efectos finales dentro de la planta, estos efectos van desde fluctuaciones reversibles en el movimiento de iones hasta cambios en la activación génica y eventos transcripcionales coordinados que finalmente conducen a nuevos programas de desarrollo o a respuestas defensivas multifacéticas.

Podemos preguntarnos cuántos genes parecen estar involucrados como componentes específicos de la transducción de señales. Se piensa que un mínimo de 300 genes son necesarios para producir una célula bacteriana. Sin embargo, bacterias como *Escherichia coli* contienen unos 3000 genes. Los aparentemente innecesarios 2700 genes restantes (90%) son necesarios para proveer a la bacteria de la habilidad de tolerar las variaciones ambientales fluctuantes, capacitando así al organismo para responder a ellas. Si esto se extrapola a las plantas superiores, las cuales se desarrollan y reproducen en un medio ambiente variable, entonces la mayoría del genoma debería estar involucrado en la transducción de señales de una manera u otra.

1.1 - ¿Qué conocemos acerca del circuito control que gobierna tan compleja señalización?

Es obvio que los circuitos control son redes. El comportamiento sobre la base de estas redes debe ser robusto, y la robustez puede ser lograda utilizando complejas mezclas de controles por “feedback” negativos y positivos. La redundancia es necesaria para la confiabilidad, podemos esperar isoformas de proteínas presentes en abundancia y la superposición de circuitos control para proveer soluciones a posibles errores. Estos circuitos control deberían ser

modulares, con algunos elementos específicos para cada señal pero con otros elementos compartidos.

La estabilidad estructural también debería estar presente, de otra manera los cambios en parámetros de señalización que resulten de variabilidad en células y tejidos, o cambios constitutivos en proteínas durante la evolución, podrían destruir los programas básicos que soportan la morfología. La fuerza de la conexión entre los elementos de la red de señalización será variable: algunos débiles otros fuertes. A medida que el contexto ambiental cambia así también lo hará la fuerza de las conexiones entre las proteínas y otras moléculas que forman la red.

1.2 - Las células vegetales contienen dos sistemas de información: genético y epigenético

El sistema genético de información en células vegetales se da de la siguiente forma: ADN > ARN > Proteína > Fenotipo.

Esta secuencia implica cierta rigidez y simplicidad en el resultado. Algunos genes como los que especifican el color de las flores o la morfología de las semillas no varían en su expresión bajo diferentes condiciones de crecimiento y desarrollo, existiendo una relación directa entre la expresión de un único gen y el carácter fenotípico que especifica.

Por otro lado, muchas características fenotípicas importantes son fuertemente modificadas por el medio ambiente en el cual la planta crece, como ser la producción de biomasa, la duración del crecimiento, respuestas a estrés, etc. En estos casos la característica fenotípica se desarrolla sobre la base de genes epistáticos, cuyos productos alteran la expresión de otros genes que fueron heredados independientemente, y de genes pleiotrópicos, genes únicos que afectan múltiples características. Estos caracteres epigenéticos resultan de una red compleja de interacciones entre los productos de estos genes y las distintas vías de transducción de señales. Los fenotipos asociados con tales genes pueden ser estudiados solamente en condiciones rígidamente controladas.

1.3 - La especificidad de la transducción de señales surge de la localización espacial específica de los elementos involucrados

La naturaleza ha generado un arreglo importante de secuencias aminoacídicas para asegurar que las enzimas correctas estén en el lugar indicado en el momento indicado. La activación espacial y temporal precisa de los componentes de una vía de transducción de señales es crítica debido a que el "ruido" bioquímico que podría enmascarar la señal debe ser llevado a un mínimo.

Como los segundos mensajeros transmiten señales a través de compartimentos celulares que contienen diferentes quinasas y fosfatasa, es crítico activar solo los transductores de señal apropiados. Un mecanismo para lograr esto involucra el anclaje de componentes específicos de una cascada de señales a proteínas “andamio”, generando un gran complejo de proteínas denominado “Transducción” (Figura 2). (Faux y col., 1996; Ferl, R.J., 1996)

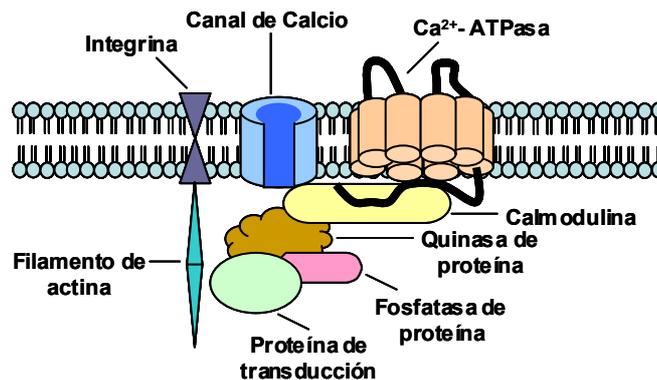


Figura 2 – Constituyentes sugeridos para un Transducción, complejo de proteínas que actúan para transducir las señales. El Canal de Calcio y la Ca^{2+} -ATPasa están involucradas en la regulación de la señal de calcio; la calmodulina, la quinasa y la fosfatasa de proteínas manejan la interpretación de la señal de calcio. (Adaptada de Gilroy y Trewavas, 2001)

1.4 - La transducción de señales utiliza redes de interacción en las células, entre células y en toda la planta

Hay distintos pasos por los cuales los factores ambientales disparan cambios en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Primero el estímulo debe ser percibido para que, finalmente el metabolismo celular modificado lleve a un cambio en el crecimiento y/o la diferenciación celular. Mientras algunos estímulos inician vías de desarrollo completamente nuevas, como ser la inducción de la floración, otros simplemente modifican el patrón o la dirección del crecimiento. El crecimiento es orientado por estímulos ambientales de tal forma que este ocurre a favor o en contra del mismo, estos movimientos del crecimiento son conocidos como tropismos. En muchos casos estos tropismos están mediados por moléculas señal que estimulan o reprimen el crecimiento y pueden iniciar o alterar distintas vías de desarrollo. Estas moléculas especiales reguladoras son conocidas como hormonas, entendiéndose a estas como cualquier molécula que actúa naturalmente como una señal para regular el crecimiento y desarrollo de la planta.

Muchas de las llamadas hormonas tienen un receptor o receptores al cual se unen, su unión inicia una cascada de cambios celulares que constituye una vía de transducción de señales. En algunos casos la unión de la hormona a su receptor

resulta en la formación de un segundo mensajero intracelular, como el Ca^{2+} , que luego inicia la cascada reguladora. Un componente común en esta cascada reguladora es la fosforilación de varias proteínas celulares, alterando su actividad biológica.

La fosforilación de proteínas es el mecanismo central de los procesos de transducción de señales (Marks, 1996) y posee un papel fundamental en el metabolismo vegetal (Fallon y col., 1993). La fosforilación ocurre principalmente en aminoácidos como serina, treonina y tirosina, aunque otros aminoácidos, como lisina, arginina, histidina y aspartato pueden fosforilarse en determinadas condiciones. Existen numerosas quinasas de proteínas que juegan un papel esencial en la fisiología y el desarrollo vegetal. Se ha demostrado la existencia de un gran número de quinasas de proteínas y probablemente cada una de ellas esté involucrada en funciones altamente específicas (Stone y Walker, 1995; Harmon y col., 1996).

Dos de los elementos principales en las vías de transducción de señales de células vegetales son el Ca^{2+} intracelular y las quinasas de proteínas, enzimas que fosforilan y por lo tanto alteran la actividad de enzimas blanco.

En plantas, el Ca^{2+} intracelular transduce muchas señales y es un prominente segundo mensajero cuya concentración en el citoplasma debe ser varios órdenes de magnitud menor que su concentración en la pared celular. Durante la señalización, los aumentos leves y transitorios del Ca^{2+} intracelular son a menudo asociados con la iniciación de respuestas. Las numerosas vías de transducción de señales en las cuales el Ca^{2+} intracelular actúa, involucran cientos de proteínas diferentes, así como otros segundos mensajeros en el citoplasma y en la membrana plasmática.

Por su parte, los genes que codifican para Quinasas de proteínas representan cerca del 3 al 4 % del genoma. En cualquier momento dado, las células estarán usando cientos de diferentes quinasas de proteínas.

Cambios en la concentración intracelular del Ca^{2+} pueden iniciar distintas respuestas que varían de acuerdo a la estructura celular y son sensibles a la interacción entre componentes específicos de sistemas de señalización.

De la misma manera, una quinasa de proteínas puede tener muchas proteínas blanco, pero éstas difieren entre los distintos tipos celulares y sus etapas de desarrollo. Muchas señales interactúan en forma cooperativa y sinérgica unas con otras para producir la respuesta final. En algún momento de la transducción por lo tanto, las señales individuales deben afectar reacciones y proteínas que están fuertemente interrelacionadas o que son idénticas.

2 – Calcio

El calcio es un mensajero de múltiples mensajes. Ha sido sugerido que el sentido y transporte del Ca^{2+} evolucionó de un sistema para proteger a las células de la toxicidad del Ca^{2+} . Estos sistemas de detoxificación luego proveyeron los modelos de nuevos sensores que utilizan Ca^{2+} como mensajero, como las Quinasas de Proteínas Dependientes de Calcio e independientes de Calmodulina (CDPKs) en plantas. Así como las plantas y los animales evolucionaron, sus sistemas de señalización de Ca^{2+} también divergieron y se hicieron más complejos (Harper y Harmon, 2005).

Entre todos los segundos mensajeros propuestos en plantas, el único que sin duda puede ser considerado como tal es el Ca^{2+} . Hay dos criterios que definen la dependencia del Ca^{2+} intracelular en los procesos de señalización. Primero, la señal debe estimular cambios observables en la concentración de Ca^{2+} intracelular o en el flujo de Ca^{2+} a través de membranas (a menudo difícil de detectar) que debe preceder a una respuesta fisiológica. Segundo, estas respuestas fisiológicas asociadas con cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular deben ser reproducidas artificialmente. Este ión es el único que cumple con todos los criterios necesarios para ser aceptado como mensajero en la regulación de procesos fisiológicos disparados por estímulos primarios (Poovaiah y Reddy, 1993; Bush, 1995).

Los cambios en la concentración de Ca^{2+} citosólico inducidos por diferentes estímulos primarios en la célula vegetal son sentidos y desencadenan diversas respuestas fisiológicas. Dichos cambios pueden ser transitorios, sostenidos u oscilatorios y el tiempo requerido para alcanzar una respuesta máxima puede variar desde pocos segundos hasta varias horas. Los incrementos transitorios son inducidos por estímulos tan diversos como el tacto o el viento (estímulos mecánicos) (Knight y col., 1991), cambios de temperatura (Knight y col., 1991; Monroy y Dhindsa, 1995), estrés oxidativo y elicitores fúngicos (Knight y col., 1991). La velocidad y simplicidad de la cinética de estos cambios indican que estas modificaciones ocurren en forma temprana en las rutas de transducción de señales. Un segundo grupo de estímulos induce una respuesta del Ca^{2+} citosólico que es más lenta y compleja. Algunas hormonas (ABA, citoquininas, auxinas y GA_3) (Felle y col., 2000; Schroeder y Hagiwara, 1990; Hahn y Saunders, 1991; Bush, 1995) y otros estímulos, como por ejemplo la luz roja (Fallon y col., 1993), inducen aumentos del Ca^{2+} citosólico que se mantienen durante períodos de varios minutos hasta varias

horas. Esta cinética lenta y relativamente compleja indica que luego de la estimulación intervienen múltiples procesos de regulación de la homeostasis del Ca^{2+} citosólico.

2.1 - La señalización mediada por Ca^{2+} involucra una separación de las diferentes concentraciones de Ca^{2+} por membranas

La señalización mediada por Ca^{2+} depende de gradientes electroquímicos de transmembrana a través de la membrana plasmática y de membranas intracelulares. Las células mantienen concentraciones muy bajas de Ca^{2+} citosólico (100 a 200 nM) para facilitar los procesos de señalización.

La vacuola y el retículo endoplásmico rugoso constituyen grandes depósitos intracelulares de Ca^{2+} (aprox. 1 mM). El catión puede ser movilizado por inositol 3 fosfato (IP3) y otras señales sintetizadas en la membrana plasmática. En la pared celular, donde el Ca^{2+} es utilizado como molécula estructural, su concentración es estimada entre 0,5 y 1 mM. También la mitocondria, los cloroplastos y hasta el núcleo pueden actuar como depósitos de Ca^{2+} (Figura 3).

Cuando las células reciben señales, los canales de Ca^{2+} son abiertos transitoriamente y la concentración de Ca^{2+} intracelular aumenta rápidamente. Numerosas proteínas que unen Ca^{2+} son entonces activadas, incluyendo Calmodulina y CDPKs. Además de este flujo de Ca^{2+} procedente del exterior celular, existen otros provenientes del interior que fluyen a través de las endomembranas, pudiendo ser igualmente importantes en el patrón de señales de este catión (Kreimer y col., 1985; Santella y Carafoli, 1997).

Las señales dadas por la concentración de Ca^{2+} intracelular son frenadas por la actividad de ATPasas localizadas en la membrana plasmática, el tonoplasto y membranas del retículo endoplásmico y de la mitocondria. Estas bombas restablecen y mantienen bajas las concentraciones del Ca^{2+} citoplasmático. Utilizan la energía liberada en la hidrólisis del ATP para bombear el Ca^{2+} fuera del citoplasma en contra de su gradiente electroquímico y a su vez son reguladas por fosforilación.

Durante la señalización, la concentración de Ca^{2+} intracelular puede alcanzar transitoriamente concentraciones muy altas, particularmente cerca de los canales abiertos. Estas altas concentraciones no pueden ser toleradas por mucho tiempo porque el Ca^{2+} puede interferir con el metabolismo celular al competir con el magnesio (Mg^{2+}) por el ATP.

La proporción de Ca^{2+} libre que difunde en el citoplasma es más lenta que en una solución; esto es importante en la señalización vía Ca^{2+} porque se pueden

formar gradientes estables del catión. Empleando ^{45}Ca se ha visto que la tasa con la que el Ca^{2+} difunde en el citoplasma es 2 veces menor que en una solución libre debido a que se une al citoesqueleto y a proteínas libres del citosol o a que es secuestrado en las organelas intracelulares. En general una segregación espacial del Ca^{2+} intracelular en estados definidos puede promover la señalización específica.

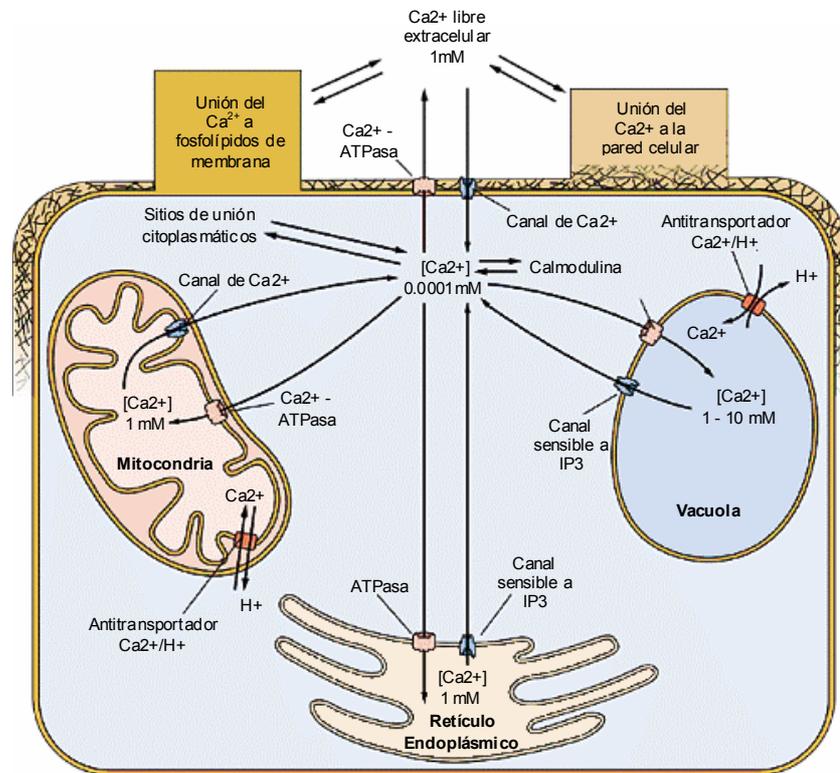


Figura 3 – Las relaciones entre los depósitos de calcio en las células vegetales son conocidas por su complejidad, siendo las concentraciones de calcio elevadas en las organelas y en la pared celular, y bajas en el citoplasma. (Adaptada de Gilroy y Trewavas, 2001)

2.2 - Especificidad de la respuesta

Son pocas las señales que no involucran cambios en la concentración intracelular del Ca^{2+} , por lo tanto, ¿cómo puede una molécula tan simple dar lugar a respuestas fisiológicas tan diferentes? Es decir, cómo puede un mismo segundo mensajero estar involucrado en tantas vías de señalización diferentes e igualmente permitir la existencia de respuestas altamente específicas.

Diversos factores intervienen en el control de la especificidad de las diferentes señales que desencadenan aumentos en las concentraciones intracelulares de calcio.

Uno de los aspectos de su especificidad involucra la duración de la señal por sí misma. Los influxos de Ca^{2+} que duren más tiempo pueden penetrar más en el citoplasma y por lo tanto encontrar enzimas dependientes de Ca^{2+} localizadas centralmente.

También puede jugar un rol especial la especificidad espacial. Así como los canales de Ca^{2+} están concentrados en las puntas de los tubos de polen en

crecimiento, los receptores pueden estar agrupados de tal manera que sólo algunas partes del citoplasma reciban las señales.

Otro factor clave y determinante de la especificidad de la respuesta es la existencia de una gran variedad de sensores de Ca^{2+} (Reddy, 2001a). Cada uno de ellos posee un patrón de expresión particular, una localización subcelular determinada y blancos de acción altamente específicos.

En un trabajo reciente, Sanders y colaboradores (2002) discuten un punto adicional. Los autores sugieren que el Ca^{+2} podría ser una señal primaria, necesaria pero no suficiente, para desencadenar la respuesta final, y plantean la existencia de señales secundarias esenciales para determinar la especificidad.

2.3 - El calcio activa enzimas: La función de “interruptor” químico

El calcio controla la actividad no solo de los transportadores de iones sino también de muchas otras proteínas ya sea directa o indirectamente (vía factores de unión al Ca^{2+}). Los cloroplastos por ejemplo poseen un gran número de proteínas (ej: fotosistema II, tiorredoxinas, ferredoxina y enzimas del ciclo de Calvin) que necesitan del Ca^{2+} para funcionar correctamente. Hay muchos otros ejemplos donde el Ca^{2+} modula la función de una proteína. Frecuentemente las proteínas que unen Ca^{2+} como las calmodulinas (Snedden y Fromm, 2001) o las CDPKs (Romeis y col., 2001) funcionan como elementos amplificadores de la señal. Dada la relación encontrada entre estímulos ambientales, cambios específicos en la concentración de Ca^{2+} citosólico y la activación selectiva de enzimas o genes, se puede asumir que el Ca^{2+} tiene una función de interruptor químico. Sin embargo, esta asunción debe ser tomada en el contexto de actividades simultáneas de otros componentes en la célula (Scrase-Field y Knight, 2003), y las conclusiones deben tomarse con mucho cuidado.

2.4 - Sensores de Calcio

La percepción y transducción de las señales de calcio ocurren mediante la unión del catión a diferentes sensores, que pueden dividirse en dos grupos:

1. Aquellos que sufren un cambio conformacional y a su vez interaccionan con otras proteínas que modifican su actividad, por ejemplo las Calmodulinas (CaMs) y las proteínas similares a la Calcineurina-B (que es la subunidad reguladora de la fosfatasa dependiente de Ca^{2+} /CaM).

2. Aquellos que sufren un cambio conformacional que modifica directamente su actividad, como por ejemplo las CDPKs, cuya estructura y función se discutirá mas adelante.

2.4.1 - Calmodulina

La calmodulina (CaM) es una proteína pequeña (15 a 17 KDa) y altamente conservada. Es el principal receptor de Ca^{2+} tanto en plantas como en animales. Es una proteína ubicua con un amplio rango de funciones y es un componente fundamental en las rutas de señalización en las que interviene el Ca^{2+} .

Aunque no tiene actividad enzimática en sí misma, modula la actividad de numerosas proteínas enzimáticas y no enzimáticas de una forma dependiente de Ca^{2+} . La calmodulina se encuentra en el citoplasma y el núcleo, pudiéndose unir también a la membrana plasmática. Su concentración celular varía ampliamente entre los distintos tipos celulares y sus etapas de desarrollo.

Es una proteína altamente conservada, de los 150 aminoácidos que componen la molécula, sólo 13 difieren entre las calmodulinas animales y vegetales. Tiene cuatro sitios de unión a Ca^{2+} , ricos en aspartato y glutamato, constituidos por 12 aminoácidos cada uno. Las constantes de disociación para los iones Ca^{2+} están en el rango entre 10^{-6} y 10^{-5} M bajo condiciones fisiológicas de pH y fuerza iónica.

Las CaMs de plantas unen Ca^{2+} con una afinidad y estequiometría similar a las de otras calmodulinas y experimentan también cambios conformacionales similares. Sin embargo, hay diferencias sutiles en la capacidad de algunas de ellas para activar algunas enzimas, y estas diferencias pueden estar relacionadas con rasgos estructurales únicos de las CaMs de plantas (Roberts y col., 1986).

Los significados fisiológicos de sus diferentes isoformas y proteínas relacionadas no están claros. Al estar codificadas por distintos genes, su expresión puede estar diferencialmente controlada y pueden tener diferente localización celular y tisular. Por ejemplo en *Arabidopsis thaliana* los mensajeros de las isoformas 1 y 2 se expresan mucho más en tejidos en desarrollo que en tejidos diferenciados.

Al unir Ca^{2+} , la CaM cambia su estructura terciaria exponiendo una región hidrofóbica la cual es reconocida por regiones específicas de proteínas blanco.

2.4.2 - Proteínas que unen CaM

El papel de la CaM en una determinada célula o tejido queda determinado por la presencia de sus proteínas blanco (CBPs o Calmodulin Binding Proteins).

En plantas, mediante técnicas bioquímicas y de interacción proteína-proteína, se han identificado unas 24 proteínas que unen CaM en forma dependiente de calcio. Las CBPs son proteínas muy diversas implicadas en una gran variedad de procesos que incluyen el transporte de iones, la regulación de la expresión de genes, la organización del citoesqueleto, la división celular, la resistencia a patógenos y la tolerancia a distintos tipos de estrés (Reddy, 2001a).

En la mayoría de los casos, la CaM se une a sus proteínas blanco en presencia de Ca^{2+} . Sin embargo, existen CBPs que interaccionan con la CaM en ausencia del catión. Por ejemplo las miosinas, motores moleculares presentes en células animales, poseen dominios de unión a CaM conocidos como motivos IQ (por contener isoleucina y glutamina en su secuencia de aminoácidos). En plantas, se han identificado miosinas muy similares a las de animales que presentan los motivos IQ característicos (Reddy, 2001b), pero su regulación todavía no ha sido demostrada.

2.4.3 - Proteínas similares a CaM

Además de las CaMs se han identificado un número de proteínas similares en plantas. Estas proteínas son más grandes que la CaM y presentan de 1 a 6 motivos EF-hand con baja homología con la CaM. Es posible que sean funcionalmente diferentes a la CaM y que estén involucradas en el control de otras respuestas celulares mediadas por calcio.

Recientemente se ha identificado una nueva familia de proteínas que unen calcio llamada CBL (proteínas similares a la Calcineurina B) (Kudla y col., 1999). En *Arabidopsis* se ha aislado la proteína SOS3 involucrada en la respuesta al estrés salino (Liu y col., 1998). SOS3 presenta homología con la subunidad regulatoria de la Calcineurina B. Además del gen SOS3, hay por lo menos otros 6 genes que codifican para proteínas de la familia CBL en *Arabidopsis*. Algunos de estos genes, por ejemplo *AtCBL2* y *AtCBL3*, son constitutivos, mientras que otros, como *AtCBL1*, son inducidos por estrés (Kudla y col., 1999).

Las CBL son capaces de interactuar con otras proteínas y regular su actividad. En plantas, se han identificado quinasas de proteínas, homólogas a la familia SNF1 y AMPK de levaduras y mamíferos, que interaccionan con estas proteínas. La interacción CBL-Quinasas es muy llamativa dado que en animales las CBL son activadores de fosfatasas (Reddy, 2001a).

Algunas proteínas similares a la CaM poseen un dominio de prenilación en su extremo carboxilo terminal que está involucrado en la regulación de la localización subcelular (Xiao y col., 1999). Este es otro factor sumamente importante para determinar la especificidad de la respuesta.

2.4.4 - Otras proteínas que unen Ca^{2+}

Además de los sensores ya mencionados, existen proteínas capaces de unir calcio que carecen de motivos EF-hand. Dentro de este grupo se encuentran las Anexinas, la Calreticulina y la Proteína de pistilo PCP (Reddy, 2001a).

3 – Quinasas de proteínas Serina/Treonina en plantas

Los miembros de la superfamilia de quinasas de proteínas catalizan la transferencia reversible del fosfato gama (γ) del ATP al grupo hidroxilo de los aminoácidos serina, treonina o tirosina de las proteínas blanco.

En muchos casos, la fosforilación modifica la actividad de la proteína blanco. Una quinasa de proteínas puede fosforilar cientos de proteínas blanco amplificando enormemente señales débiles.

Aunque la fosforilación de proteínas ocurre principalmente en los aminoácidos serina, treonina y tirosina, otros aminoácidos como la lisina, arginina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico y cisteína pueden ser fosforilados bajo ciertas condiciones. Los residuos serina y treonina son fosforilados en el 99% de las ocasiones, mientras que la fosforilación de tirosina representa sólo entre un 0,01 a 0,05% (Walton y Dixon, 1993).

Esta superfamilia de proteínas está presente en todos los reinos (animales, plantas, hongos y protozoos), por lo tanto el gen progenitor para ellas puede remontarse a un tiempo anterior a la separación evolutiva de los reinos eucariotas. Las primeras secuencias de quinasas de proteínas de plantas fueron reportadas en 1989, y ya a mediados de 1998 había más de 500, incluyendo unas 175 en *Arabidopsis thaliana* solamente.

La red de quinasas de proteínas Ser/Tre en células vegetales parece actuar como una “unidad procesadora central” (cpu), aceptando la información que llega desde los receptores, que actúan como sensores de las condiciones ambientales, fitohormonas y otros factores externos, y convirtiéndola en mensajes apropiados que provocan cambios en el metabolismo, en la expresión génica, en el crecimiento y en la división celular.

3.1 - Clasificación de las quinasas de proteínas

Las quinasas de proteínas pueden ser estudiadas mediante ensayos bioquímicos utilizando su habilidad para fosforilar sustratos proteicos particulares. Sin embargo, un problema inherente a este estudio puramente bioquímico es la dificultad de comparar los resultados obtenidos por diferentes laboratorios, especialmente cuando se utilizan diferentes especies o tejidos.

Una quinasa de proteínas es rigurosamente definida solamente cuando la secuencia del ADN y/o aminoácidos puede ser establecida. Por lo tanto las

similitudes en la secuencia de aminoácidos parece ser el método más lógico para clasificar las quinasas de proteínas.

El dominio catalítico de la mayoría de las quinasas de proteínas consiste en una región de 300 aminoácidos. Este dominio conservado tiene varias inserciones y modificaciones que permiten la clasificación de las quinasas en distintos grupos:

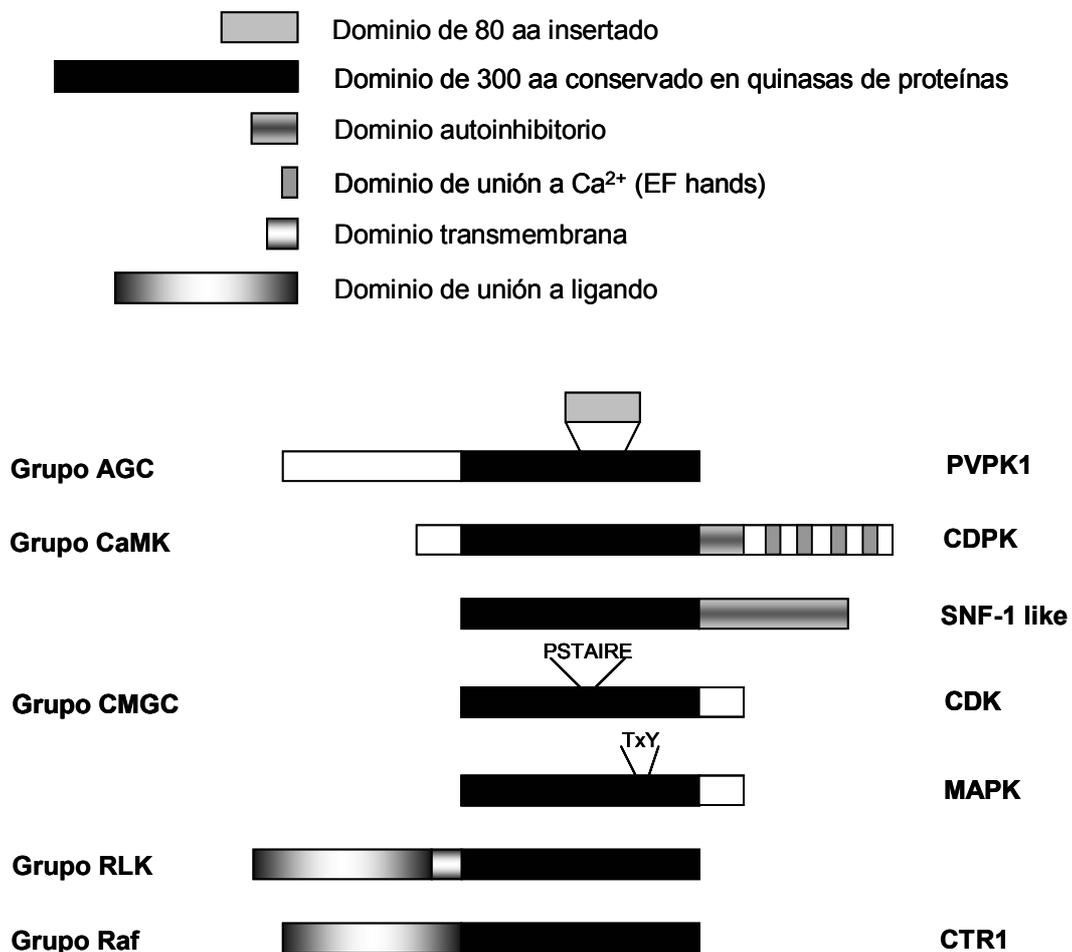
Grupo AGC: está representado por quinasas de proteínas dependientes de nucleótidos cíclicos (ej. PKA, PKG) y quinasas de proteínas dependientes de Ca^{2+} y fosfolípidos (ej. PKC) y la familia de quinasas ribosomales S6.

Grupo CaMK: son quinasas de proteínas que son activadas por o dependen de Ca^{2+} y/o CaM (ej. CDPK, SNF-1 like).

Grupo CMGC: incluye las familias de quinasas de proteínas dependientes de ciclinas (CDK), quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK), glucógeno sintetasa quinasas (GSK-3) y las Quinasas de Caseína I y II (CKI y CKII).

Grupo RLKs: Quinasas Semejantes a Receptores (Receptor-Like Kinases).

Grupo Raf: es una quinasas de proteínas tipo Raf, (Raf-like PK, CTR1).



Algunas quinasas se encuentran tanto en plantas como en animales (por ejemplo SNF1, CDKs, CKII y MAPKs), mientras que otras parecen ser exclusivas de animales (por ejemplo las quinasas de proteínas dependientes de nucleótidos cíclicos y las PTKs) o ser exclusivas de plantas (RLKs, CDPKs, Ts1, PVPK1).

El patrón que emerge de esta comparación es sumamente interesante e implica que los eventos tempranos de la transducción de señales en plantas están mediados por quinasas de proteínas únicas de plantas, pero luego estas señales convergen en rutas que utilizan quinasas más conservadas y que son comunes a todos los eucariotas.

Dentro de estos grupos se profundizará en aquellas quinasas de proteínas más conocidas cuya participación específica dentro de la compleja red de quinasas que conforman la llamada “unidad procesadora central” en distintas células vegetales ha sido demostrada:

3.1.1 - Subfamilia de Quinasas de Proteínas relacionadas con SNF1

La quinasa de proteína SNF1 de la levadura *S. cerevisiae* está involucrada en la respuesta al déficit de glucosa, mientras que su homóloga animal, la quinasa de proteínas activada por AMPc (PKA) está involucrada en la respuesta a estrés celular que produce depleción de ATP (Halford y col., 1998; Hardie y col., 1998). Ambas quinasas existen como complejos heterotriméricos con una subunidad catalítica α (codificada por el gen SNF1 en levadura), y las subunidades no catalíticas β y γ , las cuales parecen tener roles en la regulación y en la señalización del complejo.

En las plantas se encontraron dos subfamilias de quinasas de proteínas relacionadas con SNF1/PKA: la subfamilia SnRK1 que está relacionada con SNF1 y la subunidad α de la PKA a través del dominio de quinasa y del dominio regulatorio, y la familia SnRK2 que sólo está relacionada a través del dominio de quinasa.

Las quinasas de proteínas relacionadas con SNF1-1 (SnRK1) forman grandes complejos multiméricos (como lo hacen sus homólogos animales y de levadura). Sin embargo, las subunidades regulatorias β y γ no han sido identificadas en plantas (Barker y col., 1996). A diferencia de la PKA (pero como la SNF1) no parecen ser activadas por AMPc, pero son reguladas por fosforilación por una quinasa río arriba. El residuo treonina específico que es fosforilado en la PKA por una PKAK (Hawley y col., 1996) y la secuencia que lo rodea están conservados en todas las secuencias de SnRK1 de plantas. Por analogía con los sistemas animales y de levadura, se considera que las quinasas SnRK1 de plantas serían activadas por

situaciones de estrés (por ejemplo, falta de fuente de carbono) pero esto aún no ha sido demostrado directamente.

Los miembros del grupo de quinasa de proteínas relacionada con SNF1-2 (SnRK2) contienen dominios de quinasa relacionados con los de Snf1 y PKA, pero los dominios carboxilo terminal no están relacionados y se caracterizan por la presencia de residuos ácidos (poli-Glu o poli-Asp). Las funciones y las propiedades bioquímicas de estas quinastas permanecen desconocidas. Tienen especificidad de sustrato similar a la de las quinastas SnRK1 y como ellas, también son reguladas por fosforilación (Ball y col., 1994).

3.1.2 - Subfamilia de Quinastas Semejantes a Receptores (RLKs)

Las RLKs están caracterizadas por una región amino terminal hidrofóbica, y una secuencia hidrofóbica interna seguida por una secuencia básica, sugiriendo que son proteínas de membrana Tipo I con una hélice de transmembrana simple. En la región carboxiloterminar intracelular se encuentran los dominios de quinasta de proteínas (Satterlee y Sussman, 1998).

Los modelos de este grupo son las Quinastas Semejantes a Receptores en las células animales, las cuales son también proteínas de membrana Tipo I con un dominio quinasta intracelular. La mayoría de estas quinastas animales son tirosina quinastas de proteínas (una subfamilia no encontrada aún en plantas) pero hay también un pequeño número de quinastas de proteínas serina/treonina.

Las Quinastas Semejantes a Receptores (RLKs) de plantas presentan similitudes estructurales con las quinastas de mamíferos. Aunque aún no se ha identificado un ligando para ninguna de ellas, se cree que también son receptores (Li y col., 1997).

Se conoce poco sobre las vías de transducción de señales río abajo de las RLKs. Los dominios quinasta de la mayoría de las RLKs se autofosforilan (Walker, 1994), y se ha sugerido, por analogía con el mecanismo de señalización de los "tyrosine kinase-linked receptors" en animales, que esto puede generar sitios comunes para los componentes de los complejos de señalización.

3.1.3 - Subfamilias MAP Quinasta (MAPK), MAP Quinasta Quinasta (MAPKK) y MAP Quinasta Quinasta Quinasta (MAPKKK)

A pesar que estas quinastas caen en diferentes subfamilias cuando las secuencias del dominio quinasta son comparadas, es conveniente considerarlas juntas.

En células animales y levaduras ellas forman cascadas o módulos que operan en la dirección MAPKKK > MAPKK > MAPK.

Se han realizado pocos estudios bioquímicos directos para determinar dónde estas quinasas realmente existen como cascadas en las plantas (Mizoguchi y col., 1994). Aunque aún no se ha descrito una cascada de MAPK en detalle en plantas, hay abundante evidencia que ellas se activan rápidamente por hormonas vegetales y por estímulos como el tacto, el frío, el daño y la infección por patógenos. El método más usado para estudiar la activación de MAPK en plantas, es el ensayo de quinasa en geles (“in-gel kinase assay”) en el cual un sustrato artificial de la MAPK (la proteína básica de mielina, MBP) se fija a un gel de poliacrilamida. Los extractos proteicos son sometidos a electroforesis en condiciones desnaturizantes y luego de renaturalizar las proteínas, el gel es incubado con ATP marcado radioactivamente para localizar las quinasas con capacidad de fosforilar la MBP.

En resumen, las MAPKs parecen estar involucradas a distintos niveles en las respuestas de las plantas a estímulos hormonales y ambientales. El desafío está en determinar cuáles MAPK, MAPKK y MAPKKK están involucradas en cada respuesta, y ver cómo se relacionan con el receptor putativo o con la proteína sensora que se encuentra río arriba y que capta la presencia de dicho estímulo.

En la mayoría de los casos, la activación de las MAPKs es transitoria, y la quinasa es rápidamente inactivada a pesar de la presencia del estímulo.

3.1.4 - Subfamilia de Quinasas Dependiente de Ciclina (CDK)

Las Quinasas dependientes de ciclina (CDKs) de mamíferos y levadura tienen subunidades catalíticas de unos 34 kDa que son pequeños dominios de quinasa. Las CDKs se caracterizan por ser inactivas excepto cuando se unen a una proteína denominada ciclina (Jeffrey y col., 1995). Algunas CDKs son reguladoras críticas para la entrada a fases claves del ciclo celular, como la fase S y la mitosis. Otras por su lado no parecen tener roles conectados con el ciclo celular (Kaffman y col., 1994). En general hay más ciclinas que CDKs, con una sola CDK generalmente teniendo múltiples roles, dependiendo de las ciclinas a las cuales se asocia. La actividad de las CDKs durante el ciclo celular es regulada por la asociación con ciclinas que son sintetizadas y degradadas a diferentes tiempos, por la asociación con proteínas inhibitoras de CDK cuya presencia y/o actividad varía durante el ciclo celular, y por la fosforilación y desfosforilación mediada por quinasas y fosfatasa río arriba.

A pesar de existir diferencias en los mecanismos de la división celular entre los hongos, los animales y las plantas, la maquinaria básica que controla el ciclo celular parece estar conservada (Feiler y col., 1990).

3.1.5 - Subfamilias de Quinasas de Caseína I (CK1) y Quinasas de Caseína II (CK2)

Estas dos subfamilias se consideran juntas a pesar de que no están muy relacionadas.

Las Quinasas de Caseína I y II son llamadas así debido a que fueron originalmente detectadas utilizando la proteína de la leche, caseína, como sustrato. Una característica particular de las CK1 y CK2 es que no parecen estar altamente reguladas *in vivo*, lo que implica que sus funciones permanecen inciertas.

Las CK1s de animales existen como monómeros, están ampliamente expresadas y se encuentran tanto en el citoplasma como en el núcleo (Cobb, 1995).

Una característica inusual de las CK2s de animales es que ellas utilizan tanto GTP como ATP, y son relativamente insensibles al inhibidor general de quinasas denominado estaurosporina. Normalmente existen como tetrámeros $\alpha_2\beta_2$, donde las subunidades α son las catalíticas. Las subunidades β no son esenciales para la actividad, pero modifican la actividad a través de ciertos sustratos.

3.1.6 - Subfamilia GSK3/Shaggy

Cuando el ADN codificante de la Quinasa de la Glucógeno Sintetasa 3 (GSK3) fue clonado se encontró que estaba muy relacionado con el producto del gen shaggy/zeste-white 3 de *Drosophila melanogaster* (Woodgett, 1991).

En mamíferos, GSK3 interviene en la vía de transducción de señales río abajo de los receptores de insulina y del factor de crecimiento similar a insulina 1 ("insulin-like growth factor 1")

Debido a la similitud de secuencia con el gen *shaggy* de *Drosophila* se supone que los integrantes de la subfamilia GSK3/shaggy participan en el desarrollo de las plantas. Sin embargo, aunque diferentes isoformas muestran patrones de expresión específicos de tejido (Decroocqferrant y col., 1995; Einzenberger y col., 1995; Jonak y col., 1995; Pay y col., 1993), hay poca evidencia disponible que señale las funciones reales de la familia GSK3.

3.2 - Subfamilia de Quinasas de Proteínas Dependientes de Calcio (CDPK)

El Ca^{2+} es un mensajero intracelular ubicuo en las células animales, y muchos de sus efectos son mediados por su unión a la proteína de unión a Ca^{2+} llamada Calmodulina. El complejo formado, Calcio-Calmodulina, activa proteínas que unen calmodulina, entre las que se encuentran las Quinasas de Proteínas Dependientes de Calmodulina (CaMKs), las cuales tienen una gran variedad de funciones diferentes.

El Ca^{2+} también es un mensajero intracelular ubicuo en las células vegetales, aumentando en respuesta a una amplia variedad de estímulos como el viento, el tacto, la gravedad, la luz, el frío, auxinas, ácido abscísico, giberelinas, estrés salino y elicitores de hongos (Bush, 1995; Poovaiah y col., 1993). Estas observaciones llevaron a la búsqueda de una quinasa de proteínas dependiente de calmodulina en plantas, pero cuando la primer quinasa de proteínas dependiente de Ca^{2+} fue extensamente purificada de la soja (Harmon y col., 1987) se encontró que se activaba por Ca^{2+} en ausencia de calmodulina exógena. Este comportamiento fue explicado cuando se clonó el ADN y se vio que codificaba para una proteína monomérica con un dominio catalítico de quinasa de proteínas unido a un dominio regulatorio carboxilo terminal con un 39% de identidad con la calmodulina que conservaba los cuatro sitios de unión a Ca^{2+} (EF-hands) (Harper y col., 1991). Por lo tanto las quinasas de proteínas dependientes de Ca^{2+} también pueden ser llamadas o referidas como “Calmodulin-like domain protein kinases”, manteniendo sus siglas iguales (CDPK). Las propiedades estructurales de este dominio permiten la unión reversible de Ca^{2+} con constantes de disociación en rangos micromolares o submicromolares. La unión del ión a dichas proteínas induce cambios conformacionales que resultan en cambios en la actividad de las mismas. Esta subfamilia no parece estar presente en animales y hongos, a pesar de que miembros de la misma han sido encontrados en protistas como *Paramecium tetraurelia* y *Plasmodium falciparum* (Son y col., 1993; Zhao y col., 1993).

Las CDPKs se incluyen dentro de una gran familia de quinasas de proteínas que recibe el nombre de: “La superfamilia de CDPKs” (Harmon y col., 2001). En esta superfamilia existen tres grupos distintivos de quinasas que están muy relacionadas según evidencia de homologías de secuencia y estructura (Hrabak y col., 2003) (Figura 4).

Las CCaMKs, al igual que las CDPKs contienen un dominio regulatorio carboxilo terminal, pero éste sólo posee tres sitios EF-hands y es más similar a la Visinina (perteneciente a la familia de proteínas sensoras de Ca^{2+} neuronales que contienen EF-hands) que a la calmodulina (Patil y col., 1995).

Las Quinasas relacionadas con CDPK (CRK, CDPK-related kinases) están caracterizadas por un dominio regulatorio que tiene alta similitud de secuencia con el CaM-LD de las CDPKs, pero con EF-hands que parecen haber degenerado perdiendo la capacidad de unir Ca^{2+} (también se refiere a ellas como CBKs, Calmodulin Binding Kinases, o CaMKs de plantas) (Hua y col., 2004; Ma y col., 2004; Zhang y Lu, 2003).

A pesar de estas diferencias en sus dominios carboxilo terminal, las tres comparten una característica estructural – un dominio autoinhibidor - que se encuentra localizado entre el dominio quinasa y el dominio regulatorio (Harper y col., 2004). Este dominio autoinhibidor funciona para mantener a las enzimas “apagadas” hasta que las quinasas son activadas.

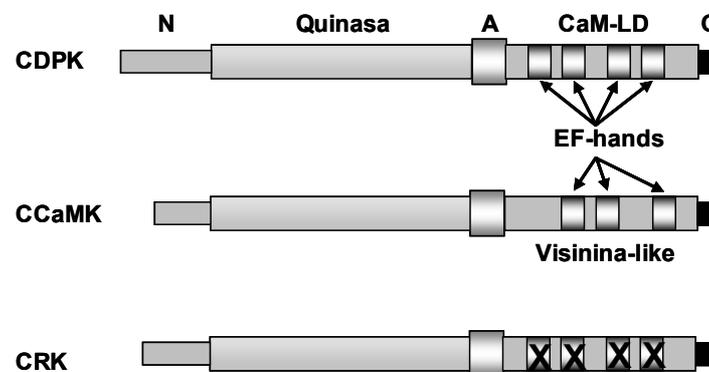


Figura 4 – Las tres quinasas tienen cinco dominios. Un dominio amino terminal (N) de largo y secuencia variable que presenta sitios consenso para miristoilación y palmitoilación, importantes para la asociación a membrana. No se conoce su función. El dominio catalítico (Quinasa) que es más similar entre las CDPKs y las CRKs que con las CCaMKs. El dominio autoinhibitorio (A) o bisagra contiene una secuencia que funciona como pseudosustrato y un sitio de unión para interacciones intermoleculares con calmodulina (en CCaMKs y algunas CRKs) o con el CaM-LD (en CDPKs) o el dominio visinina-like (en CCaMKs). La característica principal de estas tres quinasas es el dominio adyacente al dominio autoinhibitorio. Las CDPKs poseen un dominio regulatorio similar a calmodulina (CaM-LD) que en la mayoría de las isoformas tienen cuatro sitios de unión a Ca^{2+} (EF-hands). En las CRKs, los sitios EF-hands están degenerados o son no funcionales (tachados con una cruz). Las CCaMKs poseen un dominio similar a Visinina con tres EF-hands. El dominio carboxilo terminal (C) de cada quinasa es corto y su función es desconocida.

Esta estructura molecular única permite que las CDPKs puedan ser reguladas por Ca^{2+} en forma directa. Al tener los sitios de unión al Ca^{2+} en el mismo polipéptido, y no en una molécula de calmodulina separada que necesitaría encontrar su blanco de acción por difusión, la respuesta es más rápida. La actividad de estas enzimas se mantiene en un nivel basal en ausencia de Ca^{2+} , el dominio autoinhibidor funciona como un pseudosustrato y bloquea el sitio activo de la enzima. En cambio, en condiciones de activación, el Ca^{2+} se une a la región regulatoria localizada río abajo del dominio autoinhibitorio liberando la inhibición y

permitiendo la fosforilación de sustratos (Harmon y col., 2000). Cuando la CDPK es activada, la unión de Ca^{2+} al CaM-LD dispara un cambio conformacional en este dominio que produce una alteración en la interacción intramolecular entre el CaM-LD y el dominio autoinhibidor desacoplando a éste del sitio activo de la enzima (Figura 5). No se conoce aún cómo la activación por Ca^{2+} desacopla al autoinhibidor. Existen diferencias estructurales y funcionales en el rol de los lóbulos N- y C-terminal del CaM-LD, lo cual es consistente con evidencia reciente proveniente de dos estudios de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) de este dominio (Furumoto y col., 1996; Wang y col., 2004).

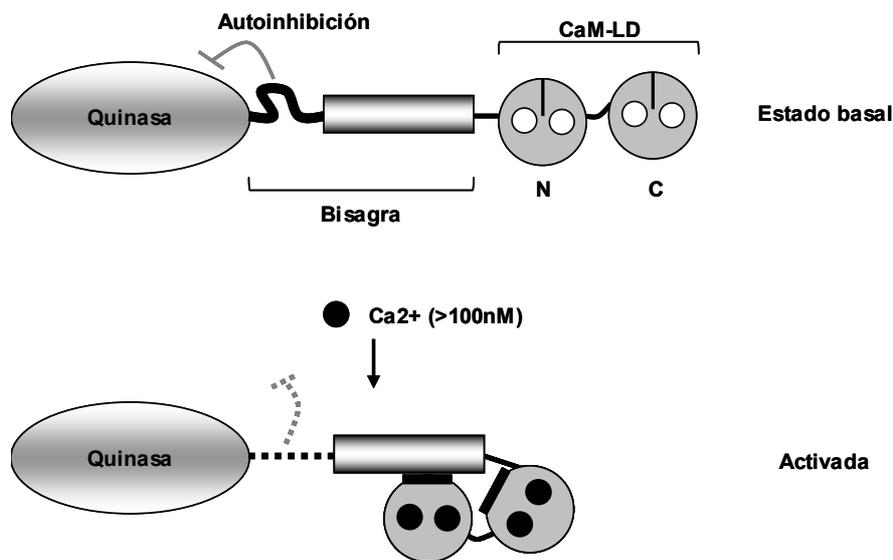


Figura 5 – El dominio bisagra contiene un sitio de autoinhibición y un sitio de unión al CaM-LD. Los lóbulos N- y C-terminal del CaM-LD contienen un par de sitios de unión a Ca^{2+} EF-hands (círculos blancos). La línea perpendicular negra en estos lóbulos representa una conformación cerrada. La conformación abierta se produce cuando los iones de Ca^{2+} (círculo negro) son unidos. (Adaptado de Harper y Harmon, 2005)

Este mecanismo representa uno de los casos donde las plantas han adoptado una estrategia diferente a los animales y hongos, aunque esto es más una variación de una característica que una desviación radical.

Muchas CDPKs han sido clonadas y caracterizadas en una variedad de especies vegetales, incluyendo soja (Harper y col., 1991), zanahoria (Suen y Choi, 1991), *Arabidopsis* (Harper y col., 1993; Urao y col., 1994), arroz (Breviario y col., 1995; Kawasaki y col., 1993), maíz (Estruch y col., 1994; Saijo y col., 1997), liverwort (Nishiyama y col., 1999), garbanzo verde (Botella y col., 1996) y abeto negro (Perry y Bousquet 1998). Las CDPKs poseen un peso molecular que oscila entre 52kDa (soja, Harmon y col., 1987) y 90kDa (*Arachis hypogea*, DasGupta, 1994; arveja, Li y col., 1991). El organismo unicelular *P. falciparum* contiene sólo cinco isoformas de CDPK (Ward y col., 2004). Sin embargo, la secuenciación del genoma de dos

plantas multicelulares no relacionadas, arroz (*Oryza sativa*, una monocotiledónea) y *A. thaliana* (una dicotiledónea) reveló que poseen familias de 27 y 34 isoformas respectivamente (Baxter y col., 2003). La explicación para la expansión familiar de un gen determinado es que las duplicaciones génicas fueron seleccionadas para proveer más copias de genes bajo el control de diferentes promotores, para regular su expresión en respuesta a estímulos específicos o en tejidos específicos, o para disponer de nuevas enzimas con propiedades bioquímicas y funcionales únicas. La conservación de grandes familias génicas en especies de plantas divergentes indica que múltiples isoformas son requeridas para muchas características del desarrollo de las plantas.

Estas enzimas se encuentran tanto en forma soluble (Harmon y col., 1987; Klucis y Polya, 1987; Putnam-Evans y col., 1990; Battey, 1990; DasGupta, 1994) como asociadas a membrana plasmática (Klucis y Polya, 1987; Battey, 1990;), a retículo endoplasmático (Lu y Hrabak, 2002), membrana mitocondrial (Pical y col., 1993), cromatina en núcleos de arveja (Li y col., 1991), a actina y microfilamentos (McCurdy y Harmon, 1992). Hay tres isoformas de CDPK en *A. thaliana* que no poseen estos sitios de acilación y se predice que son solubles (Hrabak y col., 2003). Al menos una isoforma (*AtCPK3*) tiene formas soluble y anclada a membrana, y se la encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo (Dammann y col., 2003). Además de su amplia distribución celular, hay evidencia que algunas CDPKs pueden cambiar de ubicación en respuesta a un tratamiento de estrés (*McCPK1*) (Chehab y col., 2004). A pesar que no está claro si esto representa una traslocación de enzimas preexistentes o un cambio en enzimas sintetizadas *de novo*, todo indica que la localización de CDPK es una característica dinámica.

Se sabe muy poco acerca de la función del dominio aminoterminal variable de las CDPKs pero muchos autores han propuesto que esa región posee información relacionada con la localización subcelular de estas quinasas (Schaller y Sussman, 1988; Harper y col., 1994; Hrabak y col., 1996). Muchas CDPKs presentan secuencias consenso para modificaciones lipídicas como ser la miristoilación N-terminal y/o la palmitoilación. La mayoría de las 34 *AtCPKs* encontradas poseen un residuo glicina en la posición 2, que en un contexto de secuencia adecuado, puede servir como señal para el agregado de un ácido mirístico. De las 34 *AtCPKs*, 24 presentan secuencias consenso de miristoilación pero hasta hoy solamente se ha demostrado la existencia de esta modificación en *AtCPK2*. La miristoilación de esta proteína resultó ser esencial para su localización en la membrana del retículo (Lu y Hrabak, 2002). La miristoilación también se ha

demostrado en CDPKs de otras especies (Ellard-Ivey y col., 1999; Martin y Busconi, 2000, Rutschmann y col., 2002, Raíces y col., 2001; 2003a).

El agregado de un ácido mirístico en la posición 2 no siempre es suficiente para el anclaje a la membrana. Muchas veces es necesaria una segunda modificación, por ejemplo la adición de un ácido palmítico, para estabilizar dicha interacción. La mayoría de las CDPKs que presentan secuencias consenso de miristoilación también poseen residuos cisteína potencialmente palmitoilables en la posición 3, 4 ó 5. La miristoilación es cotraduccional e irreversible, mientras que la palmitoilación es postraduccional, reversible y dependiente de la existencia previa de miristoilación (Thompson y Okuyama, 2000). El papel de la palmitoilación en la localización subcelular de CDPKs no ha sido muy estudiado. Existe sólo un trabajo en el que se demuestra que OsCPK2, una isoforma de CDPK de arroz con localización en membrana, se miristoila y palmitoila (Martin y Busconi, 2000).

Aparentemente el agregado de ácidos grasos es uno de los mecanismos más frecuentes pero no el único involucrado en la localización subcelular de CDPKs. AtCPK5 y 6 carecen de secuencias consenso de miristoilación y palmitoilación pero están parcialmente asociadas a la membrana plasmática (Lu y col., 2001; Cheng y col., 2002) sugiriendo la existencia de glicosilaciones u otras modificaciones.

Las CDPKs forman la mayor subfamilia bien definida de quinasas de proteínas en plantas (las Quinasas Semejantes a Receptores son más numerosas pero son también más diversas en su estructura y secuencia). No está claro porqué hay tantas isoformas de CDPKs en una misma especie, pero esta abundancia podría proveer tanto especificidad como flexibilidad en la respuesta a las fluctuaciones del Ca^{2+} originadas por distintos estímulos. Como ejemplo de esto se puede decir que diferentes isoformas de CDPKs en *A. thaliana* son expresadas de manera específica según el tipo celular y el estado de desarrollo (Hong y col., 1996), mientras que en soja se han registrado diferentes isoformas de CDPKs que difieren en la sensibilidad al Ca^{2+} y en la especificidad de sustratos peptídicos (Lee y col., 1995).

Los flujos de Ca^{2+} intervienen en el control de gran cantidad de procesos de crecimiento y desarrollo. Muchos de estos procesos involucran la actividad de CDPKs (Evans y col., 2001; Hepler y col., 2001). Entre los procesos que involucran la actividad de estas enzimas pueden destacarse la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico (Estruch y col., 1994; Moutinho y col., 1998), la nodulación (Weaver y Roberts, 1992; Zhang y Chollet, 1997), la embriogénesis, el desarrollo de la semilla y la germinación (Anil y col., 2000).

Durante la señalización hormonal también se producen importantes cambios en las concentraciones de calcio citoplasmáticas, $[\text{Ca}^{+2}]_{\text{cit}}$ (Bush, 1995). En plantas

de arroz, se ha observado un aumento en la actividad CDPK en respuesta a giberelinas (Abo-el-Saad y Wu, 1995) y a brasinoesteroides (Yang y Komatsu, 2001) y en hojas de papa se ha observado una inhibición de la actividad CDPK en respuesta a ácido jasmónico (Ulloa y col., 2002). Asimismo, se ha observado regulación de CDPKs a nivel transcripcional en respuesta a hormonas. Yoon y col. (1999) han demostrado que la expresión de *NtCDPK1* en hojas de tabaco varía en respuesta a ABA, ácido giberélico (GA) y citoquininas. Asimismo, el ácido indolacético estimula la expresión de genes específicos de CDPK en plantas de poroto (Botella y col., 1996) y en plantas de alfalfa (Davletova y col., 2001).

Diversos experimentos sugieren también que, en las células oclusivas del estoma, los aumentos del influjo de Ca^{2+} podrían estimular actividades CDPK. Por un lado, se ha visto que los aumentos de Ca^{2+} inducidos por ácido abscísico (ABA) pueden activar una CDPK capaz de fosforilar canales de potasio cuya actividad es esencial durante el cierre de los estomas (Li y col., 1998; Berkowitz y col., 2000). Por otro lado se cree que las CDPKs podrían estar involucradas en la regulación de la incorporación de aniones a la vacuola durante la apertura de los estomas inducida por hormonas y otros estímulos (Pei y col., 1996).

Distintos tipos de estreses abióticos, como el frío, el daño mecánico, la sequía y la salinidad, producen fluctuaciones en las $[\text{Ca}^{+2}]_{\text{cit}}$ (Bush, 1995; Trewavas, 1999; Knight y Knight, 2001). Existen diferentes líneas de investigación que evidencian la importancia de las CDPKs en el control de este tipo de procesos.

En distintas especies vegetales se han observado aumentos en la actividad CDPK (Martín y Busconi, 2001) y en la activación transcripcional de estas quinasas en respuesta a diversos tipos de estreses abióticos (Urao y col., 1994; Monroy y Dhindsa, 1995; Botella y col., 1996, Yoon y col., 1999, Patharkar y Cushman, 2000; Chico y col., 2002). Utilizando experimentos de expresión transitoria en protoplastos, se ha demostrado que isoformas específicas de CDPK participan en la inducción de procesos de señalización en respuesta al estrés (Sheen, 1996). Saijo y col. (2000) mostraron que la sobreexpresión de *OsCDPK7* (la isoforma 7 de arroz) confiere a las plantas transgénicas resistencia al frío, la salinidad y la sequía. Estos resultados, tan interesantes, confirman el papel fundamental de estas enzimas en la resistencia al estrés abiótico.

Asimismo, gran cantidad de estudios han implicado a las CDPKs en mecanismos de respuesta a patógenos. En estos procesos de defensa los aumentos de la $[\text{Ca}^{+2}]_{\text{cit}}$ ocurren en forma temprana y son esenciales para desencadenar las cascadas de señalización (Xu y Heath, 1998; Rudd y Franklin-Tong, 2001; Romeis y col., 2001; Chico y col., 2002).

Está claro que las CDPKs juegan un papel fundamental en el control de las respuestas metabólicas. La fosforilación por CDPKs modula la actividad de enzimas centrales del metabolismo del carbono y del nitrógeno, como son la sacarosa sintetasa (SuSy) (Huber y col., 1996), la sacarosa-fosfato sintetasa (SPS), (Huber y Huber, 1996) y la nitrato reductasa (NR) (Bachmann y col., 1996; Kaiser y Huber, 2001). Sin embargo, es muy poco lo que se sabe con respecto a la identidad de las isoformas involucradas y a los mecanismos de activación de las mismas *in vivo*. Sólo se ha informado que la sacarosa induce aumentos en la $[Ca^{+2}]_{cit}$ (Furuichi y col., 2001) y estimula la expresión y la actividad de una CDPK asociada a membrana en hojas de tabaco (Iwata y col., 1998). Queda muchísimo por estudiar con respecto al papel de estas enzimas como reguladores del metabolismo.

A pesar que las CDPKs son componentes centrales de los procesos de señalización y están implicadas en un gran número de procesos fisiológicos, muy poco es lo que se conoce con respecto al papel específico de cada una de las distintas isoformas.

Una lista cada vez mayor de sustratos conocidos y potenciales apoya la idea que las CDPKs son quinasas multifuncionales que están involucradas en la regulación de diversos aspectos de las funciones celulares.

Se detallan algunos a continuación:

- Metabolismo del carbono, nitrógeno y sulfuro: Sacarosa sintetasa, Sacarosa-fosfato sintetasa, Piruvato quinasa, Fosfoenolpiruvato carboxilasa en nódulos fijadores de nitrógeno, Nitrato reductasa.
- Metabolismo secundario y respuestas de defensa: Fenilalanina amonio liasa, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa.
- Síntesis de etileno: 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato (ACC) sintetasa.
- Metabolismo de fosfolípidos: activador de la Fosfatidilinositol 4-quinasa.
- Transporte de iones y agua: Bomba de protones de la membrana plasmática, Bomba de Ca^{2+} del retículo endoplásmico, Acuaporinas.
- Regulación del citoesqueleto: Factor despolimerizante de actina.
- Regulación del proteosoma: Factor regulatorio del proteosoma 26S.
- Regulación de la fertilización: ARNasas autoincompatibles.
- Quinasas de proteínas: Quinasas relacionadas a CDPK (CRKs), autofosforilación de CDPK (importante para unirse a proteínas como 14-3-3).

Criterios para considerar una proteína como un sustrato potencial de CDPK:

- $K_m \leq 50 \mu\text{M}$.
- Estequiometría de fosforilación que se aproxime a valores unitarios (1, 2, etc, para demostrar que los sitios de fosforilación pueden ser completamente fosforilados por la quinasa).
- Localización en una región de la célula que sea accesible para la CDPK.
- Actividad modificada como resultado de la fosforilación.

La fosforilación debería afectar la actividad del sustrato directamente (por ejemplo nodulina-26 y Fenilalanina Amonio Liasa), o indirectamente afectando su sensibilidad a inhibidores (por ejemplo Serina Acetiltransferasa), la habilidad de unir un inhibidor (por ejemplo Nitrato Reductasa), o de incrementar la susceptibilidad de la proteína a la proteólisis (por ejemplo Piruvato Quinasa o Sacarosa Sintetasa).

En estudios anteriores sobre la especificidad de sustratos de CDPKs se reconocieron dos motivos simples de fosforilación, Simple 1 y 2 (Cuadro 1). En análisis más profundos utilizando sustratos peptídicos se encontraron cuatro motivos diferentes, motivos 1–4; con especificidad de sustrato específica por fuera de los motivos clásicos.

Motivo	Secuencia
Simple 1	Básico ₋₃ -X ₋₂ -X ₋₁ -[ST] ₀
Simple 2	S ₀ -X ₊₁ -Básico ₊₂
Motivo 1 mínimo	Φ_{-5} -X ₋₄ -Básico ₋₃ -X ₋₂ -X ₋₁ -S ₀ -X ₊₁ -X ₊₂ -X ₊₃ - Φ_{+4}
Motivo 1 óptimo	Básico ₋₆ - Φ_{-5} -X ₋₄ -Básico ₋₃ -X ₋₂ -X ₋₁ -S ₀ -X ₊₁ -X ₊₂ -X ₊₃ - Φ_{+4} -Básico ₊₅
Motivo 2	Básico ₋₉ -Básico ₋₈ -X ₋₇ -Básico ₋₆ - Φ_{-5} -X ₋₄ -X ₋₃ -X ₋₂ -X ₋₁ -[ST] ₀ -X ₊₁ -Básico ₊₂
Motivo 3	Φ_{-1} -[ST] ₀ - Φ_{+1} -X ₊₂ -Básico ₊₃ -Básico ₊₄
Motivo 4	[AL] ₋₅ -X ₋₄ -R ₋₃ -X ₋₂ -X ₋₁ -S ₀ -X ₊₁ -R ₊₂ -Z ₊₃ -R ₊₄

Cuadro 1 - Los subíndices denotan la posición de los residuos en relación al sitio de fosforilación que ocupa la posición 0. Cada residuo entre corchetes puede encontrarse en esa posición. Básico: R o K; X: cualquier residuo; Z: cualquier residuo excepto R; Φ : residuo hidrofóbico.

El motivo Simple 1 está contenido en el motivo 1 y 4, y el motivo Simple 2 está contenido en los motivos 2, 3 y 4. La observación que determinadas CDPKs pueden reconocer diferentes motivos indica que los sustratos podrían interactuar con el sitio activo de la CDPK de diferentes maneras (Harper y col. 2004; Sebastia y col. 2004). Estos motivos de fosforilación están siendo utilizados para buscar en proteomas de plantas y predecir sustratos potenciales de CDPKs.

El proceso de tuberización

4 – La tuberización

La tuberización es un proceso de desarrollo único para algunas especies de *Solanum*, las cuales bajo condiciones favorables desarrollan órganos de propagación especializados o tubérculos. Ellos poseen una doble función en la planta, como un órgano de reserva y como un sistema de propagación vegetativa.

Los tubérculos acumulan grandes cantidades de almidón, son bajos en grasas, y tienen un contenido de proteínas tan alto como los cereales, con la ventaja de poseer una composición de aminoácidos esenciales más equilibrada. Una papa de tamaño medio provee cerca de la mitad de los requerimientos diarios de vitamina C para un adulto. Los tubérculos son crecidos y consumidos en más países que cualquier otro cultivo, y en la economía mundial son el cuarto cultivo más importante luego de los cereales maíz, arroz y trigo. Es utilizada en gran escala dentro de la industria alimenticia o en procesos para obtener almidón y alcohol, con una producción anual que alcanza las 300 millones de toneladas.

Los tubérculos se forman en la región subapical de tallos subterráneos o estolones que se desarrollan en la base del tallo principal de la planta. Bajo condiciones no inductoras los estolones crecen de manera horizontal, y si son expuestos a suficiente luz se vuelven verdes y emergen del suelo para formar un nuevo tallo. Durante este proceso el estolón adquiere todas las características del tallo principal, desarrollando raíces y nuevas hojas, y eventualmente hasta floreciendo. Bajo condiciones inductoras como bajas temperaturas o días cortos la elongación del estolón cesa y la porción apical comienza a engrosarse para formar el tubérculo. Este engrosamiento está correlacionado con una expansión y división radial de las células localizadas en la región subapical del estolón. Las divisiones celulares subsecuentes y la expansión de las células localizadas en la región perimedular contribuyen al ensanchamiento del tubérculo (Xu y col. 1998). El mecanismo de descarga de sacarosa cambia de una forma apoplástica a simplástica, y esto es acompañado por una disminución en la actividad de la Invertasa de pared celular y un incremento drástico de la actividad de la Sacarosa Sintetasa y Fructoquinasa (Appeldoorn y col. 2002). Durante el rápido crecimiento, los tubérculos acumulan grandes cantidades de compuestos de reserva, principalmente en la forma de almidón y proteínas (por ej. Patatina e Inhibidores de

proteinasas), lo cual sirve como una fuente de energía para la futura planta (Prat y col. 1990).

4.1 - Control de la tuberización por la duración del día

Los días cortos (8 horas de luz) inducen la tuberización en todas las variedades de papa, sin embargo hay variaciones considerables en el grado con el cual esta señal ambiental es requerida para la inducción (Snyder y Ewing, 1989). Los cultivos de papa modernos fueron sujetos a selección iterativa y la formación de tubérculos es relativamente independiente de la duración del día. Sin embargo, las especies antiguas de papa como *S. tuberosum ssp. Andigena* o *S. demissum* son estrictamente dependientes de los días cortos (Ewing y Struik, 1992; Kumar y Wareing, 1974). Estas especies tuberizan sólo en días cortos y no producen tubérculos cuando son cultivadas bajo condiciones de días largos (16 horas de luz) o en días cortos suplementados con un pulso de luz en el período de oscuridad. Este efecto inhibitorio del pulso de luz de 15 minutos en el medio de la noche demuestra que es el total del largo del período nocturno, más que la duración del período de luz, lo que induce la formación de tubérculos en estas plantas.

4.1.1 - La duración del día es percibido en las hojas

La evidencia aportada por estudios realizados con injertos en plantas de andígena demostró que la percepción del fotoperíodo ocurre fundamentalmente en hojas (Chapman, 1958; Gregory, 1956) llevando a formular la siguiente hipótesis. Las condiciones inductoras son sensadas en la hoja y no en los estolones, y en respuesta al fotoperíodo, las hojas producen un estímulo de tuberización que es transmitido a través de la unión en el injerto hacia la porción no inducida donde induce la tuberización.

La inducción de la tuberización está asociada con múltiples cambios morfológicos en la planta (Ewing y Struik, 1992) (las hojas se vuelven más alargadas, finas, pálidas y adquieren un ángulo plano con el tallo; el ensanchamiento axilar es suprimido, los brotes de flores abortan más frecuentemente y la senescencia es acelerada). Estas alteraciones llevó a pensar que el estímulo de la tuberización era de naturaleza hormonal. Muchas hormonas como giberelinas (Railton y Wareing, 1973; Xu y col., 1998), citoquininas (Hussey y Stacey, 1984; Palmer y Smith, 1970), ácido jasmónico y ácido tuberónico (Koda y col., 1988; van de Berg y Ewing, 1991) o ácido abscísico (Menzel, 1980; Xu y col., 1998) han sido encontradas participando en el proceso de tuberización, y cambios en los niveles endógenos de estas hormonas podría estar relacionado con el inicio de la misma.

Sin embargo los efectos de muchas de estas hormonas son supuestamente ejercidos directamente a nivel de los estolones, y estos reguladores del crecimiento por lo tanto participan en la transición de la tuberización pero no están involucrados en la producción del estímulo inductor derivado de las hojas.

4.1.2 - Fitocromos

En plantas de papa se caracterizaron dos genes para fitocromos (PHYA y PHYB). De ellos, sólo PHYB se acumula establemente en hojas verdes y por lo tanto pareciera estar involucrado en sensar la duración del día. Al transformar plantas de andígena con una construcción antisentido de este gen se encontró que PHYB juega un rol esencial en la percepción de la duración del día y en la regulación de la vía de señalización para días cortos en la tuberización. Las plantas con expresión disminuida de PHYB son casi insensibles a la duración del día y tuberizan tempranamente tanto en días cortos como largos. Esto coincide con la producción constitutiva del estímulo tuberizante en las hojas y con la idea de que PHYB reprime la síntesis de este estímulo bajo condiciones no inductoras (Figura 6).

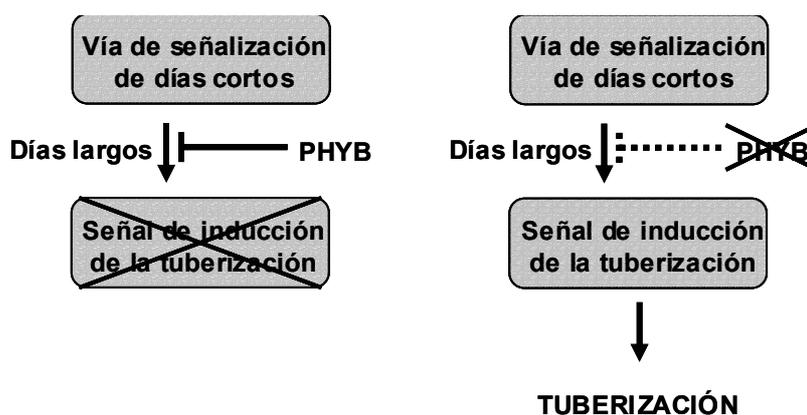


Figura 6 – Esquema de la participación de PHYB en la tuberización durante días largos.

Por su parte, en ensayos realizados con plantas con expresión disminuida de PHYA, se encontró que este fotorreceptor tiene un rol en la puesta a punto del ritmo circadiano interno (Yanovsky y col., 2000).

4.2 - Altos niveles de nitrógeno inhiben la tuberización

Experimentos desarrollados por Krauss y col. (1985) demostraron que la tuberización podía ser manipulada alterando la cantidad de nitrógeno (ya sea como amonio o nitratos) aplicada a la planta. Mediante cultivo hidropónico ellos encontraron que una aplicación continua de nitrógeno (entre 1 y 3 mM) inhibía completamente o retrasaba severamente la tuberización en condiciones inductoras.

Esto podía revertirse pasando las plantas a medio sin nitrógeno durante 6 días. Sin embargo, el agregado de cantidades excesivas de nitrógeno en el medio de cultivo también frenaba la tuberización en plantas que ya habían comenzado a tuberizar. Por su parte la aplicación de nitrógeno a las hojas no prevenía la tuberización y la reducción de nitrógeno en condiciones no inductoras como días largos o altas temperaturas no conducía a la tuberización de estas plantas, indicando que el nitrógeno no está probablemente involucrado en la inducción de la tuberización pero es capaz de reprimir la formación del tubérculo una vez que la inducción comenzó.

No se conoce aún cómo el nitrógeno produce una inhibición de la tuberización, pero se plantean dos hipótesis:

- Disminuyendo los niveles de GAs e incrementando los de ABA.
- Modificando la relación Carbohidratos-Nitrógeno (el nitrógeno promueve el crecimiento de tallos y raíces que utilizarán muchos carbohidratos, reduciendo la cantidad disponible para la formación de tubérculos).

4.3 - Altas temperaturas inhiben la tuberización

Bajas temperaturas, de menos de 30° C durante el día y menos de 20° C durante la noche favorecen la formación de tubérculos. Las altas temperaturas inhiben la tuberización tanto en fotoperíodos largos como en cortos, sin embargo el efecto térmico es mucho más fuerte en días largos. Las altas temperaturas poseen un efecto negativo ya que afectan la partición de fotoasimilatos, disminuyendo la translocación de los mismos a la parte subterránea de las plantas, un efecto similar al observado en fotoperíodos largos.

Hay algunas evidencias en que el efecto inhibitorio de las altas temperaturas es mediado a través de un aumento en los niveles de GAs. El tratamiento de plantas con Cloruro de 2-cloroetil trimetilamonio (CCC), un inhibidor de la biosíntesis de GAs, permite superar la inhibición de la tuberización causada por altas temperaturas (Jackson S., 1999).

4.4 - Las giberelinas retrasan la tuberización

La tuberización es retrasada por el agregado de GAs (Simko, 1994; Xu y col., 1998), mientras que la aplicación de inhibidores de la biosíntesis de GAs como tetcyclasis, cloruro de clorocolina, paclobutrazol o ancimidol favorece la tuberización tanto en entrenudos (Abdala y col., 1995; Harvey y col., 1991; Menzel, 1980, Simko, 1994) como en plantas de invernadero (Bandara y Tanino, 1995; Jackson y col., 1996). Muchas evidencias indican una la función inhibitoria de las GAs en la tuberización. En primer lugar, la iniciación de la tuberización se correlaciona con una

aguda disminución de GA₁ endógena en el estolón (Xu y col., 1998). En segundo lugar, la modificación de niveles endógenos de GAs por sobreexpresión o inhibición antisentido de la GA 20-oxidasa resulta en un retraso o en una tuberización más temprana en días cortos, mostrando una correlación entre los niveles de GAs y el inicio de la tuberización (Carrera y col., 2000). En tercer lugar, la mutante de andigena enana ga1, aparentemente bloqueada en la 13-hidroxilación de la biosíntesis de GAs, puede desarrollar tubérculos bajo días largos, aunque requiere de varios meses bajo estas condiciones no inductoras (van den Berg y col., 1995). A su vez la transferencia a días cortos de estas plantas enanas induce rápidamente la tuberización (3 a 4 días), indicando que aunque el requerimiento de días cortos es menos severo que en las plantas salvajes, la tuberización de estas mutantes está aún bajo el control de la duración del día.

Esto indica dos vías de señalización independientes en la tuberización: una vía de días cortos y una vía dependiente de GAs, determinándose el inicio de la tuberización por el balance entre los efectos inductores e inhibitorios de estas dos vías.

Las enzimas GA 20-oxidasa y GA 3-hidroxilasa catalizan los dos últimos pasos en la biosíntesis de GA, y la GA 2-oxidasa cataliza la degradación de las GAs bioactivas en catabolitos inactivos (Hedden y Philips, 2000). Estas enzimas son pasos regulatorios claves en la biosíntesis de GAs y su homeostasis, por lo tanto están sujetas a controles transcripcionales por el producto final GA1 (Hedden, 2001), y son reguladas en respuesta a la duración del día o por fitocromos (Kamiya y García-Martínez, 1999).

Un modelo de transporte diferencial postula que GA₂₀ es rápidamente transportada a través de la planta, mientras que GA₁ permanece en la proximidad de las células donde es producida, ejerciendo su acción principalmente en estas células. Esto explicaría el fenotipo de tuberización temprana en líneas que sobreexpresan GA 3-oxidasa, donde una conversión aumentada de GA₂₀ a GA₁ en estas plantas llevaría a la reducción de la concentración disponible de GA₂₀ disponible para ser transportada a los estolones (Rodríguez-Falcón y col., 2006).

4.5 - Otras señales hormonales

4.5.1 - Acido Abscísico

Un posible rol del Acido Abscísico (ABA) en el proceso de tuberización, fue demostrado por el alto número de tubérculos, una tuberización temprana y tubérculos sésiles luego de la aplicación de ABA (Menzel, 1980). También puede

estimular la formación de tubérculos aún en presencia de GAs, contrarrestando el efecto inhibitorio de esta hormona (Xu y col., 1998). Sin embargo, la tuberización no está asociada con un incremento de los niveles endógenos de ABA (Krauss y Marschner, 1982; Xu y col., 1998), así como líneas deficientes en ABA (mutante *droopy*) tuberizan normalmente (Quarrie, 1982) indicando que la síntesis de ABA no es requerido para la inducción. Por lo tanto se concluyó que el efecto es más debido a su antagonismo con el efecto dado por las GAs (Xu y col., 1998).

4.5.2 - Acido Jasmónico

El glucósido del 12-OH ácido jasmónico (JA), el ácido tuberónico (TA), fue aislado de tallos de plantas de papa inducidas a tuberizar (Koda y col., 1988). Tanto JA como TA estimulan la formación de tubérculos *in vitro* cuando son adicionados al medio (Takahashi y col, 1994; van de Berg y Ewing, 1991), y niveles aumentados de JA fueron detectados en estolones al inicio de la tuberización. Sin embargo, al aplicar JA en hojas de plantas de papa andigena sin inducir no producen ninguna señal del comienzo de la tuberización (Jackson y Willmitzer, 1994). Por su parte se encontró que la síntesis del TA no está restringido a especies tuberizantes, sugiriendo que podrían estar involucradas en otros procesos de desarrollo. El JA fue encontrado en producir un cambio en la orientación cortical de los microtúbulos similar al observado en la respuesta a la inhibición de la síntesis de GAs (Matsuki y col., 1992), por lo tanto parece que el JA contribuyen más a inducir la expansión radial de células durante el inicio de la tuberización.

4.5.3 - Citoquininas

Las citoquininas (CK) han sido ampliamente consideradas como participantes en la tuberización. Son utilizadas para la inducción *in vitro* de la misma (Donnelly y col., 2003; Hussey y Stacey, 1984) y en promover la tuberización cuando son aplicadas directamente a estolones cultivados *in vitro* (Estrada y col., 1986; Palmer y Smith, 1970). A pesar que se encontraron niveles endógenos de CK aumentados en las puntas de estolones durante la inducción (Mauk y Langille, 1978) y en etapas tardías del crecimiento del tubérculo (Obata-Sasamoto y Suzuki, 1979), los efectos promotores de estas hormonas podían ser sólo observadas en presencia de alta sacarosa (más de 4%) (Palmer y Smith, 1970). Estas observaciones sugieren que las CK podrían actuar en el control de la elongación y el crecimiento, pero no en la señalización de la transición a tubérculo. Las citoquininas pueden activar la división celular estimulando la expresión de la Ciclina D (Riou-Khamlichi y col., 1999) y por lo tanto podría estar involucrada en la proliferación celular durante las etapas

tempranas del crecimiento del tubérculo. Además se encontró que controlaban la expresión de genes implicados en la asimilación de compuestos, como invertasas, la sacarosa sintetasa y genes de transporte de hexosa (Roitsch y Ehne, 2000), por lo tanto señalando un rol de niveles de CK aumentados en la adquisición de la identidad de este órgano de reserva durante la fase de almacenaje en el crecimiento del tubérculo.

4.6 - Expresión génica durante el desarrollo del tubérculo

La mayoría de los estudios de expresión han sido llevado a cabo en las últimas etapas de crecimiento del tubérculo, donde ocurre la acumulación de almidón y la síntesis de proteínas de reserva. En estos estudios se encontró que eran abundantes proteínas como lipoxigenasa e inhibidores de proteinasas (Inhibidor de proteinasa I, II y del tipo Kunitz), llevando al interrogante si estos inhibidores podrían funcionar como proteínas de reserva además de proveer protección contra ataques de plagas. Por otro lado el almidón es el constituyente principal de los tubérculos, representando un 80% de la materia seca. Por lo tanto los genes involucrados en la síntesis y degradación de almidón son abundantes durante las últimas etapas del crecimiento del tubérculo.

En estudios más recientes llevados a cabo en etapas tempranas del desarrollo del tubérculo se encontró que uno de los genes que son regulados tempranamente es la GA 2-oxidasa, incluso antes de un ensanchamiento visible del estolón, indicando que la disminución de GA precede otros cambios transcripcionales durante la transición de estolón a tubérculo. También se encontraron genes involucrados en la síntesis de almidón.

La expresión de genes que participan en el clivaje de sacarosa cambió durante estas etapas tempranas, correlacionándose con el cambio en la descarga de sacarosa de apoplástica a simplástica (Appeldoorn y col., 2002; Viola y col., 2001). La sacarosa sintetasa (SUSY) y la fructoquinasa aumentaron drásticamente, mientras que transcritos para la invertasa ácida soluble disminuyeron.

Además se detectaron cambios transitorios en la expresión génica de numerosos genes (Kloosterman y col., 2005), lo cual ocurrió durante el ensanchamiento del estolón y la iniciación del tubérculo, sugiriendo una función de estos genes en la división y expansión celular (Xu y col., 1998). Utilizando luciferasa como sistema reportero el análisis de la expresión génica mostró que la división celular, la acumulación de proteínas y la síntesis de almidón no ocurre en un orden fijo durante el desarrollo del tubérculo. (Verhees y col., 2002). La activación de estos distintos promotores osciló desde 4 días antes a 10 días después del comienzo del

ensanchamiento del estolón. Esto sugiere que las señales responsables de la activación en la acumulación de almidón y las proteínas de reserva son diferentes de aquellas que inducen el ensanchamiento, y que por lo tanto hay dos vías de señalización independientes en el control de estos genes durante el desarrollo del tubérculo.

Si bien no hay claras evidencias de los mecanismos moleculares involucrados en el control transcripcional del tubérculo hasta la fecha, no hay dudas que la sacarosa es una señal metabólica importante que coordina la expresión génica durante el inicio y el posterior crecimiento del tubérculo. En estudios de tuberización *in vitro* se comprobó su dependencia de sacarosa (Simko, 1994, Xu y col., 1998). El cambio en la descarga de sacarosa de apoplástica a simplástica durante la tuberización está correlacionado con una disminución en hexosa y el concomitante aumento de los niveles de sacarosa en las células subapicales del estolón. Este aumento celular de sacarosa pareciera mediar aumentos de la expresión génica de proteínas involucradas en la síntesis de almidón y en proteínas de reserva en los estolones tuberizantes. Por su parte, además de las citoquininas, la alta concentración de sacarosa fue también correlacionada con un aumento en la expresión de transcriptos de la ciclina tipo-D del ciclo celular (Riou-Khamlichi y col., 1999), sugiriendo que la señalización por sacarosa podría también participar en la modulación de la división celular y el ensanchamiento del estolón durante la diferenciación del tubérculo. Todas estas observaciones indican un rol central de la sacarosa en promover la diferenciación celular, con interacciones entre las vías de señalización del azúcar, giberelina y citoquinina.

Un asunto aún pendiente es la identificación de genes que confieran identidad al tubérculo. Al contrario con la floración, la formación del tubérculo no involucra una organogénesis. Los mismos están comprendidos por la acumulación de células parenquimáticas, componentes vasculares y la peridermis, pero no hay diferenciación en órganos especializados. Por lo tanto, los genes homeóticos de la floración involucrados en la formación de todo el órgano no han sido identificados en los tubérculos. Esto junto a la observación que las proteínas de almacenamiento del tubérculo pueden acumularse en órganos aéreos, nos lleva a pensar que la formación del tubérculo se encuentra bajo un control menos estricto que la floración.

Resultados previos

5 - CDPKs y tuberización

5.1 - Identificación de CDPKs en *Solanum tuberosum*

En nuestro grupo se identificaron los primeros genes de la familia CDPK de *Solanum tuberosum*. A partir de una biblioteca de ADNc de estolones de papa inducidos a tuberizar se aislaron tres clones que presentaban alto grado de identidad entre sí y con CDPKs de otras especies. Uno de estos clones, al que se denominó *StCDPK1*, codificaba una secuencia completa. Los otros dos, *StCDPK2* y *StCDPK3*, eran clones parciales y se extendían desde la secuencia correspondiente al dominio catalítico hasta el extremo 3' no codificante (Raíces *et al.*, 2001; Raíces *et al.*, 2003a). Actualmente se completó la secuencia codificante del clon *StCDPK2* y es tema de estudio de otro integrante de nuestro laboratorio. Los tres genes identificados presentaron todos los dominios conservados característicos de la familia CDPK.

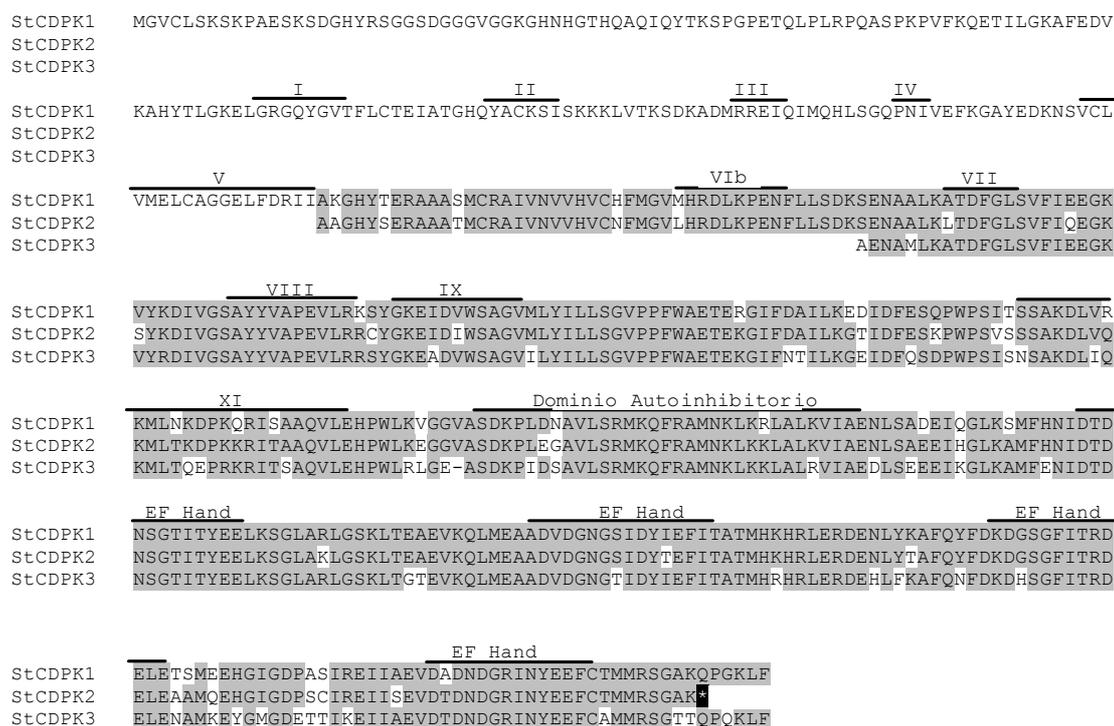


Figura 7 - Comparación de las secuencias de las CDPKs aisladas de *Solanum tuberosum*

Las secuencias aminoacídicas de StCDPK1, StCDPK2 y StCDPK3 fueron alineadas. Se destacan los diferentes subdominios del dominio catalítico característico de quinasas de serina y treonina, el dominio autoinhibitorio y las secuencias de unión al calcio (*EF hands*).

(*) indica el codón de terminación de StCDPK2 localizado 15 nt río arriba de la señal conservada para la mayoría de las CDPKs.

5.2 - Caracterización de StCDPK1

El producto del gen *StCDPK1* es una CDPK activa de 59 kDa de peso molecular. *StCDPK1* es capaz de fosforilar el péptido Syntide-2 en forma calcio-dependiente y su actividad es bloqueada por el inhibidor de quinasas estaurosporina y también por antagonistas de calmodulina como la clorpromazina. La enzima expresada en bacterias fue reconocida por anticuerpos policlonales dirigidos contra el dominio regulatorio de la CDPK α de soja, confirmando que *StCDPK1* pertenece a la familia de las CDPKs (Raices y col., 2001).

Hasta el momento, se han identificado gran número de genes cuya expresión aumenta durante la tuberización, pero pocos parecen estar directamente relacionados con la regulación de este complejo proceso de desarrollo. La identificación de nuevos genes con expresión diferencial durante la formación del tubérculo es fundamental para comprender los mecanismos involucrados en este proceso. El hecho de que *StCDPK1* codifique para una quinasa activa es particularmente interesante. Las quinasas de proteínas son transductores naturales de las señales ambientales y constituyen componentes fundamentales de las cascadas de señalización.

5.3 - Isoformas de CDPK presentes durante la tuberización

Los ensayos de Northern blot mostraron que *StCDPK1* se expresa en forma transitoria durante la tuberización.

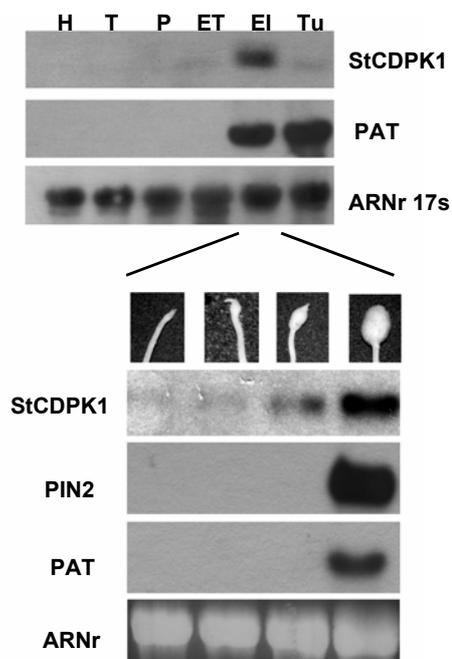


Figura 8 – Expresión de *StCDPK1*.

Se sembró 30 μ g de ARN total obtenido de hojas (H), tallos (T), pecíolos (P), estolones tempranos (ET), estolones inducidos (EI) y tubérculos maduros (Tu). Se utilizaron como sondas la secuencia completa de *StCDPK1*, un fragmento del gen de la patatina (PAT) y un fragmento del inhibidor de proteasas Pin2. La carga de ARN se visualizó con el BrEt y se confirmó con una sonda que reconoce al ARNr 17S.

Su expresión sólo se detectó en estolones inducidos a tuberizar que mostraban un engrosamiento apical visible y estuvo ausente en estolones tempranos y tubérculos maduros. Resultados previos del laboratorio habían mostrado un pico de actividad CDPK en estolones tempranos, anterior a la expresión del gen identificado. Esta diferencia temporal podía deberse a variaciones entre los sistemas de tuberización utilizados en los distintos experimentos o podía sugerir la presencia de diferentes isoformas de CDPK durante la tuberización.

Ensayos de actividad CDPK utilizando extractos de estolones de plantas de invernadero mostraron un pico de actividad en los estadíos más tempranos del desarrollo. Estos resultados fueron similares a los obtenidos con estolones cultivados *in vitro* y demostraron que los diferentes sistemas de tuberización podían ser usados indistintamente. Además, estos datos sugieren que las diferencias temporales entre el pico de actividad CDPK y la expresión de StCDPK1 podían deberse a la presencia de más de una CDPK durante la tuberización.

Aparentemente las actividades CDPK asociadas a estolones tempranos e inducidos no sólo presentan un patrón de expresión diferencial sino que además, poseen diferente especificidad de sustratos y distinta localización subcelular. La actividad temprana estuvo asociada a la fracción soluble mientras que la actividad detectada en estolones inducidos estuvo parcialmente asociada a la fracción particulada con mayor actividad específica (Raíces y col., 2003a).

5.4 - Localización subcelular de StCDPK1

La compartimentalización es un mecanismo fundamental en el control de los eventos de señalización (Mochly-Rosen, 1995). Las CDPKs presentan localizaciones subcelulares diversas. La existencia de diferentes isoformas de CDPK en distintos compartimientos subcelulares podría ser fundamental para regular la respuesta a las distintas señales de calcio.

El análisis de la secuencia aminoacídica de StCDPK1 determinó la presencia de una posible secuencia de miristoilación en su extremo aminoterminal. Mediante ensayos de miristoilación *in vitro* se demostró que esta secuencia era funcional. Cuando StCDPK1 y su versión miristoilada se purificaron utilizando fenilsefarsa ambas proteínas mostraron perfiles de elución diferentes. La enzima miristoilada se pegó más fuertemente a la matriz hidrofóbica y sólo pudo ser eluída con altas concentraciones de urea (Raices y col., 2001). Este comportamiento fue similar al descrito anteriormente cuando se purificó una actividad CDPK de plantas de papa (MacIntosh y col., 1996), sugiriendo que la enzima endógena podría miristoilarse *in vivo*.

El agregado de un ácido mirístico en el extremo aminoterminal no siempre es suficiente para determinar la asociación de una proteína a la bicapa lipídica. Por lo general se requiere de una segunda modificación para estabilizar esta unión. Para muchas proteínas miristoiladas la segunda modificación puede ser una palmitoilación (Thompson y Okuyama, 2000). Esta modificación es reversible y en algunos casos, además de estabilizar la localización en la membrana, regula ciertas interacciones proteína-proteína. StCDPK1 también poseía un posible sitio de palmitoilación, por lo tanto resultó interesante determinar si esta modificación estaba involucrada en la regulación de su localización.

Los experimentos de expresión transitoria en células de cebolla demostraron que la miristoilación y la palmitoilación son necesarias para que StCDPK1 localice en la membrana plasmática (Raíces y col., 2003a). La miristoilación es esencial pero no es suficiente para determinar la localización. Aparentemente la palmitoilación es determinante para la localización subcelular de esta proteína.

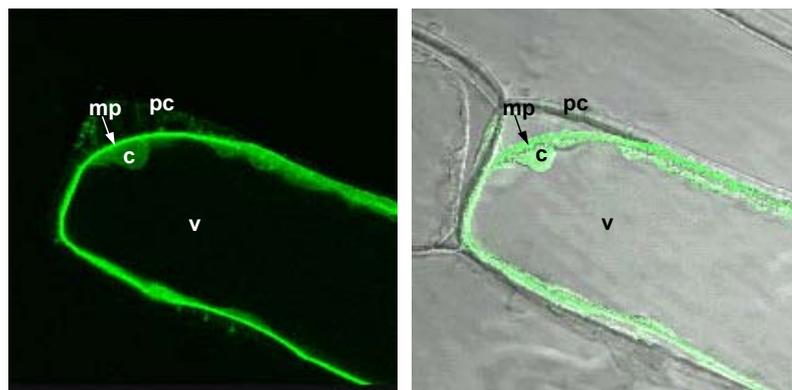


Figura 9 - Detalle de la localización de StCDPK1-GFP en la membrana plasmática
Imagen de fluorescencia (A) y superposición con la imagen de campo claro (B) de una célula transformada StCDPK1-GFP tratada con sorbitol. Se observa la pared celular (pc), la membrana plasmática (mp), el citoplasma (c) y la vacuola (v) de la célula parcialmente plasmolizada.

5.5 - Efecto de reguladores de tuberización sobre la expresión y actividad de CDPKs

Ensayos de Northern blot mostraron que *StCDPK1* se induce en respuesta a sacarosa pero no en respuesta a glucosa ni fructosa. Estos resultados podrían ser muy importantes desde el punto de vista fisiológico. La sacarosa es el azúcar más abundante en los estolones inducidos a tuberizar y se acumula en la región apical (Viola y col., 2001), cerca de la región donde se detectó expresión de *StCDPK1* en los ensayos de hibridación in situ (Raíces y col., 2003b).

En experimentos de tuberización, la sacarosa tuvo el efecto esperado. Los tratamientos con alta concentración de azúcar indujeron eficientemente la

tuberización, aún en ausencia de otros estímulos, y confirmaron datos anteriores (Garner y Blake 1989; Banfalvi y col., 1996).

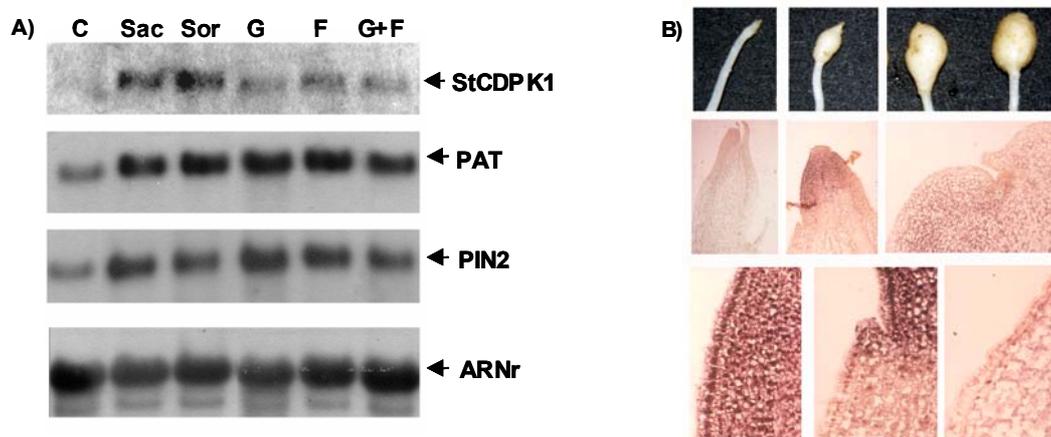


Figura 10 - Expresión en respuesta a azúcares e hibridación in situ de StCDPK1.

A) Ensayo de Northern blot de plantas tratadas por 16 h con 2% sacarosa (C), 8% sacarosa (Sac) o iguales concentraciones mM de sorbitol (Sor) glucosa (G), fructosa (F) una mezcla de ambas hexosas (G + F). Se sembraron 15 µg de ARN total por calle. Las membranas se hibridaron con sondas para StCDPK1, patatina (PAT) o Pin2 marcadas radioactivamente. La carga de ARN se confirmó con una sonda para el ARNr 17S.

B) Localización de los ARNm de StCDPK1 en estolones tuberizantes. Se hibridaron secciones longitudinales semifinas (7 mm) de estolones tempranos y estolones inducidos de plantas de invernadero utilizando ribo-sondas antisentido de StCDPK1 marcadas con digoxigenina.

El efecto inductor de la sacarosa fue bloqueado totalmente en presencia del inhibidor de quinasas estaurosporina, demostrando que actividades quinasas (que posiblemente involucran a CDPKs) son esenciales para la inducción de la tuberización. Resultados anteriores demostraron que antagonistas de calmodulina también son capaces de inhibir la tuberización (Balamani y col., 1986). Estos inhibidores también afectan la actividad CDPK.

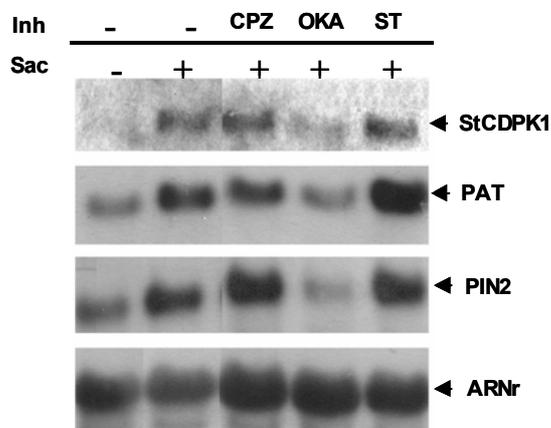


Figura 11 - Efecto de distintos inhibidores sobre la expresión de StCDPK1 inducida por sacarosa

Ensayo de Northern blot de plantas tratadas por 16 h con 2% sacarosa (-), 8% sacarosa (+) u 8% sacarosa y clorpromazina 0,5 mM (CPZ) ácido okadaico 100 nM (OKA) o estaurosporina 1 µM (ST). Se sembraron 15 µg de ARN total por calle. Las membranas se hibridaron con sondas para StCDPK1, patatina (PAT) o Pin2 marcadas radioactivamente. La carga de ARN se confirmó con una sonda para el ARNr 17S.

El estrés osmótico parece ser el componente responsable de la regulación de la expresión de genes relacionados con la tuberización. Cuando se estudió la expresión de *StCDPK1*, el tratamiento con sorbitol tuvo un efecto similar al de la sacarosa.

El ácido abscísico (ABA) es un componente central de las respuestas a estrés osmótico (Robertson y Chandler, 1994). Esta hormona no es esencial para la tuberización pero posee efectos positivos sobre este proceso (Jackson, 1999). Resultados recientes demuestran una fuerte interacción entre las vías de señalización reguladas por hormonas y las vías de señalización inducidas por azúcares (Gazzarrini y McCourt, 2001). Es posible que durante la tuberización tengan lugar interacciones de este tipo.

El sorbitol, al igual que la sacarosa, fue capaz de estimular la expresión de *StCDPK1* y de otros genes relacionados con la tuberización pero, a diferencia de la sacarosa, no indujo la formación de tubérculos. Posiblemente la sacarosa actúe a diferentes niveles; por un lado, generando estrés osmótico local en la región apical del estolón y por otro, aportando los metabolitos esenciales para la síntesis de sustancias de reserva.

Así, el estrés osmótico podría ser un componente importante pero no suficiente de la señal de la sacarosa. Esta hipótesis está apoyada por datos de Oparka y Wright (1988) que muestran que un elevado potencial osmótico externo produce aumentos del uptake de sacarosa y de la síntesis de almidón en los tubérculos.

El proceso de nodulación

6 – La nodulación

Se estima que aproximadamente un tercio de la comida requerida para sustentar la población mundial actual depende de fertilizantes conteniendo nitrógeno producidos industrialmente. Esto es necesario porque el crecimiento de la mayoría de las plantas está limitado por la disposición de nitrógeno.

Alrededor de 30 a 60 millones de años atrás (Wikström y col. 2001) un grupo de plantas desarrollaron la habilidad de albergar bacterias fijadoras de nitrógeno en una simbiosis caracterizada por la formación de nódulos en los pelos radiculares de plantas infectadas (Soltis y col., 1995). Entre sus descendientes se encuentran las leguminosas, familia que engloba árboles, arbustos y herbáceas repartidos en tres subfamilias, Cesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae.

La capacidad de fijar nitrógeno en simbiosis con *Rhizobium* es una característica casi general de las papilionoideas (93 por ciento de los géneros y 99 por ciento de las especies) que permite la colonización de suelos pobres, la mejora o regeneración de los degradados, y su utilización en prácticas agrícolas, como la rotación de cultivos, la entre siembra o el abonado en verde. Esta característica tiene gran importancia agronómica porque reduce el uso de fertilizantes nitrogenados con el consiguiente ahorro en el consumo de energía y la disminución de la degradación del medio.

Dentro de las bacterias la fijación de nitrógeno está limitada por la disposición de carbono y por la inhibición de la nitrogenasa, enzima responsable de la reducción del nitrógeno, por oxígeno.

Las leguminosas crean órganos especializados (nódulos) donde la bacteria es provista de cantidades reguladas de oxígeno y carbono. La nodulación es una interacción altamente huésped-específica en la cual, con pocas excepciones, cepas específicas de rhizobia infectan un rango limitado de plantas huésped.

Durante el proceso de infección, la bacteria entra a la planta por la epidermis de la raíz e induce la reprogramación del desarrollo de células corticales y la formación del nódulo. El primer evento observable en el proceso de infección es el curvado del pelo radicular debido a una reorientación gradual y constante en la dirección de su crecimiento (Figura 12). La bacteria queda atrapada dentro del pelo radicular curvado, la pared celular de la planta es degradada, la membrana celular se invagina y se inicia una estructura tubular intracelular (el canal de infección) por la

cual la bacteria entra a la célula del pelo radicular y eventualmente se ramifica a la corteza de la raíz. Antes que el tubo de infección alcance la base de la célula del pelo radicular, las células corticales son inducidas a de-diferenciarse activando su ciclo celular y dividiéndose para formar el primordio del nódulo. Cuando el tubo de infección alcanza las células del primordio en desarrollo, la bacteria es liberada dentro de las células vía endocitosis. Dentro de la célula vegetal las bacterias son atrapadas en estructuras similares a vacuolas (simbiosomas) donde se diferencian en bacteroides. Es aquí donde la bacteria transforma el N_2 a NH_3 . El nódulo es un verdadero órgano en el cual se desarrolla una especialización celular.

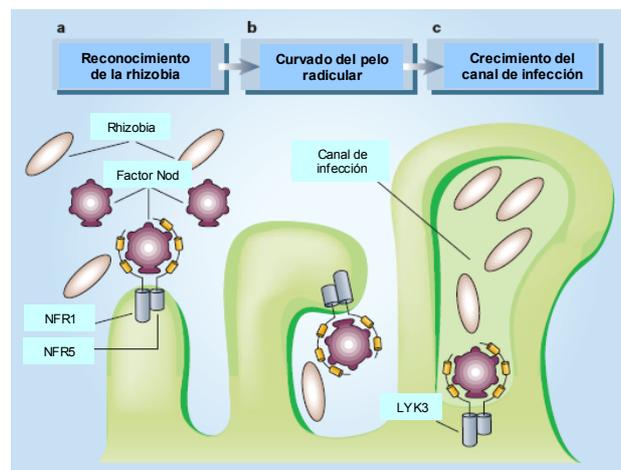


Figura 12 – Dos receptores permiten a la planta sentir los factores Nod producidos por la rizobia “correcta” y luego permite el curvado del pelo radicular para que ésta entre. Los receptores de *L. japonicus* NFR1 y NFR5 actúan en la etapa inicial mientras que LYK3 de *M. truncatula* (una variante de NFR1) parece ser requerido para mantener el crecimiento del canal de infección. Por sobre todo, pareciera que habría un requerimiento continuo de NFR1 y NFR5, o sus contrapartes en otras leguminosas, a través del curvado del pelo radicular y la formación del canal de infección (Parniske y Downie, 2003).

6.1 - Señalización de factores Nod

El primer paso en el diálogo molecular entre la planta y la bacteria es la detección por la rizobia de flavonoides (un compuesto fenólico) y moléculas relacionadas que son secretadas de las raíces. Las diferentes especies de leguminosas liberan distintas señales fenólicas lo cual lleva en parte a la especificidad que es observada en esta interacción simbiótica (Perret y col., 2000). Los flavonoides son reconocidos por proteínas NodD en las rizobias que regulan la expresión de una serie de genes relacionados con la nodulación (nod) (Perret y col., 2000; Fisher y Long, 1992).

Los factores Nod son moléculas esenciales sintetizadas por los productos de estos genes *NOD*. Están formados por una cadena (de 3 a 5 residuos) de N-acetil glucosaminas (quitina) con una sustitución en el extremo no reductor de una cadena

alifática de variada longitud e insaturación y distintas sustituciones en el extremo reductor. Por su naturaleza química, también se conoce a los factores Nod, como lipoquitooligosacáridos o LCO. Se han descrito muchos factores Nod de diferentes especies de rhizobia que difieren en el número de residuos glucosamina, el largo y la saturación de la cadena alifática y la naturaleza de las modificaciones de este esqueleto (Downie, 1998; Denarie y col., 1996). Estas decoraciones del esqueleto determinan la especificidad y su síntesis está determinada por los genes Nod llamados específicos, todos ellos inducidos por el gen *NodD*, sensor del flavonoide adecuado. Las plantas son capaces de percibir factores Nod a concentraciones tan bajas como 10^{-12} M, lo cual indica que la unión debe ser de alta afinidad con su receptor.

Ante la presencia de factores Nod, las plantas responden desviando el proceso normal de desarrollo de los pelos radiculares para abarcar a sus bacterias aliadas. Entre las respuestas observadas, se destacan las variaciones en la concentración de calcio citoplasmático que se consideran responsables de algunos, o todos, los cambios producidos en el metabolismo y la expresión génica.

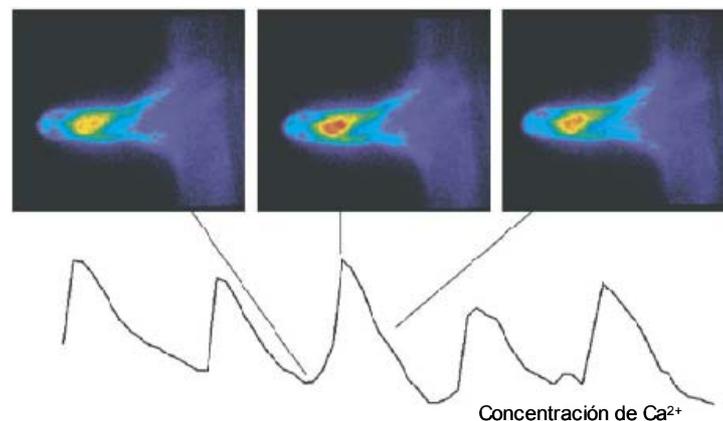


Figura 13 - Una célula de pelo radicular de *M. truncatula* donde se aprecia la oscilación de Ca^{2+} citoplasmático inducido por factores Nod. Esta célula ha sido inyectada con un marcador Oregon Green-Dextran que responde al calcio y luego tratada con 10^{-9} M de factor Nod. El color indica los cambios en el calcio y representa aproximadamente 10 minutos de imagen. Cada panel muestra la célula a diferentes estados de la oscilación del calcio como está indicado. La mayoría de los cambios del calcio ocurren alrededor de la región nuclear, que se ve como la región amarilla. La aparición del color rojo corresponde al incremento de la fluorescencia que es debido al aumento del calcio durante el pico (Oldroyd y Downie, 2006).

Una rápida entrada de Ca^{2+} es inmediatamente seguida por la despolarización de la membrana. Algunos minutos más tarde, se inducen oscilaciones en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático (un fenómeno conocido como Ca^{2+} spiking) (Figura 13).

No está claro si estos aumentos del calcio citoplasmático son producidos por sólo una vía de señalización que involucra a los factores Nod o por múltiples vías que operan en paralelo (Wais y col., 2000; Esseling y col., 2004).

6.2 - Receptores de factores Nod

La sensibilidad y especificidad con la cual las raíces de las leguminosas responden a los factores Nod sugiere que estos son reconocidos por receptores específicos (Amor y col., 2003; Cullimore y Dénarié, 2003; Cullimore y col., 2001; Geurts y Bisseling, 2002).

Dos genes de *Lotus japonicus*, NFR1 y NFR5, que son requeridos para la percepción de los factores Nod, codifican para quinasas de proteínas que contienen dominios LysM (Madsen y col., 2003; Radutoiu y col., 2003). Este dominio LysM ha sido implicado en la unión a polisacáridos, particularmente cadenas de glucosaminas las cuales son similares a la estructura del factor Nod (Bateman y Bycroft, 2000). Lj-NFR5 α es ortólogo a *P. sativum* Ps-SYM10 y *M. truncatula* Mt-NFP. En *M. truncatula* dos receptores quinasas LysM (LYKs), Mt-LYK3 y Mt-LYK4, median la infección mediada por factores Nod (Limpens y col., 2003) y parecen ser ortólogos de Lj-NFR1 y Ps-SYM2 (Figura 14).

6.3 - Componentes de señalización comunes en simbiosis

Tres genes de *M. truncatula*, Mt-DMI1, Mt-DMI2 y Mt-DMI3, son requeridos para la nodulación (Catoira y col., 2000). Mt-DMI1 y sus contrapartes en *L. japonicus* Lj-POLLUX y Lj-CASTOR, codifican para proteínas similares a canales iónicos que podría mediar el flujo temprano de iones observado en los pelos radiculares cuando responden a los factores Nod (Ané y col., 2004; Imaizumi-Anraku y col., 2005). Por su parte Mt-DMI2 y sus ortólogos de arveja (Ps-SYM19), alfalfa (Ms-NORK) y *L. japonicus* (Lj-SYMRK) codifican para quinasas similares a receptores con repeticiones ricas en leucina (LRR) en la región extracelular (Endre y col., 2002; Stracke y col., 2002). Y Mt-DMI3 y su ortólogo Ps-SYM9 codifican para proteínas con gran similitud a quinasas de proteínas dependientes de Ca²⁺ y CaM (CCaMKs) (Levy y col., 2004; Mitra y col., 2004). Mt-DMI1 y Mt-DMI2 actúan río arriba del pico de calcio, mientras Mt-DMI3 se encuentra río abajo de este pico de calcio (Figura 14).

6.4 - Respuesta a factores Nod

Los factores Nod inducen la expresión de muchos genes a través de la activación de factores de transcripción. Dos genes en *M. truncatula*, Mt-NSP1 y Mt-

NSP2, funcionan río abajo de Mt-DMI3 y son esenciales para todas las respuestas transcripcionales inducidas por factores Nod conocidas hasta ahora. Ambos genes codifican factores de transcripción de la familia GRAS, lo cual es consistente con sus roles de reguladores directos de la expresión génica (Kalo y col., 2005; Smit y col., 2005) (Figura 9).

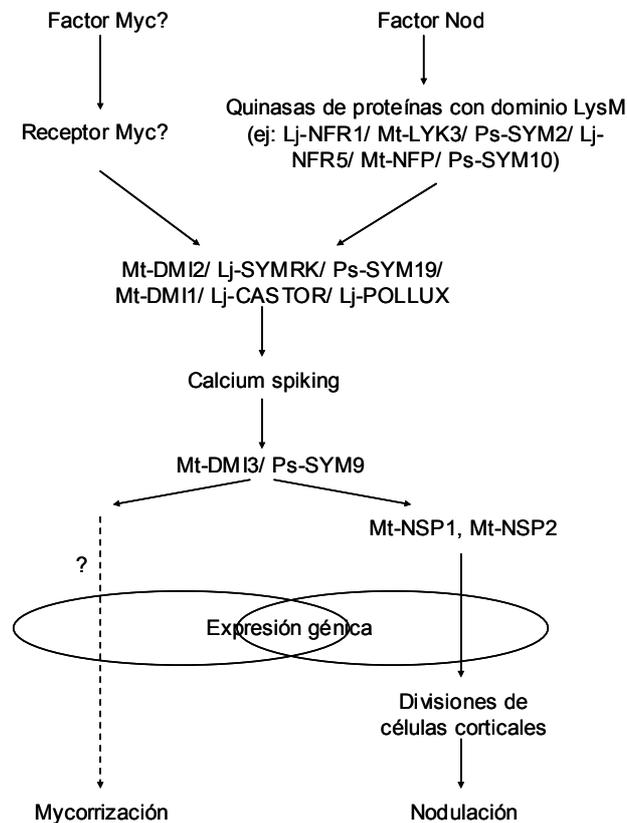


Figura 14 - Interesantemente la simbiosis con hongos micorrizos arbusculares (AM) y la nodulación comparten componentes de señalización en las leguminosas. Una serie de genes son inducidos en las plantas huésped en ambas simbiosis y muchas mutantes leguminosas deficientes en la nodulación son también deficientes en la interacción AM (Albrecht y col., 1999; Hirsch y col., 2001; Kistner y Parniske, 2002). Además investigaciones recientes han mostrado que el mecanismo limitando el número de nódulos también suprimen infecciones secundarias por micorrizas (Meixner y col., 2005). Estas observaciones apoyan la hipótesis que la simbiosis evolucionariamente más nueva podría haber tomado funciones de la simbiosis AM más antigua.

6.5 - Genes regulando el número de nódulos

Las leguminosas regulan el número de nódulos para así balancear el costo de mantener la simbiosis y su necesidad de fijar nitrógeno. Este control es logrado por un mecanismo conocido como autorregulación de la nodulación (AON) en el cual una señal derivada del tallo ejerce el control a larga distancia del número de nódulos. La AON es regulada por una quinasa semejante a receptor que se encontró en soja (Gm-NARK), *L. japonicus* (Lj-HAR1), *M. truncatula* (Mt-SUNN) y arveja (Ps-SYM29) (Krusell y col., 2002; Nishimura y col., 2002; Schnabel y col., 2003;

Schnabel y col., 2005; Searle y col., 2003). Esta quinasa es muy parecida a CLAVATA1 de *Arabidopsis* (Clark y col., 1997) quien controla la proliferación de células madres.

Otro sistema de regulación del número de nódulos involucra a la hormona vegetal etileno. En *M. truncatula* la mutante sickle (skl) tiene 10 veces más nódulos que la planta salvaje (Penmetsa y Cook, 1997). Esta mutante es también insensible a etileno. *Mt-SKL* codifica para un componente de la vía de señalización del etileno (Penmetsa y col., 2003).

6.6 - Otros genes involucrados

En diversos estudios de expresión realizados en nódulos de varias especies de leguminosas se identificaron numerosos genes que eran modulados durante la interacción entre las raíces de varias especies leguminosas y sus correspondientes rizobias. Los genes identificados en estos estudios incluyen no sólo aquellos involucrados en la nodulación propiamente dicha sino también muchos genes nuevos. Por ejemplo, genes que codifican proteínas involucradas en varias rutas metabólicas, como las del metabolismo del nitrógeno y del carbono. (Barnett y col., 2004; Colebatch y col., 2002; Colebatch y col., 2004; Kouchi y col., 2004; El Yahyaoui y col., 2004; Lee y col., 2004; Asamizu y col., 2005), un gran número de genes que están involucrados en la transducción de señales (receptores quinastas, calmodulinas, quinastas y fosfatasas) y genes que codifican para factores de transcripción (factores de transcripción Myb, proteínas zinc-finger). A su vez, genes relacionados con la defensa son también regulados durante el proceso de nodulación, por ejemplo aquellos que codifican enzimas de la vía de biosíntesis de fitoalexinas (fenilalanina amonio liasa [PAL] y la chalcona reductasa), genes de proteínas involucradas en las modificaciones de la pared celular (β -1,3-glucanasa y peroxidasa) y genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR) tales como PR10 y una quitinasa. Notablemente, estos genes relacionados con defensa están inducidos durante la etapa temprana de la nodulación para luego disminuir en los nódulos (Mitra y col., 2004; Kouchi y col., 2004; Colebatch y col., 2002; El Yahyaoui y col., 2004), sugiriendo que las rizobias al invadir suprimen las estrategias de defensa del huésped para poder colonizar exitosamente sus raíces y formar así los nódulos.

6.7 - Citoquininas y nodulación

Además de las señales exógenas, las señales endógenas, particularmente las hormonas vegetales, son importantes para el desarrollo de la simbiosis. La mejor

evidencia involucra el rol de la hormona vegetal etileno (Wood, 2001). Existen otras hormonas vegetales que podrían también tener un rol importante en el proceso del desarrollo de la simbiosis. En particular la inducción de la organogénesis del nódulo en las células corticales de la raíz podría estar mediada por cambios locales en la relación auxina/citoquinina (Penmetsa y col., 2003).

Las citoquininas han sido reconocidas como hormonas vegetales esenciales que están involucradas en diversos procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas. Estos procesos incluyen la división celular, la iniciación del tallo, la diferenciación de la hoja y la raíz, la biogénesis del cloroplasto y la senescencia (Hwang and Sheen, 2001). Las citoquininas son sintetizadas en la punta de la raíz y son transportadas al tallo a través del xilema (Davies, 1995).

Se asume que las citoquininas son esenciales para la división celular en las plantas, presuntamente a través de su influencia en el ciclo celular (Redig y col., 1996; Zhang y col., 1996) donde pueden actuar en la transición G1/S (Francis y Sorrell, 2001). La organogénesis del nódulo involucra la reactivación del ciclo celular en las células corticales de la raíz, incluyendo tanto una división celular activa en las células corticales internas y una activación de la fase S sin división celular en las células corticales externas.

Algunas asociaciones bacterianas inducen divisiones celulares, pero otras toman ventaja de la división celular preexistente o utilizan el desarrollo de una raíz lateral para ingresar al huésped (Caetano-Anolles y Gresshoff, 1991). Ciertos microorganismos asociados con plantas inducen la formación de nuevos meristemas radiculares, desde los cuales se derivan los órganos resultantes de las asociaciones simbióticas (Lohar y col., 2004).

Diversos hallazgos sugieren que las citoquininas desempeñan un rol en la organogénesis nodular: 1) El tratamiento con citoquininas provocó la inducción de ENOD2 en *Sesbania rostrata* (Dehio y deBruijn, 1992) y la inducción de divisiones celulares corticales y de ENOD12 en alfalfa (Bauer y col., 1996); 2) la transformación de cepas de *S. meliloti* deficientes en factores Nod con un gen de la síntesis de citoquininas (gen de secreción de trans-zeatina) le confirió la capacidad (habilidad) de inducir estructuras similares a nódulos en plantas de alfalfa (Cooper y Long, 1994); 3) el marcador gen temprano de nodulación, ENOD40, de *M. sativa* es inducido luego de la aplicación exógena de citoquininas (Fang y Hirsch, 1998; Hirsch y col., 1995); 4) la inducción de la expresión de ENOD40 por rhizobia o por citoquininas es similar espacial y temporalmente en las células progenitoras de la nodulación en trébol blanco (Mathesius y col., 2000); 5) el tratamiento de raíces de alfalfa con factores Nod purificados o con citoquininas mostró un patrón similar en la

división de las células corticales que marca el inicio de la nodulación (Bauer y col., 1996). Se compararon las características de la raíz lateral y del desarrollo de nódulos en leguminosas (Hirsch, 1992; Koltai y col., 2001; Libbenga y Bogers, 1974; Nutman, 1948), y las citoquininas han sido implicadas en la formación de ambos órganos (Hirsch y col., 1995; Schmulling, 2002). Nutman (1948, 1949) reportó que plantas de trébol noduladas tenían menos raíces laterales que las plantas no inoculadas, y propuso un balance fisiológico entre las raíces laterales y los nódulos. Como las citoquininas tienen un efecto opuesto en la formación de raíces laterales y en la nodulación, esto podría representar un mecanismo por el cual se mantiene el balance entre las raíces laterales y los nódulos en leguminosas. Estos dos procesos post-embriónicos importantes de órganos vegetales (la formación de raíces laterales y la nodulación) tienen requerimientos diferentes y hasta opuestos de citoquininas. La respuesta a citoquininas es reprimida en la iniciación de raíces laterales mientras que es inducida para nódulos. De manera similar, la respuesta a citoquininas fue inducida continuamente en la punta de la raíz y en las raíces laterales, mientras que fue reprimida en nódulos maduros. Pareciera por lo tanto que la influencia de las citoquininas en la división celular puede ser estimuladora o inhibitoria. Las plantas lograrían este efecto opuesto utilizando vías de señalización diferentes en la acción de citoquininas, y posiblemente estos efectos son también modulados por otras hormonas vegetales, quizás auxinas (Lohar y col., 2004).

OBJETIVOS GENERALES

La formación de órganos vegetales esta condicionada por estímulos ambientales y hormonales, tal es el caso de la formación del tubérculo en la planta de papa, *Solanum tuberosum*, y de la formación de nódulos simbióticos en las raíces de leguminosas. Estos han sido muy estudiados en cuanto a los cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares, sin embargo el proceso de transducción de las señales y aún las señales internas que los desencadenan, permanecen como un interrogante de gran importancia. Las vías de transducción de señales constituyen complejas redes, donde coexisten múltiples puntos de convergencia y divergencia que permiten una integración de la señal a diferentes niveles.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar componentes de las cascadas de transducción de señales asociadas a los procesos de tuberización y nodulación, en particular los sistemas de fosforilación de proteínas posiblemente involucrados en estos procesos morfogenéticos.

Para cumplir con este objetivo se decidió realizar los siguientes puntos:

- En el proceso de tuberización:
 - o Obtener el clon genómico de StCDPK1.
 - o Obtener un anticuerpo policlonal que reconozca específicamente StCDPK1.
 - o Obtener plantas de papa transgénicas que posean una expresión de StCDPK1 aumentada o disminuida.
- En el proceso de nodulación:
 - o Estudiar la participación de CDPKs en la interacción simbiótica y durante el proceso de nodulación en plantas de *Medicago*.

El trabajo fue dividido en cuatro módulos de resultados, en cada uno de ellos se detallan los objetivos particulares específicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

1. Cepas

1.1 Cepas bacterianas de *E.coli*

- DH5 α F': F'/endA1 hdR17(r_k⁻ m_k⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 (Nal^r) relA1 Δ (lacZYA-argF)_{U169} (m80lacZ Δ M15).

- DH10B: F⁻ mrcA Δ (mrr-hdRMS-mcrBC) Δ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 endA1 ara Δ 139D(ara, leu)7697 galU galK λ ⁻ rpsL nupG.

- BL21(DE3)pLysS: F⁻, ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm(DE3) pLysS Cam^R

- XL1-Blue MRAP2

1.2 Cepa de *Agrobacterium tumefaciens*

- *A. tumefaciens* GV2260-6

1.3 Cepa de *Agrobacterium rhizógenes*

- *A. rhizógenes* ARqua1

1.4 Cepas de *Sinorhizobium meliloti*

- *Sinorhizobium meliloti* 41

- *Sinorhizobium meliloti* 2011

- *Sinorhizobium meliloti* 1021

2. Medios de cultivo

2.1 Cultivo de bacterias

- LB: bacto-triptona 1% p/v, extracto de levaduras 0,5% p/v, NaCl. 1% p/v.

- LB-agar: LB + bactoagar 1,5% p/v.

- Medio Rico para bacterias (SOC): bacto-triptona 2% p/v, extracto de levaduras 0,5% p/v, NaCl 0,05% p/v, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM, glucosa 20 mM.

- Concentración de ampicilina: 50 μ g/ml.

- Concentración de tetraciclina: 15 μ g/ml.

- Concentración de kanamicina: 50 μ g/ml

- Concentración de IPTG: 0.1 a 1 mM final.

- Concentración de X-gal: 50 mg/ml, (en dimetilformamida). Se agregaron 50 μ l/placa (concentración final p/placa: 40 μ g/ml).

- MGL: Extracto de levaduras 2,5g, tristona 5g, NaCl 5g, Manitol 5g, ácido L-Glutámico 1,16g, KH₂PO₄ 0,25g, MgSO₄.7H₂O 0,1g, llevar a pH 7.4, agar 12g/l.

2.2 Cultivo de plantas

-Medio de multiplicación (MM): sales MS (Murashige y Skoog, 1962), vitaminas B5, sacarosa 2-3% p/v, pH 5,7 (+/- agar 0,7% p/v).

-Medio de tuberización (MT): sales MS (Murashige y Skoog, 1962) con una concentración de nitratos reducida (82,5mg/l NO₃NH₄ y 95mg/l NO₃K), sacarosa 8% p/v agar 0,7% p/v, pH 5,7.

-Medio Fahræus (modificado de Vincent, 1970): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 mM, KH_2PO_4 0.7 mM, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 0.8 mM, Fe-EDTA₂ 50 µM. Micronutrients: $MnSO_4$, $CuSO_4$, $ZnSO_4$, H_3BO_3 y Na_2MoO_4 0.1µg /l de cada uno. Para el medio sólido utilizar 15 g/l. Ajustar el pH a 6.5.

3. Material Vegetal

3.1 Plantas de papa

Se utilizaron plantas de papa, *Solanum tuberosum* L. var. Spunta libres de virus, cultivadas *in vitro* o en invernadero.

Micropropagación: Plantas cultivadas *in vitro* en medio de multiplicación sólido (MM-agar) fueron cortadas en porciones de un entrenudo y plantadas en frascos de vidrio (10 plantas por frasco). Los frascos se mantuvieron en cuartos de cultivo a 23°C y fotoperíodo de 16h de luz y 8h de oscuridad.

3.1.1 Sistema de tuberización *in vitro*

Las plantas fueron cortadas en porciones de un entrenudo y plantadas en frascos de vidrio (7 a 14 plantas por frasco) con medio de tuberización sólido (MT-agar). Los frascos se mantuvieron en cuartos de cultivo a 20°C en oscuridad absoluta.

3.1.2 Cultivo de plantas de invernadero

Plantas de *Solanum tuberosum* Var. Spunta se cultivaron en macetas (tierra fértil: turba: perlita 1:1:1), a partir de tubérculos, bajo un fotoperíodo de 16h de luz y 8h de oscuridad, y una temperatura de 20-25°C. Las plantas crecidas en un invernadero se procesaron cuando tenían de 2 a 3 meses de edad. Se recolectaron tubérculos y diferentes estadios de tuberización.

3.2 Plantas de alfalfa

Se utilizaron plantas de *Medicago sativa* cv. Sitel, *Medicago truncatula* cv. Jemalong A17 y *Medicago truncatula* mutantes (dmi1, dmi2, dmi3 y sunn). Las semillas fueron esterilizadas (20 min con 2% w/v Bayrochlore®) y lavadas con diez volúmenes de agua estéril. Luego fueron colocadas en placas de Petri conteniendo agua-agar 0,75% e incubadas en oscuridad a 4°C durante dos días, después se transfirieron a 24°C durante toda la noche para su germinación. Las semillas germinadas fueron transferidas a placas conteniendo medio Fahræus sin nitrógeno y crecidas verticalmente en cuartos de cultivo a 24°C con un fotoperíodo de 16h de luz y 8h de oscuridad.

4. Soluciones generales

4.1 Soluciones empleadas en técnicas de ADN y ARN

- TE: Tris-HCl 10mM pH8, 1 mM EDTA pH8.
- Tris-EDTA (50/50): Tris 50 mM, EDTA 50 mM.
- Tris-EDTA-NaCl (50/50/100): Tris 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 1 M.
- TBE 10x: (1 litro) 108 g. Tris base, 55 g. ácido bórico, 40 ml EDTA 0,5 M pH8.
- TAE 50x: (1 litro) 242g. Tris base, 57,1 ml ácido acético glacial, 100 ml EDTA 0,5 M pH8.
- TBF1: acetato de potasio 30mM, $MnCl_2$ 50 mM, $CaCl_2$ 10 mM, KCl 100 mM y glicerol 15% v/v, pH 5,8 ajustado con acético 2 N.
- TBF2: MOPS 10 mM pH 7, $CaCl_2$ 5mM, KCl 10 mM y glicerol 10% v/v. Se ajusta a pH 7 con KOH.
- Solución I: Tris-HCl 25 mM pH 8, glucosa 50 mM y EDTA 10 mM.
- Solución II: NaOH 0,2 M y SDS 1%.
- Solución III: acetato de sodio 3 M pH 4,8

- PIC: fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1)
- H₂O DEPC. agua hexadestilada con el agregado de di-etilpirocarbonato 0,01% v/v. Se agitó durante toda la noche y al día siguiente se autoclavó dos veces.
- Buffer MOPS 10x: MOPS 0,2 M, acetato de sodio 0,5 M pH 7, Na₂EDTA 0,01 M.
- Buffer de siembra para muestras de ADN, 6x: azul de bromofenol 0,25% p/v, Xileno Cyanol 0,25% p/v y glicerol 30% v/v.
- Buffer de siembra para muestras de ARN: se emplearon 46 µl de la siguiente mezcla cada 30 µl de muestra de ARN. Mezcla: 6 µl MOPS 10x, 30 µl formamida desionizada, 9 µl formaldehído, 1 µl de Bromuro de Etidio (BrEt) 1mg/ml.
- Solución de prehibridación e hibridación de Southern y Northern blot, Church: (a) 134 g de Na₂HPO₄ 7H₂O ó 70 g de Na₂HPO₄ anhidro se disuelven en 500 ml de H₂O ajustándose a pH 7,2 con 2-4 ml de 85% de H₃PO₄. (b) 10 g de seroalbúmina bovina (BSA) más 0,372 g de EDTA se disuelven en 200 ml de H₂O. Se hidrata primero despacio la BSA y luego se agrega el EDTA. (c) A los 500 ml de (a) se añaden y disuelven 70 g de SDS agitándose con calor. El volumen se lleva con H₂O a 800 ml. Mezclar (b) y (c).
- SSC 20x: NaCl 3M, Na₃citrato 0,3M, pH 7.
- Solución de tinción con plata: Nitrato de Plata (sobre del kit) con 2 litros de agua ultrapura y en el momento de la tinción agregar 3 ml de formaldehído al 37 %.
- Solución reveladora: disolver 60 gr. de Carbonato de sodio (1 sobre) en 2 litros de agua destilada ultrapura. Calentar, enfriar a 10 °C en baño con hielo. Inmediatamente antes de usar agregar 3 ml de formaldehído 37% y 400 µl de tiosulfato de sodio (10 mg/ml).

4.2 Soluciones empleadas en técnicas de proteínas

- Buffer de siembra para muestras de proteínas, 5x: glicerol 50% v/v, DTT 7.7% p/v, SDS 10% p/v, Tris-HCl 0,4 M pH 6,8 y azul de bromofenol 0,002% p/v.
- Buffer Tris-glicina-SDS 10x: (1 litro) 30,3 g. Tris base, 144 g glicina y SDS 1% v/v.
- Azul de Coomasie: Coomasie R250 25% p/v, Metanol 30%, ácido acético 10%.
- TBS 10x: Tris-HCl 0,25 M pH 8, NaCl 9% p/v.
- TBS-Tw: TBS 1x + Tween 20 0,05% v/v.
- PBS: (1 litro) 8 g. NaCl, 0,2 g KCl, 1.15 g. Na₂HPO₄, 0,2 g. KH₂PO₄
- PBS-Tw: PBS 1x + Tween 20 0,05% v/v.
- Reactivo de Bradford (1976): (1 litro) 100 mg de Coomassie G250 en 50 ml de etanol 95%, agregar 100 ml de ácido fosfórico 85%, completar a volumen con H₂O. Se filtra y se guarda en un frasco oscuro. (Alternativamente se usó el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* de BioRad).

5. Oligonucleótidos

5.1 Clonado StCDPK1 en vectores binarios

PaB 5'CGTTGGAGGTAAAACCTCGGGAGGATCC3'
 PaX 5'TCTAGATCGATTCTGGGGTTGTTGTTT3'
 Pa18 5'GGATCCTCTGGGGTTGTTGTTTTC3'
 Pa19 5'TGGGTAGAGGTCAATATGGGGGGATCC3'

5.2 Generales

35S 5'ATCTCCACTGACGTAAGGGA3'
 GBSS 5'CTCACTCACACAGCTCAAC3'

5.3 Específicos StCDPKs

Mar1 5'AGCAAAAGTAAACCAGCAGAG3'
 Nt3 5'CTGGTTTAGGACTTGAGG3'

R11-2 5'CCCCATATTGACCTCTACCCA3'
 R10-2 5'GATAAAGATGGGAGCGGGTT3'

5.4 PCRs semicuantitativas de StCDPKs

5'St 5'GGAAGCTGCTGATGTGGATGG3'
 UTRSt1 5'GTCATATGGGCAGCGCAACAG3'
 UTRSt3 5'CCGTGCGAATTCAACCTAC3'
 Ubi5' 5'ATGCAGATCTTTGTGAAGAC3'
 Ubi3' 5'ACCACCACGGAGACGGAG3'

5.5 Expresión de StCDPK1 en pET22b+

PaR1-BamHI 5' CGCGGATCCGAGCAAAAAGTAAACCAGC 3'
 PaR2-XhoI 5' CCGCTCGAGCTCAGGCTTAAGATCACG 3'

5.6 Localización cromosómica de StCDPK1

Intrón1 5'ATGGGCCTTGTGAAATCCG3'

5.7 Clonado de MtCPK3

5'TC101857 5'AGAATCTGAAAAAATGGGG3'
 3'TC103686 5'TAAAGTACTTCTGAGAAGTGC3'

5.8 Transformación de *M. truncatula*

MtCPK3-FOR 5' TGCTGAATCTTCTGGTATGCAC 3'
 MtCPK3-REV 5' TCC TCTTGAAATTGACTTGC 3'
 GUS-FOR 5' GGCCAGCGTATCGTGCTGCG 3'
 GUS-REV 5' GGTCGTGCACCATCAGCACG 3'

5.9 PCRs semicuantitativas de MsCPK3

P1 5'AATCATGAACAAGTCAACACATCAAG3'
 P2 5'GATCTCAAGCCAGAGAATTTCTTGTTG3'
 P3 5'CTTTCTAGAATGAAGCAATTCAGAGC3'

5.10 Clonado de MsCPK3::GFP

Wt 5'CCGCTCGAGGAGATAAATGGGTGTTTGTGAGC3'
 Mtdb 5'CCGCTCGAGGAGATAAATGGCTGTTGCTTTGAGC3'
 pK100 5'CATGCCATGGTTTCGAGTTCATCTCTTGTGA3'

5.11 Real Time qRT-PCR

CDPK-Q-52 5' ACCAACCAAGCCTTCA 3'
 CDPK-Q-32 5' AGCATAAAGCAATCCAGT 3'
 E40-FORWARD 5' CCCTACACACTCTCCCTCCA 3'
 E40-REVERSE 5' CACAAAAAGGCAATGGATTCCCT 3'
 Actin11-F 5' ACGAGCGTTTCAGATG 3'
 Actin11-R 5' ACCTCCGATCCAGACA 3'

6. Plásmidos

- pGEM-Teasy (Promega): Sistema de clonado de fragmentos de PCR. Posee resistencia a ampicilina, alto número de copias, sistema de β-galactosidasa para identificación de clones positivos y secuencias promotoras para ARN polimerasas T7 y SP6.
- pET22b+ (Novagen): Sistema de clonado de fragmentos de ADN para expresión de proteínas recombinantes. Posee una señal amino terminal pelB para la localización periplásmica, más una secuencia carboxilo terminal His•Tag®.
- pFRN9 (derivado de pFGC5941; ncbi AY310901 – Gateway: Sistema para RNAi, la recombinación homóloga produce una orientación sentido y antisentido de la secuencia

clonada. Posee resistencia a kanamicina y el gen *ccdB* para selección negativa). El mismo fue provisto por Marteen Denekamp (Department of Molecular Plant Physiology, Utrecht University, Holanda).

- pCB201: vector binario derivado del vector pBIN19. Posee un origen de replicación RK2, el gen *nptIII* que confiere resistencia a kanamicina, los bordes T-DNA derecho e izquierdo y un sitio de clonado múltiple entre los bordes T-DNA.

- pGUT: vector binario con promotor específico de tubérculo, pGBSS (Granule-Bound Starch Synthase). Posee resistencia a kanamicina.

- pK100 provisto por Michel Delseny (Universidad de Perpignan, Francia).

7. Sondas

7.1 Ensayos de Southern Blot

Se utilizó como sonda un fragmento de ADN correspondiente a la secuencia completa de StCDPK1 obtenido por PCR utilizando los oligonucleótidos pabloBam y pabloXba.

7.2 Rastreo de la biblioteca genómica

Se utilizó como sonda un fragmento de ADN correspondiente a la secuencia completa de StCDPK1 obtenido por PCR utilizando los oligonucleótidos pabloBam y pabloXba.

7.3 RT-PCRS semicuantitativas

Las sondas utilizadas para hibridar las PCRs semicuantitativas fueron generadas por PCR utilizando los mismos oligonucleótidos específicos utilizados para cada RT-PCR.

8. Bibliotecas genómica

- Biblioteca de *Solanum tuberosum var. Desireé* - Clontech

9. Anticuerpos

- Anticuerpos policlonales anti-StCDPK1: Los mismos fueron obtenidos en conejos utilizando el dominio amino terminal variable como antígeno y purificados por afinidad utilizando la proteína recombinante.

- Anticuerpos policlonales anti-Mt/MsCPK3:) dirigidos contra un oligopéptido de la región N-terminal (H2N-IPTKPSSISAPSPKP-CONH2) presente en MsCPK3 y en MtCDPK3 (Eurogentec, Seraing, Belgium).

- Anticuerpos anti-histidina: anticuerpos monoclonales comerciales (QIAGEN) que reconocen el dominio de seis histidinas.

- Anticuerpos secundarios: anti-Fc de IgGs de conejo o ratón acopladas a peroxidasa (Amersham)

10. Inhibidores

-Antiproteásicos: PMSF 0,5 mM, benzamidina 1 mM, inhibidor de tripsina 2 µg/ml y aprotinina 25 unidades/ml.

-Inhibidores de quinasas: estaurosporina (ST) 1 µM.

-Antagonistas de calmodulina: clorpromazina (CPZ) 0,5 mM y compuesto 48/80 0,1 mg/ml.

-Inhibidores de fosfatasa: β-Glicerofosfato (βGP) 10 mM, NaF 2 mM, Ortovanadato de Sodio (Na₃VO₄) 1mM, Acido Okadaico (OKA) 1 nM.

Métodos

1. Identificación de genes

1.1 Preparación y transformación de bacterias competentes

E. coli:

La preparación de bacterias competentes de la cepa **DH5 α** se realizó según Hanaha con modificaciones.

- Se plaquearon bacterias sobre LB-agar y se crecieron a 37°C durante la noche.
- Se transfirieron 4 ó 5 colonias aisladas a un tubo de cultivo con 3 ml de LB y se crecieron en agitación a 37°C durante la noche.
- Se inoculó 1 ml de cultivo a 100 ml de LB en un erlenmeyer de 500 ó 1000 ml, y se creció en agitación a 37°C hasta que la densidad óptica a 600 nm es 0,5.
- Se dejaron 10 min en hielo.
- Se centrifugaron a 3000 rpm a 4°C durante 5 min y se descartó completamente el sobrenadante.
- Las bacterias se resuspendieron cuidadosamente en 40 ml de buffer TFB1 frío y se dejaron 5 min en hielo.
- Se centrifugaron a 3000 rpm a 4°C durante 5 min y se descartó el sobrenadante.
- Se resuspendieron en 4 ml de TFB2 frío y se incubaron en hielo 15 min.
- Posteriormente, las bacterias se alicuotaron en tubos eppendorf estériles en volúmenes de 50 ó 100 μ l congelándose inmediatamente en nitrógeno líquido.
- Se almacenaron las alícuotas a -70°C.

Para cada transformación se usaron 50 μ l de bacterias competentes. Estas se descongelaron en hielo y se transformaron con 1-10 ng de plásmido. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min y se sometió a un golpe de calor de 42°C durante 90 segundos, enfriándose después durante 1-2 min en hielo. Se agregaron 800 μ l de SOC estéril y las bacterias se recuperaron a 37°C durante 30 min. Se plaquearon de acuerdo a la eficiencia de las bacterias y a la cantidad de plásmido utilizado.

La preparación de bacterias electro-competentes de alta eficiencia de la cepa **DH10B** se realizó como se describe a continuación:

- Se inoculó un litro de cultivo con 1/100 de volumen de un cultivo fresco saturado durante la noche anterior.
- Se crecieron las células a 37°C en agitación hasta que la densidad óptica a 600 nm se encontraba entre 0,5 y 0,7.
- Se cosecharon por centrifugación a 4000 x g durante 15 min a 4°C en botellas estériles frías. Las centrifugaciones sucesivas fueron iguales.
- El pellet celular se resuspendió cuidadosamente en 1 litro de 10% glicerol estéril, pre-enfriado.
- Se centrifugó nuevamente. Se resuspendió el pellet en 500 ml de 10% glicerol estéril, pre-enfriado.
- Se centrifugó nuevamente. Se resuspendió el pellet en 250 ml de 10% glicerol estéril, pre-enfriado.
- Se resuspendió el pellet en un volumen final de aproximadamente 4 ml de 10% glicerol estéril, pre-enfriado.
- Se alicuotó la suspensión celular. Cada alícuota de 50 μ l se congeló empleando N₂ líquido y se conservaron a -70 °C hasta su utilización.

Para cada electroporación se usaron 50 μ l de bacterias competentes. Dada la mayor eficiencia de este método, estas bacterias se utilizaron para transformar con 1 μ l de reacciones de ligación. Se empleó un equipo MicroPulser y cubetas descartables estériles de 0,1-0,2 cm (BioRad).

La preparación de bacterias de la cepa **XL1-Blue MRAP₂** se realizó como se describe a continuación:

- Se inocularon 3 ml de LB + Maltosa filtrada 0,2% + MgSO₄ 10 mM y se incubó a 37 °C durante toda la noche.
- Se centrifugaron las células a 4800 rpm (4°C) durante 10 minutos.
- Se resuspendieron en 3 ml de SM.

A. tumefaciens:

- Se inocularon 10 ml de medio MGL con una colonia de *A. tumefaciens* GV2260-6 y se incubó a 28°C toda la noche.
 - Al otro día se agregaron 2 ml del cultivo a 50 ml de MGL y se incubó hasta D.O.₆₀₀ = 0,5 – 1.
 - Se centrifugó el cultivo durante 5 minutos a 5000 rpm a 4°C.
 - Se resuspendió suavemente en 1 ml de CaCl₂ 20 mM frío y se alicuotó de a 100 µl.
- Para la transformación se realizó utilizando 1 µg de ADN y se congeló el tubo en nitrógeno líquido durante 10 minutos. Se descongeló durante 5 minutos a 37°C. Se agregó 1 ml de MGL y se incubó durante 5 horas a 28°C.

1.2 Purificación de plásmidos

E. coli:

Se realizó a partir de cultivos bacterianos de 3 ml (minipreparaciones) ó de 50 ml (midipreparaciones).

- Las midipreparaciones de alta pureza se realizaron con el sistema Plasmid Midi Kit de QIAGEN según las instrucciones del fabricante.
- Para las minipreparaciones, en la mayoría de los casos se utilizó el método de lisis alcalina descrito en el manual “Current protocols in Molecular Biology, Cap.1 (editado por Ausubel y col. 1996).
- Se partió de 3-5 ml de un cultivo bacteriano crecido durante toda la noche en medio LB con el antibiótico correspondiente.
- Se cosecharon las bacterias por centrifugación a 4000 rpm durante 5' a Tamb.
- El pellet se resuspendió en 300 µl de solución I.
- Se agregaron 300 µl de solución II, preparada en el momento, se mezcló suavemente y se dejó 5' en hielo.
- Se agregaron 300 µl de solución III, se mezcló suavemente y se dejó en hielo 5'.
- Se centrifugó a máxima velocidad por 10 min y se tomó el sobrenadante.
- Se agregaron 50 mg/ml de ARNasa A (libre de ADNasa) y se incubó por 30 min a 37°C.
- Se hicieron 2 extracciones con 400 µl de cloroformo.
- Se precipitó con el agregado de 1 volumen de isopropanol 100% y centrifugación a 13000 rpm por 10 min a Tamb.
- El pellet se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 20 µl de H₂O.

Alternativamente se realizaron *boiling minipreps* de la siguiente forma:

- 1,5 ml de cultivo se precipitaron a 12000 rpm a T ambiente durante 30 segundos en una microcentrífuga.
- Las bacterias se resuspendieron en 360 µl de buffer STET.
- Se agregaron 40 µl de lisozima (10 mg/ml, Sigma). La mezcla se agitó en un vórtex.
- Rápidamente se hirvió durante 40 segundos en tubos eppendorf con las tapas abiertas.

- El ADN bacteriano se precipitó a T ambiente a 13000 rpm durante 15 min y fue descartado.
 - Se agregaron 400 µl de isopropanol y la mezcla se agitó en un vórtex y se centrifugó a 13000 rpm a T ambiente durante 10 min.
 - Se descartó el sobrenadante y el plásmido se lavó con 0,5 ml de etanol 70%.
 - Se centrifugó a 13000 rpm a T ambiente durante 5 min y el sobrenadante se descartó. El plásmido se resuspendió en 30-50 µl de H₂O.
 - Se agregó 1 µl de ARNsa A (10mg/ml) y se incubó a 37°C durante 30 min para degradar el ARN.
- En los casos necesarios, las digestiones con enzimas de restricción se realizaron directamente en esta mezcla.

A. tumefaciens:

- Se centrifugó un cultivo de 10 ml durante 30 segundos a máxima velocidad.
- Se lavó con 1 ml de Tris/EDTA/NaCl (50/50/100) frío y se centrifugó durante 30 segundos a máxima velocidad.
- Se lavó con 1 ml de Tris/EDTA (50/50) frío y se centrifugó durante 30 segundos a máxima velocidad.
- Se resuspendió el pellet en 100 µl de Solución I fría.
- Se agregó 4 µl de RNasa/DNasa free (0,5 mg/ml) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se agregó 200 µl de Solución II y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se agregó 30 µl de fenol equilibrado con la Solución II y se mezcló suavemente.
- Se agregó 150 µl de acetato de Na 3 M pH4.8, se mezcló por inversión y se incubó a -20°C durante 15 minutos.
- Se centrifugó durante 10 minutos y se transvasó el sobrenadante a otro tubo.
- Se realizó una extracción con Fenol.
- Se agregó 500 µl de etanol 100% y se incubó a -80°C durante 15 minutos.
- Se centrifugó durante 10 minutos a máxima velocidad.
- Se resuspendió con 500 µl de NH₄Oac 7.5 M, pH7.0.
- Se agregó 500 µl de etanol 100% y se incubó -80°C durante 15 minutos.
- Se centrifugó durante 10 minutos a máxima velocidad.
- Se lavó el pellet con etanol 70%.
- Se secó el pellet y se resuspendió en 50 µl de TE.

1.3 Rastreo de la biblioteca genómica

- Para obtener el título de las bibliotecas de ADNc utilizadas se prepararon células competentes XL1-Blue crecidas en LB líquido con 10 mM de SO₄Mg y 0,2% de maltosa y se realizaron diluciones de la biblioteca original (10⁻²-10⁻⁸). Después se procedió de la siguiente manera:
- 20 µl de cada dilución de la biblioteca + 100 µl de células competentes se incubaron 20 min a T° ambiente y 10 min a 37°C.
- Se agregaron 7-8 ml de TOP agarosa (0,7% de agarosa en LB) con tetraciclina 12 µg/ml mantenida a 48°C. Se mezcló en un vórtex.
- Se plaqueo en placas grandes (0,137 m de diámetro) con LB agar bien seco.
 - Se mantuvo durante 10 min a T ambiente y después se pasó a 37°C.
 - Después de 6 h se observaron unidades formadoras de colonias (pfu). Se selecciono la dilución óptima que permitiera obtener aproximadamente 30000 pfu por placa.
 - Se repitieron los pasos anteriores utilizando 6 placas grandes. Cuando las colonias fueron visibles y no confluentes se sacaron las placas de la estufa y se dejaron a 4°C durante 30 min o más.
 - Sobre cada placa se colocaron 2 filtros de nylon Hybond N+ (Amersham), el primero 1 min y el segundo 5 a 7 min.

- Los filtros se dejaron secar sobre un papel Whatman 3MM.
- Manteniendo el ADN de los fagos hacia arriba las membranas se colocaron durante 7, 3 y 3 min respectivamente sobre 3 papeles Whatman que estaban embebidos en las siguientes soluciones: (1) 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH y (2) 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 7,2 y 1 mM EDTA (2 veces).
- Después se sometieron a 120000 μ J de radiación ultravioleta usando un UV Stratalinker 1800 de Stratagene.
- Posteriormente las membranas se prehibridaron con medio Church a 65°C durante 6 h y se hibridaron con las sondas correspondientes durante toda la noche.
- Luego, las membranas se lavaron 30 min con 2x SSC, 0,1% de SDS, con 1x SSC, 0,1% de SDS y con 0,1x SSC, 0,1% de SDS respectivamente.
- A las 48h se revelaron las placas identificándose los clones positivos en cada duplicado.
- Estos clones se seleccionaron levantando el agar de las placas con una punta azul estéril y agregando 0,5 ml de medio SM (100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄.7H₂O, 50 mM Tris-HCl pH7.5) más 50 μ l de cloroformo. La mezcla se agitó en un vortex y se guardó a 4°C.
- A partir de cada positivo se prepararon dos diluciones (10^{-1} y 10^{-2}) de la fase superior y se realizó una segunda ronda de rastreo de forma idéntica a la descrita anteriormente pero utilizando placas pequeñas (0,087 m de diámetro).
- Se volvieron a identificar los clones positivos realizando dos diluciones (10^{-1} y 10^{-2}) de cada uno de ellos y luego se realizó una tercera ronda de rastreo. En esta última todos los clones identificados fueron positivos. Se consideró entonces que los clones estaban puros.

1.4 Escisión in vivo de fagos positivos

Se utilizó el QIAGEN Lambda Midi Kit de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Los clones se confirmaron por PCR utilizando oligonucleótidos específicos y luego fueron secuenciados.

1.5 Secuenciación y análisis de las secuencias

Los plásmidos correspondientes a los clones aislados de las bibliotecas de ADNc y todas las construcciones realizadas fueron secuenciados en centros de servicios en el exterior:

- Bio Resource Center: Cornell New York State Center for Advanced Technology and Biotechnology. Cornell University, Ithaca, US.
- Cancer Research Center: Chicago University, Chicago, Illinois, US.
- Macrogen Inc. World meridian Venture Center, Gasan-dong, Geumcheon-gu, Seoul, Korea.

El análisis y la comparación de las secuencias se realizó con los programas Omega y BLAST.

1.6 Marcación de sondas radioactivas

Las sondas radioactivas se prepararon con el kit Prime a gene (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. La marcación se realizó utilizando 25 ng de fragmento de ADN por iniciación al azar de la polimerasa utilizando una batería de hexámeros inespecíficos. Como nucleótido radioactivo se usó [³²P]-dCTP. La sonda se purificó utilizando columnas de Pharmacia Biotech (MicroSpin™ S-300 HR Columns) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2. Técnicas generales

2.1 Subclonado en pGEMT-easy

La Taq polimerasa deja, en los extremos 5' de sus productos de amplificación, nucleótidos A sobresalientes. Los productos de PCR obtenidos con estas características se subclonaron en el plásmido pGEMT-easy, incluido en el kit pGEMT-easy vector System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el caso de fragmentos de PCR amplificados con la enzima Pfu, se realizaron reacciones de agregado de el nucleótido A salientes (tailing) previo al subclonado en el plásmido pGEMT-easy. Para ello se siguieron las instrucciones del kit.

2.2 Otras reacciones de ligación

En cada reacción de ligación se utilizaron entre 10 y 50 ng de vector. Se hicieron diferentes relaciones molares de inserto:vector (1:1, 3:1 y 5:1) manteniendo constante la masa de vector y variando la cantidad de inserto. Los volúmenes de reacción fueron de 10 o 20 μ l utilizando la enzima ADN ligasa del fago T4 (GibcoBRL). Para ligar extremos romos se usó 1 U de enzima y para extremos cohesivos 0,1 U. Las incubaciones fueron a 16°C durante toda la noche o a 37°C por 1 h, respectivamente.

2.3 Corte con enzimas de restricción

Las digestiones de ADN plasmídico o genómico se realizaron en los buffers indicados por el fabricante. Las enzimas utilizadas fueron de New England Biolabs, Promega o GibcoBRL. Se utilizaron de 3 a 5 unidades de enzima por μ g de ADN y las incubaciones se hicieron a las temperaturas recomendadas por el fabricante.

2.4 Amplificaciones por PCR

A partir de secuencias identificadas se diseñaron los oligonucleótidos que se usaron en las diferentes reacciones de amplificación por PCR (ver sección A 5). La mezcla de amplificación estaba compuesta por el ADN molde correspondiente, 100 ng de cada oligonucleótidos, 1 a 3 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, buffer Taq ó Pfu 1x y 2,5 U de enzima ADN polimerasa (Taq ó Pfu, dependiendo del objetivo final de la PCR). El volumen final en todos los casos fue 50 μ l.

Todas las reacciones constaron de:

- 5 min a 95°C (desnaturalización inicial del ADN)
- 30 ciclos de:
 - 1 min a 95°C (desnaturalización)
 - 1 min a T° (anidado)
 - t min a 72°C (elongación)
- y 10 min a 72°C (elongación final)

Donde T° y t son variables, dependiendo de la temperatura de fusión de los oligonucleótidos usados en cada reacción de PCR y de la longitud del fragmento amplificado en cada caso.

Todas las reacciones se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1%.

2.5 Electroforesis de ADN

Se utilizaron geles de agarosa nativos. Estos se prepararon con buffer TBE 1x o TAE 1x al 0,7-1,5% con 0,5 mg/ml de EtBr. Las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 V/cm. Antes de sembrar, las muestras se resuspendieron con el correspondiente volumen de buffer de siembra 6x. Los geles fueron visualizados y fotografiados con el equipo Image Master VDS, de Pharmacia-Biotech.

2.6 Purificación de fragmentos de ADN de geles

En la mayoría de los casos, los fragmentos de ADN se purificaron utilizando el kit QIAquick (QIAGEN). Los fragmentos de ADN a purificar se separaron por electroforesis en geles de agarosa en buffer TAE 1x y luego se siguieron las instrucciones del fabricante.

2.7 Purificación y precipitación de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos a ser purificados se llevaron a más de 200 μ l con H₂O o buffer TE. Para remover proteínas y lípidos se agregó 1 volumen de fenol:cloroformo: isoamílico pH 8 (25:24:1) (PIC) y se tomó la fase acuosa (superior). Para remover restos de fenol, se agregó 1 vol de cloroformo:isoamílico (24:1) (CI) y se tomó la fase acuosa. Los ácidos nucleicos se precipitaron con 1/10 volúmenes de 3 M acetato de sodio pH 5.2 o pH 4,8, o con 1/3 vol de 7,5 M acetato de amonio pH 5.2, con el agregado de 2,5 vol de etanol 100%. Se dejó a -70 °C por 20-30 min y se centrifugó 13000 rpm por 20 min. El pellet se lavó con etanol 70%, se dejó secar y se resuspendió con H₂O o buffer TE.

2.8 Localización cromosómica de StCDPK1

2.8.1 Geles de secuencia MDE (Mutation Detection Enhancement)

- Limpiar los dos vidrios con agua destilada y alcohol al 96%, para remover grasas, huella digitales, etc.
- Tratar una cara del vidrio grande con una solución que contenga 2 μ l Bind silane + 1ml de solución Etanol 95% + Ac.acético 0,5 % (solución hidrofílica)
- Tratar una cara del vidrio chico con Rain X (solución hidrofóbica). Tratar los vidrios por separado cambiando guantes, para evitar el pegado del gel a ambos vidrios
- Secar al aire, 5 minutos. Remover el exceso con alcohol al 96 % utilizando papel tissue sin presionar, y en distintas direcciones (oblicuas entre si).
- Colocar el vidrio grande en el armador de geles.
- Ubicar los separadores de 0,4 mm en los bordes del vidrio grande.
- Medir 80 ml de solución de 5 % poliacrilamida (acrilamida: bis-acrilamida, 19:1).
- Agregar 80 μ l de Temed + 400 μ l de APS 10.
- Rápidamente verter sobre el vidrio grande, desplazando el vidrio chico, tratando de que no queden burbujas.
- Colocar el peine invertido entre los dos vidrios.
- Asegurar ambos vidrios con clamps.
- Dejar polimerizando 2 hs.

2.8.2 Corrida electroforética

La electroforesis fue llevada a cabo en un equipo de electroforesis vertical (NUGeneration TM OWL Scientific, Inc) de 30 x 50cm x 0,4mm.

Se utilizaron peines con 65 calles. Las muestras conteniendo 10 μ l de volumen de reacción y 4 μ l de buffer de carga (98% formamida, 10 mM de EDTA pH8, 0,1 % de azul de bromofenol y 0,1 % xilene cyanol). se fueron desnaturalizadas 3 min. a 94 °C, y rápidamente colocadas en hielo. Se sembraron 5 μ l de muestra por calle.

Condiciones de corrida: 2000 watt, 200mA, 5 Volts. Corren toda la noche a temp ambiente (aprox. 16 hs)

2.8.3 Tinción con plata

- Remover los vidrios de la cuba de electroforesis y retirar el peine.
- Separar cuidadosamente los dos vidrios. El gel debería quedar sobre el vidrio grande.
- Colocar el vidrio con el gel en una bandeja con solución fijadora (10% Ac. Acético glacial)
- Agitar hasta que desaparezca el Xilene Cyanol.

- Lavar con 2 litros de agua bidestilada durante 2 minutos y en agitación.
- Repetir el paso anterior 2 veces
- Teñir 30 minutos con solución de plata. Agitar suavemente
- Remover el exceso de plata sumergiendo y escurriendo el gel en una misma bandeja con agua destilada (4 veces). Este paso es crítico, debe durar 5 segundos
- Colocar en una bandeja con solución reveladora.
- Una vez visualizadas las bandas, frenar el revelado con Ac. Acético glacial al 10 %.
- Realizar dos lavados (2 minutos cada uno) en agitación con agua bidestilada.

3. Caracterización molecular de genes identificados

3.1 Cuantificación de ácidos nucleicos

Muestras de ADN, ARN y oligonucleótidos se cuantificaron por medición de la absorbancia a 260 nm. Las concentraciones se calcularon sabiendo que $1\text{DO}_{260\text{nm}}$ de ADN= 50 mg/ml, $1\text{DO}_{260\text{nm}}$ de ARN= 40 mg/ml y $1\text{DO}_{260\text{nm}}$ de oligonucleótidos= 33 mg/ml y teniendo en cuenta el factor de dilución. Muestras de ADN también se cuantificaron por gel, comparando las intensidades observadas al UV con las intensidades dadas por un marcador de masa conocida.

3.2 Extracción de ADN genómico

- Pesar hasta 1 gramo de tejido vegetal fresco.
- Macerar las hojas en un mortero con nitrógeno líquido.
- Transferir a un tubo de polipropileno conteniendo 10 ml de buffer CTAB (CTAB 2%, NaCl 1.4M, Tris-HCl pH8 100mM, EDTA 20mM, β -MeOH 0.2%) precalentado a 65°C. Incubar entre 30 minutos y 1 hora agitando cada 10 minutos.
- Agregar un volumen de cloroformo y agitar por inversión.
- Centrifugar durante 10 minutos a 5000xg.
- Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo. Repetir la extracción con cloroformo. (esta etapa puede repetirse una o dos veces más para lograr una muestra más pura).
- Adicionar RNAsa A a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$ e incubar a 37°C durante 30 minutos.
- Agregar 0.6 volúmenes de isopropanol frío y mezclar suavemente por inversión.
- Si se forma un ovillo de ADN se toma con un anillo y se pasa a un tubo con 500 μl de etanol 70%. De lo contrario centrifugar la muestra durante 1 minuto a 4000 rpm.
- Secar el precipitado.
- Resuspender en 1 ml de TE o agua destilada toda la noche a 4°C con agitación.
- Concentrar la muestra hasta aproximadamente 200 μl en SpeedVac.

3.3 Ensayos de Southern Blot

Se digirieron entre 10 y 20 μg de ADN genómico con diferentes enzimas de restricción. La reacción se llevó a cabo en 400 μl finales, empleando 3 unidades de enzima por microgramo de ADN genómico. Primero se incubó el ADN con el buffer apropiado para cada enzima a 4°C durante unas horas agitando en distintos intervalos. Luego del agregado de la enzima de restricción se incubó unos minutos a 4°C y después se pasó a 37°C durante toda la noche. Al otro día se agregó 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M pH5.2 y 2,5 volúmenes de etanol 100% frío. Se incubó a -80°C durante una hora y se centrifugó a máxima velocidad durante 20 minutos. Se secó el pellet y se resuspendió en 30 μl de Tris pH7.5 10 mM

El ADN digerido se separó en un gel 0,7% agarosa que se corrió a 70 V durante 5-6 h. A continuación el gel se trató con 0,25 N de HCl durante 30 min, se lavó con H₂O y se transfirió durante la noche a una membrana de nylon Hybond N+ (Amersham) con 0,4 N

de NaOH. La membrana se lavó unos minutos con SSC 2x y se prehibridó con Church a 65°C. Posteriormente se hibridó durante toda la noche con una sonda marcada con [³²P]dCTP. La membrana se lavó 20 min con 2x SSC, 0,1% de SDS y 20 min con 1x SSC, 0,1% de SDS. Se expuso con pantalla amplificadora y a -70°C a una placa fotográfica X-Omat de Agfa. La placa se reveló entre 7 y 10 días después. Alternativamente se registró la señal empleando un fosforimager Storm 820 (Pharmacia-Biotech).

3.4 Extracción de ARN total

Antes de realizar la extracción de ARN todo el material y las soluciones a utilizar fueron esterilizados en un autoclave a 1 atmósfera de presión durante 20 min para evitar la actividad de RNAsas.

Las extracciones se realizaron como se detalla a continuación

- 0,3 a 1 g de material vegetal fue cosechado y congelado inmediatamente en nitrógeno líquido. En un mortero previamente enfriado se procesó el material hasta obtener un polvo fino. Durante todo el proceso el material siempre se mantuvo congelado.

- Se agregó 1 ml de Trizol (GibcoBRL) por cada 100 mg de material vegetal.

- La mezcla se pasó a un tubo Corex de vidrio y se centrifugó a 12000 xg a 4°C durante 10 min en una centrífuga Sorvall con un rotor SS-34.

- El sobrenadante se pasó a un tubo Falcon estéril de 15 ml y se mantuvo a T ambiente durante 5 min para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos.

- Se agregó 0,2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol inicial. A continuación los tubos se agitaron a mano por inversión durante 15 segundos y se incubaron a T ambiente 2-3 min.

- La mezcla se pasó a un tubo Corex nuevo y se centrifugó a 10000 rpm a 4°C durante 15 min.

- La fase acuosa (superior) se transfirió a un nuevo tubo y se le agregó 0,5 ml de isopropanol más 0,5 ml de 1.2 M citrato de sodio, 0,8 M NaCl por cada ml de Trizol utilizado.

- La mezcla se incubó a T ambiente 10 min y después se precipitó a 10000 rpm a 4°C durante 10 min en la centrífuga. Se descartó el sobrenadante.

- El sedimento con aspecto gelatinoso se resuspendió en 3 ml de acetato de sodio 3 M pH 5.2, agitándolo en el vórtex durante unos segundos hasta su completa resuspensión. La mezcla se centrifugó a 12000 rpm durante 20 min a 4°C. De esta manera se eliminaron los polisacáridos.

- El sedimento se lavó con 2 ml de etanol 70% preparado con H₂O DEPC y se centrifugó a 12000 rpm a 4°C durante 15 min.

- El sedimento se secó con el tubo invertido. Cuando estuvo bien seco se resuspendió en 30-200 µl con H₂O DEPC en función de la cantidad de material inicial procesado. El ARN se guardó a -70°C hasta el momento de usarlo

Alternativamente, cuando las cantidades de material utilizada eran menores a 300 mg (aprox. 100 mg) el ARN total se extrajo usando el sistema RNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN. La extracción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5 Electroforesis de ARN

Se utilizaron geles de 1,4% agarosa desnaturalizantes con 6% formaldehído en buffer MOPS 1x pH 7. Las muestras a sembrar se llevaron a 30 µl con agua DEPC y se les agregó 46 µl de buffer de siembra. Las mismas se calentaron a 65°C por 10 min, se colocaron en hielo. La corrida electroforética se realizó con buffer MOPS 1x, 6% formaldehído a 5-10 V/cm. Los geles fueron visualizados y fotografiados con el equipo Image Master VDS, de Pharmacia-Biotech.

3.6 Ensayos de Northern Blot

15-30 µg de ARN total en 30 µl de H₂O DEPC fueron tratados con 46 µl de buffer de siembra para muestras de ARN 15 min a 65°C y separados en geles formaldehído-

agarosa 1,4%. El buffer de corrida contuvo por cada 300 ml, 30 ml de buffer MOPS 10x, 45 ml de formaldehído y 225 ml de H₂O estéril. El gel se corrió durante 4-5 h a 70 V.

Tras la separación electroforética el ARN se transfirió toda la noche a una membrana de nylon Hybond N+ (Amersham) usando SSC 10x. Al día siguiente la membrana se sometió a un pulso de radiación ultravioleta de 120000 µJ usando un UV Stratalinker 1800 de Stratagene. Después la membrana se lavó unos minutos con SSC 2x y se prehibridó con medio Church a 65°C durante varias horas. A continuación se hibridó durante toda la noche con las sondas correspondientes y al día siguiente se lavó con 2x SSC, 0,1% de SDS, 1x SSC, 0,1% de SDS y 0,2x SSC, 0,1% de SDS. Por último la membrana se expuso a una placa fotográfica X-Omat (Kodak) a -70°C durante 2-3 días, en un cassette con pantalla amplificadora.

Alternativamente se registró la señal empleando un fosforimager Storm 820 (Pharmacia-Biotech). En tales casos, las diferencias se cuantificaron empleando el software ImageQuant.

3.7 Transcripción reversa

En todos los casos, 10 µg del ARN obtenido fueron tratados con 10 unidades ADNasa 1 libre de ARNasas (Promega) durante 30 min a 37°C. Luego de la incubación las muestras se trataron durante 10 min a 75°C y se precipitaron con acetato de sodio y etanol toda la noche a -20°C. A continuación se centrifugaron en frío durante 20 min a 13.000 rpm. El precipitado se resuspendió en agua DEPC y se cuantificó a 260nm en un espectrofotómetro. El rendimiento fue del 50 a 90%. El ARN tratado con ADNasa se almacenó a -70°C. y se utilizó como molde en la síntesis de ADNc. La transcripción reversa se llevó a cabo durante 1h a 37°C utilizando la M-MLV-Transcriptasa Reversa (Promega) y 2 µg ARN molde.

3.8 PCRs semicuantitativas

- Para StCDPKs:

En primer lugar se realizaron reacciones control de PCR para confirmar el uso de cantidades equivalentes de ADNc molde, empleando oligonucleótidos específicos que amplifican un fragmento de 250 pb de la ubiquitina (20 ciclos de amplificación con temperatura de anidado 55°C).

A continuación se realizaron reacciones semicuantitativas de RT-PCR usando oligonucleótidos específicos para amplificar exclusivamente cada ARNm de StCDPK (*StCDPK1* y *StCDPK3*). Se empleó un oligonucleótido 5' común presente en las tres secuencias de StCDPKs (5'St) que se combinó con dos oligonucleótidos 3' derivados de la región 3' no codificante (UTR) de cada isoforma. Como control positivo se amplificó un fragmento de 340 bp común para las tres isoformas con los oligonucleótidos R4 y R5. Las PCRs se realizaron usando Platinum Taq polymerase (Invitrogen) y constaron de 30 ciclos, con una temperatura de anidado de 64°C para *StCDPK1* y *StCDPK2* y una de 61°C para *StCDPK3*.

- Para MsCDPKs:

Se utilizaron los oligonucleótidos P1 (específico para el dominio N-terminal) y P3 (específico para el dominio autoinhibidor) para amplificar específicamente *MsCPK3*.

Para amplificar varias CDPKs se utilizó la combinación del oligonucleótido P2 (específico para el subdominio catalítico VIb conservado) y el oligonucleótido P3.

Oligonucleótidos específicos para *MsC27* fueron utilizados para amplificar este gen constitutivo, que fue utilizado como control para el uso de cantidades equivalentes de ADNc molde.

Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa 1%, se fotografiaron y se transfirieron a membranas Hybond N+ (Amersham). Las membranas transferidas se hibridaron con diferentes sondas radioactivas. Luego de los lavados, la señal fue

registrada empleando un fosforimager Storm 820 (Pharmacia-Biotech) y cuantificada empleando el software ImageQuant.

4. Estudios bioquímicos

4.1 Extracción de proteínas

El material vegetal cosechado se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantuvo almacenado a -70°C hasta el momento de ser analizado. Los extractos vegetales se prepararon con un buffer que contenía: 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 2 mM β -mercaptoetanol, 1 mM de EDTA y 20% (v/v) de glicerol. En el momento de ser usado a este buffer se le agregaron los inhibidores de proteasas PMSF (0,5 mM), benzamidina (1 mM), inhibidor de tripsina (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y aprotinina (25 unidades/ml).

El material se procesó en un mortero enfriado previamente evitando su descongelamiento hasta que el buffer fue añadido en una relación 1:1 (p/v). La mezcla se centrifugó a $1000 \times g$ a 4°C durante 10 min en una centrifuga Eppendorf modelo 5804 R. El sedimento se descartó y el sobrenadante se centrifugó de nuevo a $20000 \times g$ a 4°C durante 1 hora, obteniéndose así las fracciones solubles y particuladas.

Para la extracción de proteínas totales se utilizó un buffer conteniendo 125 mM Tris-HCl pH 8.8, 1% SDS, 10% Glycerol y 50 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$.

4.2 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas de los extractos fue determinada por el método de Bradford (1976) utilizando muestras concentradas o diluciones de los mismos. Se usó albúmina de suero bovino para realizar una curva de calibración y las lecturas de absorbancia se hicieron a 620 nm. Se realizaron como mínimo dos duplicados para cada muestra.

4.3 Electroforesis de proteínas

Se utilizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acuerdo con el método de Laemmli (1970). Se armaron geles desnaturalizantes (0,1% SDS) de 10 a 15% en celdas BioRad 220. Las muestras a ser analizadas se prepararon agregándoles los volúmenes correspondientes de buffer de siembra 5 x y calentándolas por 3-5 min a 100°C . Como buffer de corrida se usó tris-glicina-SDS 1x. Los marcadores de peso molecular usados fueron de 14,3 a 200 kDa, en los casos de alto rango y de 6 a 100 kDa, que son los de bajo rango (GibcoBRL).

4.4 Ensayos de actividad CDPK

Las determinaciones de actividad quinasa se realizaron de acuerdo a Macintosh y col. (1996) usando alícuotas (2 μg) de las diferentes fracciones. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 60 μl . la mezcla de incubación contenía Tris-HCl 20 mM pH 7,5, MgCl_2 10 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, ATP frío 50 μM y ATP [γ - ^{32}P] [$1,5 \times 10^6$ cpm/ensayo; 3000 Ci/mmol, New England Biolabs]. Los ensayos se realizaron en presencia de 1 mM de CaCl_2 ó 1 mM de EGTA y empleando 25 μM de syntide-2 (Sigma) como sustrato.

En presencia de calcio también se realizaron ensayos con diferentes inhibidores:

1 μM de estaurosporina (ST), 0,5 mM de clorpromazina (CPZ), 0,1 mg.ml⁻¹ de compuesto 48/80 y 100 nM de ácido okadaico (OKA).

La reacción se inició con el agregado de la mezcla radioactiva y se incubó durante 30 min a 30°C . Luego de la incubación se detuvo la reacción colocando 40 μl sobre papeles de fosfocelulosa Whatman P81 (2 x 2 cm) que se sumergieron inmediatamente en una solución de H_3PO_4 75 mM (en baño de hielo) y se lavaron tres veces por 10 min. Tras enjuagar los papeles en acetona, se secaron y se sumergieron en una mezcla

centelleante de tolueno-omnifluor. La lectura del fósforo radiactivo incorporado se realizó en un contador de centelleo líquido Wallac 1214 Rackbeta. Se realizaron dos blancos con calcio y EGTA, sin fuente enzimática.

Cuando se analizó la fosforilación dependiente de calcio de histona H1 el volumen de la reacción fue de 40 μ l y la mezcla de incubación y contuvo Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, ATP frío 5 μ M y ATP [γ -³²P] [10⁷ cpm/ensayo] y 0,1 mg/ml de histona H1 (Calbiochem, desnaturalizada 5 min a 100°C). La reacción se inició con el agregado de la mezcla radioactiva y se incubó durante 5 min a 30°C. El ensayo se detuvo con el agregado de buffer de siembra 5x. Las muestras se pasaron a hielo y después se calentaron durante 5 min a 100°C. Luego, se enfriaron en hielo y se analizaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%. Los geles radioactivos se transfirieron y se expusieron en películas autoradiográficas AGFA Gevaert CURIX en presencia de una pantalla amplificadora. Alternativamente se registró la señal empleando un fosforimager Storm 820 (Farmacia-Biotech). En tales casos, las señales se cuantificaron empleando el software ImageQuant.

4.5 Ensayos de Western Blot

Extractos proteicos (15-100 μ g) fueron resueltos en geles SDS-PAGE al 10-15% y luego electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa (Amersham-C). La transferencia se hizo en cuba de inmersión (Bio-Rad) utilizando Tris-glicina 1x, 20% metanol durante 1-1,5 h a 80-100 volts. Las membranas fueron incubadas durante 1 h con solución de bloqueo (5% leche descremada o 4% BSA en buffer TBS-Tw) y luego con los correspondientes anticuerpos primarios durante 1-2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-Tw, se incubaron durante 1 h con los correspondientes segundos anticuerpos y se volvieron a lavar. Como sustrato para la peroxidasa se usó el kit de quimioluminiscencia ECL (Amersham). Los anticuerpos secundarios se diluyeron en 1% leche descremada o 0,4% BSA.

En los ensayos con *M. truncatula* fueron utilizados anticuerpos contra MtRBP1 (RNA-binding protein) para su normalización (Campalans y col., 2004).

4.6 Stripping de membranas de nitrocelulosa

Las membranas utilizadas para W. blot fueron incubadas con el buffer conteniendo β -MeOH 100 mM, SDS 2% y Tris-HCl pH6.7 62,5 mM durante 30 minutos a 50°C con agitación leve. Luego se lavaron dos veces con PBS-Tw durante 10 minutos a temperatura ambiente.

5. Proteínas recombinantes StCDPK1

5.1 Expresión de proteínas recombinantes

Cultivos saturados de *E.coli* BL21pLysS transformadas con pET22b+/-StCDPK1 se diluyeron 1/20 en LB ampicilina y se incubaron con agitación a 30°C, hasta una DO₆₀₀=0.6. Luego se indujeron con IPTG 1 mM (concentración final) por 4 horas.

El cultivo bacteriano se centrifugó y los cuerpos de inclusión se purificaron a partir del pellet. Éste se resuspendió en buffer de lisis nativo (pH 8, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF y 50 mM NaH₂PO₄) y se sonicó utilizando un macrotip durante 6 ciclos.

El sonicado se centrifugó durante 30 minutos a 10.000 xg a 4°C, separándose las fracciones solubles y particuladas. Esta última fue resuspendida en 10 ml del buffer de lisis sin el agregado de PMSF.

5.2 Purificación de proteínas recombinantes en condiciones desnaturizantes

Para purificar la proteína recombinante presente en la fracción particulada se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 1.000 xg y se descartó el sobrenadante.

Este pellet se resuspendió en 10 ml de buffer B (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 8).

Se armó una columna con resina de níquel-nitrilotriacético (Ni-NTA) equilibrada con buffer B. Luego se resuspendió la resina de níquel con los 10 ml de proteína recombinante en buffer B durante 1 hora con agitación y se volvió a colocar todo en una columna.

Se lavó dos veces con 4 volúmenes de buffer C (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 6.3) y se eluyeron las proteínas utilizando 3 ml de buffer D (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 5.9) y 3 ml de buffer E (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 4.5).

Las fracciones recolectadas fueron visualizadas en geles teñidos con azul de Coomassie y la purificación de la proteína recombinante fue confirmada con anticuerpos comerciales que reconocen el epítopo de 6 histidinas. La concentración de la proteína purificada fue determinada por Bradford (1976) y en gel utilizando BSA como proteína patrón.

5.3 Obtención de Anticuerpos

Se inyectaron 2 conejos vía subcutánea en dos dosis de 0,8 y 0,7 mg de proteína recombinante purificada mezclada con adyuvante de Freund completo (en 6 lugares diferentes cada vez) con un intervalo de 25 días. A los 15 días de la segunda inoculación se realizó una sangría exploratoria de la oreja para chequear el título específico. A la semana se realizó la punción a blanco obteniéndose unos 70 ml de suero aproximadamente. La especificidad del antisuero fue probada en ensayos de Western blot utilizando extractos bacterianos.

5.4 Purificación de anticuerpos

Sepharosa CL4B – Proteína A:

- Se diluyó el suero 1:3 en buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 8,0
- Se centrifugó durante 2 minutos a 3000 rpm.
- Se sembró la muestra en una columna de Sepharosa CL4B – Proteína A, previamente equilibrada con 10 volúmenes de buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 8,0.
- El eluido se volvió a sembrar en la columna otras 6 veces para asegurar que se unieron la mayoría de los anticuerpos a la Proteína A.
- Se lavó la columna con buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 8,0 hasta obtener una densidad óptica a 280 nm mínima mediante el método de Bradford (1976).
- Se eluyó la columna con buffer citrato de sodio 0,05 M pH 3,0, recogiendo en tubos conteniendo previamente Tris-HCl 1M pH 8,8 para neutralizar el eluido.
- Se determinó la concentración de proteína en cada tubo mediante el método de Bradford (1976) para descartar aquellos tubos donde no se recogieron más muestra.
- Se juntaron los eluidos donde se detectó presencia de proteína mediante el método de Bradford (1976) y se dializó con PBS pH 7,4 durante toda la noche a 4 °C con agitación.

HiTrap-Proteína G:

- Se diluyó el suero 1:2 con 20 mM fosfato de sodio pH 7,0
- Se filtró la dilución por un filtro de 0,45 µm.
- Se lavó una columna HiTrap PtG HP (Amersham) de 1 ml de capacidad con 10 ml del buffer fosfato.
- Se sembró la muestra diluída en la columna y luego se lavó con 10 ml del buffer fosfato, chequeando mediante el método de Bradford (1976) cuando ya no salieran más proteínas.
- Se eluyeron las inmunoglobulinas utilizando 5 ml de buffer de elusión (100 mM glicina-HCl, pH 2,7) y se recogieron en fracciones de 0,5 ml en tubos conteniendo previamente Tris-HCl 1M pH 8,8 para neutralizar el eluido.

- Se juntaron los eluidos donde se detectó presencia de proteína mediante el método de Bradford (1976) y se dializó con PBS pH 7,2 durante toda la noche a 4 °C con agitación.

6. Determinación de clorofila

Se utilizó una relación 1:9 v/v de extracto de hojas de papa y acetona 80% v/v. La mezcla se homogeneizó y se centrifugó a 9500 xg durante 10 minutos.

Se midió la absorbancia del sobrenadante a 652 nm y se calculó la concentración de clorofila aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{mg clorofila / g PF} = \text{Abs} \times \text{ml Vf} / 34.5 \times \text{g PF}$$

donde Vf: volumen final de la reacción

34.5: coeficiente de absorción específica de la clorofila total (clorofila a y b)

g PF: gramos de material vegetal en la muestra

7. Transformación de discos de papa vía *Agrobacterium tumefaciens*

Transformación a partir de discos de tubérculo de papa variedad Spunta usando kanamicina como agente de selección.

Se transformaron tubérculos, variedad Spunta, mediante la técnica de disco de papa, con selección en medio MS suplementado con zeatín ribósido, ácido indolacético para inducir la organogénesis, kanamicina, para seleccionar las células vegetales que hayan sido exitosamente transformadas con la construcción de silenciamiento y cefotaxime con el fin de eliminar las células remanentes de *Agrobacterium* en los explantos.

Transformación mediante infección con *A. tumefaciens*.

- Se repicó el clon elegido en tubos falcon de 50 ml, con 3 ml de medio LB por 12 horas a 28 °C en presencia del antibiótico de selección.

- Se esterilizó un tubérculo de papa variedad spunta con hipoclorito de sodio 10 % y luego de sucesivos lavados con agua estéril cada 30 minutos durante dos horas, fue cortado en discos de aproximadamente 1 mm de espesor.

- Durante 5 minutos, se mantuvieron sumergidos los discos de papa dentro de una caja de petri con 20 ml del cultivo de *agrobacterium* crecido la noche anterior (previamente diluido 1:1000 en medio MS) y luego se los dejó bajo el flujo laminar con el fin de escurrir el exceso de líquido.

- Una vez secos, se dejaron los discos tratados en medio MS sólido durante 48 hs en oscuridad, para permitir que se produjera la infección del tejido.

- Al cabo de 48 hs se pasaron los discos infectados a frascos con medio MS sólido adicionado con zeatín ribósido, ácido indolacético, kanamicina y cefotaxime.

-Se repicaron en presencia de la presión de selección cada dos semanas hasta observar organogénesis.

- Una vez obtenidos brotes de aproximadamente 1 cm de altura, estos fueron cortados y pasados a frascos con el mismo medio, pero sin hormonas (zeatín ribósido y ácido indolacético), para probar la capacidad de crecimiento. De este modo también se logró la propagación de la línea.

8. Transformación de raíces de *M. truncatula* vía *Agrobacterium rhizogenes* (Hairy roots)

La region 3' específica de *MtCPK3* (300pb) fue subclonada en el vector pFRN9 utilizando la tecnología Gateway (Invitrogen). Se utilizaron los oligonucleótidos *MtCPK3-FOR* y *MtCPK3-REV*. Se utilizó un fragmento del gen *GUS* como control, amplificado utilizando los oligonucleótidos *GUS-FOR* y *GUS-REV* y clonado en el mismo vector. Ambas construcciones fueron utilizadas para transformar la cepa *A. rhizogenes* ARqua1.

Luego de la germinación de las semillas de *M. truncatula*, cuando las raíces tuvieron un largo aproximado de 10 mm se cortó la punta de la misma con un bisturí estéril. Estas raíces seccionadas fueron inoculadas pasándolas por *A. rhizogenes* y crecidas en placas de petri de forma vertical conteniendo medio Fahræus sólido en el cuarto de cultivo a 20°C durante aproximadamente una semana (16 horas de luz) para optimizar la frecuencia de transformación.

Luego fueron transferidas a un cuarto de cultivo a 25°C con iguales condiciones de fotoperíodo hasta la aparición de las “hairy roots” aproximadamente una semana más tarde.

Finalmente se inocularon estas raíces transgénicas con 10 ml de una suspensión de *S. meliloti* 2011 (D.O.₆₀₀ = 0,5) durante 45 minutos. La aparición de nódulos fue controlada durante 15 días.

9. Inoculación con bacterias simbióticas

Las cepas de *Sinorhizobium meliloti* 41, 2011 o 1021 fueron crecidas en medio TA (Orosz y col., 1973) a 30°C, centrifugadas a 3000 rpm y resuspendidas con 10 mM MgSO₄ hasta obtener una D.O.₆₀₀ = 0.8. El cultivo fue mezclado con agar 0,8% (en agua estéril) hasta una D.O.₆₀₀ = 0.4 y utilizado para inocular aproximadamente 2 cm de raíces excluyendo la región apical.

10. Tratamiento de *Medicago truncatula*

Luego de la germinación las plántulas de *M. truncatula* fueron crecidas durante 5 días en frascos de vidrio conteniendo medio líquido Fahræus. Después se adicionaron 10⁻⁷ or 10⁻⁸ M 6-benzyl-aminopurine (BAP) o 100 mM NaCl y se incubaron con agitación entre 15 minutos y 6 horas a 24°C. Alternativamente las plántulas fueron incubadas durante una hora a 4°C.

11. Análisis por Real Time qRT-PCR

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados utilizando el software “Light Cycler Probe Design” (Roche), teniendo alrededor del 95% de eficiencia. Se utilizó la mezcla de reacción “LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I” de acuerdo a las instrucciones del fabricante para el LightCycler Instrument.

Se realizaron qRT-PCR de al menos dos DNAs para cada punto analizado.

El gen *MtACTIN11* fue utilizado para normalizar las mediciones en cada muestra.

12. Estudios de localización de MsCPK3. Transformación transitoria de células de cebolla

Se realizaron fusiones carboxi-terminales de MsCPK3 o versiones mutadas de la misma a la proteína verde fluorescente. (GFP). En todos los casos se utilizó como vector el plásmido pK100 que posee una duplicación del promotor 35S y la secuencia codificante de la GFP. Los clonados fueron realizados por PCR utilizando la enzima Pfu y los oligonucleótidos detallados en la sección 5.9.

De este modo se obtuvieron dos construcciones: MsCPK3-GFP y Myr/Pal-MsCPK3-GFP. Los ADNs correspondientes a dichas construcciones fueron transferidos a células epidérmicas de cebolla (*Allium cepa*) de acuerdo a lo reportado por Scott y col. (1999) utilizando un cañón de partículas biolístico (PDS-1000/HeTM) de BioRad. Se realizaron tres bombardeos por construcción y se analizaron aproximadamente 15-20 células en cada experimento individual. Luego del bombardeo, las secciones de cebolla se incubaron 12-24 h en oscuridad total, en placas de petri conteniendo un papel Whatman embemido en agua para generar una atmósfera húmeda.

El análisis de las células transformadas se realizó utilizando un microscopio láser confocal (Leica DM RXA2). La fluorescencia de la GFP se detectó con un filtro de 488 nm (pico de excitación de un laser de Krypton-Argon). Para cada célula se obtuvieron 20-30 secciones focales de aproximadamente 1 μm cada una a lo largo del eje Z.

13. Tratamiento con fosfatasa

Se incubaron las fracciones solubles de los extractos proteicos de raíces (90 μg) con 100 unidades de Fosfatasa Alcalina de Intestino de Ternero (CIAP – Invitrogen) durante 15 minutos a 37 °C en el buffer de reacción que contiene 100 mM de Tris-HCl pH 9.5, 50 mM MgCl₂ y 100 mM NaCl.

La reacción se detuvo con el agregado de buffer de siembra (glicerol 10% v/v, DTT 1.5% p/v, SDS 2% p/v, Tris-HCl pH 6.8 0,08 M y azul de bromofenol 0,001% p/v), hervida durante 5 minutos y sembrada en un gel de poliacrilamida. Luego de la electroforesis las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y se realizó un ensayo de Western blot.

14. Inmunolocalización

Las muestras fueron fijadas con 4% paraformaldehído en buffer fosfato 0,05 M pH 7.0 durante toda la noche a 4 °C. El volumen debe ser 10 veces el volumen de la muestra.

Al otro día se lavaron las muestras tres veces con buffer fosfato durante 30 minutos cada vez. Luego se deshidrataron incubando durante 15 minutos cada vez en etanol 40%, 50%, 60% y 70%.

Las muestras así fijadas se guardaron en etanol 70% a 4 °C hasta su utilización.

Se realizaron cortes mediante un micrótomo y se fijaron a portaobjetos de vidrio.

Las muestras se rehidrataron durante 10 minutos con TBS-Tw y se bloquearon utilizando 5% suero normal de burro en TBS-Tw durante 2 horas.

Se lavaron 3 veces con TBS-Tw, 5 minutos cada vez.

Luego se incubaron durante 2 horas con una dilución 1:100 del anticuerpo anti-StCDPK1 y se lavaron 3 veces con TBS-Tw, 5 minutos cada vez.

Finalmente se incubaron durante 1 hora con una dilución 1:100 del anticuerpo anti-rabbit conjugado con el fluoróforo Cy3 (Jackson Lab.), de aquí en adelante se realiza todo en oscuridad para impedir la excitación accidental del fluoróforo. Se lavaron 3 veces como se indicó más arriba y se enjuagaron con agua hexadestilada y se dejaron secar totalmente.

Se agregó Mowiol 4-88, se cubrieron los cortes con un cubreobjeto y se incubaron en oscuridad durante toda la noche a temperatura ambiente.

Las muestras fueron examinadas con un microscopio de epifluorescencia Leica DM LB equipado con una lámpara de mercurio de alta presión de 50-W (Wetzlar, Alemania) y filtros adecuados para Cy3. Las imágenes fueron adquiridas con una cámara CCD.

RESULTADOS

1 – Obtención del clon genómico para StCDPK1

Como se mencionó en la introducción de esta tesis se disponía de la secuencia codificante de *StCDPK1* con la que se procedió a obtener el clon genómico de esta isoforma para estudiar su estructura y localización cromosómica. En un futuro se utilizarán estos datos para obtener la secuencia correspondiente a la región promotora que regula la expresión de *StCDPK1*.

Objetivos particulares:

- 1 - Obtener la secuencia genómica correspondiente a *StCDPK1*.
- 2 - Estudiar la estructura genómica de *StCDPK1*.
- 3 - Determinar la localización cromosómica de *StCDPK1*.

1.1 – Obtención de la secuencia genómica de StCDPK1

1.1.1 – Rastreo de una biblioteca genómica

Se utilizó una biblioteca genómica de papa *Solanum tuberosum* var. Desiree preparada por la empresa Clontech Laboratories, Inc.

Primeramente se tituló la biblioteca utilizando diferentes diluciones de la biblioteca original (10^{-2} - 10^{-8}) y se determinó que contenía aproximadamente unas $1,15 \times 10^6$ unidades formadoras de placas (pfu) por microlitro de biblioteca madre.

Para el rastreo primario se utilizaron seis placas de Petri grandes (0,137 m de diámetro) y para cada placa unas 30.000 pfu. Como sonda se empleó la secuencia completa codificante para *StCDPK1*. De este rastreo se obtuvieron en total unos diecinueve clones que se seleccionaron levantando el agar de las placas con una punta azul estéril y se guardó a 4°C.

Se realizó el rastreo secundario para cada clon seleccionado ahora utilizando placas de Petri pequeñas, obteniéndose unos nueve clones que volvieron a dar positivos. De estos nueve clones se realizó un rastreo terciario y en esta ocasión sólo se obtuvo como positivo la placa número cuatro. De esta placa se seleccionaron dos clones (4.1.a y 4.1.b) los cuales fueron amplificados para así obtener mayor

diseñados a partir de las secuencias no codificantes que se iban obteniendo en este proceso. El armado de la secuencia genómica se realizó utilizando programas de alineamiento local (BLAST) utilizando bases de datos del NCBI - National Center for Biotechnology Information y la secuencia codificante de *StCDPK1*.

Se determinó que dicho clon 4.1.b se encontraba incompleto, abarcando la región 3' que va desde el intrón número 3 (de aproximadamente 2300 pb), anterior al Dominio Bisagra, hasta el último sitio de unión a calcio (EF-hand) que esta partido por un intrón (Figura 2).

Se realizaron nuevos rastreos de la biblioteca genómica intentando obtener el extremo 5' de la secuencia genómica, y también se volvió a rastrear los clones del rastreo secundario que no habían dado positivo previamente, pero los resultados fueron negativos.

1.1.2 – Obtención de la secuencia genómica completa

Para obtener la secuencia genómica faltante de *StCDPK1* se utilizó la información de la secuencia codificante de *StCDPK1* (Raíces y col. 2001) y la secuencia incompleta del clon 4.1.b para diseñar oligonucleótidos específicos.

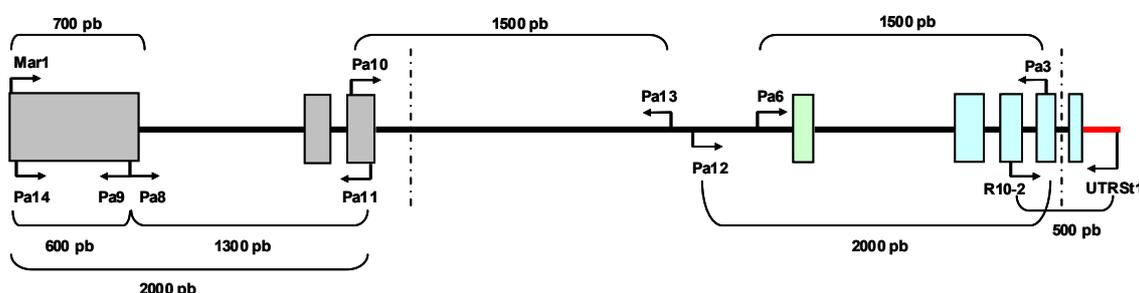


Figura 3 - Estrategia de PCRs para amplificar el gen de *StCDPK1*.

Se indican los oligonucleótidos utilizados y el tamaño aproximado del producto de amplificación obtenido. La línea roja corresponde a la región 3'UTR. Las líneas punteadas señalan la secuencia del clon obtenido en el rastreo de la biblioteca genómica.

Se desarrollaron PCRs utilizando como templado ADN genómico de plantas de papa *Solanum tuberosum* var. Spunta. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa (Figura 4) y aquellos con el tamaño esperado fueron clonados en el vector pGEM-Teasy (Promega) y secuenciados.

Con todas las secuencias se armó el clon genómico completo mediante homología utilizando programas del NCBI. La identificación de las secuencias intrónicas se confirmó mediante la utilización de programas de computadora que determinan los sitios dadores y aceptores del splicing.

El gen *Stcdpk1* abarca 5950 pares de bases desde el codón iniciador (ATG) hasta el terminador (TAA) presentando ocho exones y siete intrones (Figura 5).

El exón 1 contiene la región amino terminal variable y los subdominios quinasa I a VII inclusive, el exón 2 contiene los subdominios quinasa VIII y IX, y el exón 3 el subdominio quinasa XI. En el exón 4 se encuentra casi todo el dominio autoinhibidor, y los cuatro sitios de unión al calcio (EF hand) se encuentran distribuidos en los exones 5, 6, 7 y 8 respectivamente.

1.2 – Estructura genómica de StCDPK1

Utilizando la secuencia aminoacídica de StCDPK1 se realizó una búsqueda de homologías en base de datos y se seleccionaron aquellas secuencias provenientes de arroz (*Oryza sativa*) y *Arabidopsis thaliana* debido a que sus respectivos genomas se encuentran completamente secuenciados.

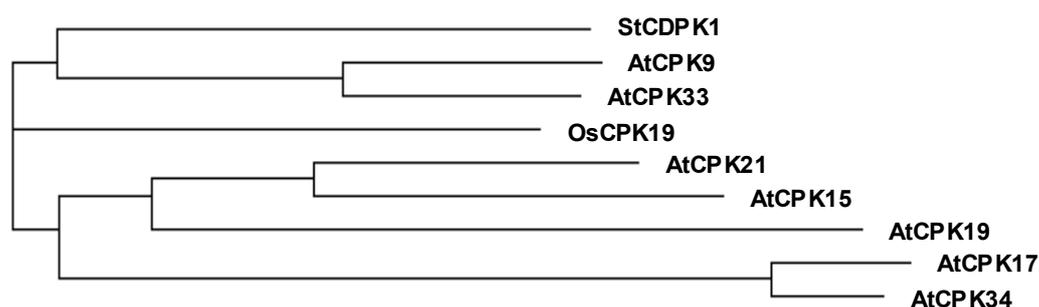


Figura 6 – Árbol filogenético de CDPKs.

Análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas de CDPKs de arroz y *A. thaliana* con mayor homología a StCDPK1.

Se obtuvo la secuencia genómica de cada una de estas secuencias que presentan más homología con StCDPK1, AtCPK9 80% (377/466), AtCPK33 78% (372/474), OsCPK19 79% (368/463), AtCPK21 74% (367/493), AtCPK15 74% (353/474), AtCPK19 68% (324/476), AtCPK17 67% (328/488), AtCPK34 69% (327/473), y se analizaron algunas características de su estructura genómica.

Además de poseer los dominios característicos que las definen como Quinasas de Proteínas Dependientes de Calcio, las CDPKs comparadas tienen un peso molecular similar (asociado al número de aminoácidos que las componen) y en la mayoría se encontró el motivo de miristoilación vinculado con su asociación a membranas (Tabla 1).

CDPK	Cromosoma	Aminoácidos	PM (kDa)	Motivo miristoilación	Exones	Intrones
StCDPK1	12	532	59,9	Si	8	7
AtCPK9	3	542	60,4	Si	8	7
AtCPK33	1	522	58,6	Si	8	7
OsCPK19	7	533	59,5	No	8	7
AtCPK21	4	532	59,9	Si	8	7
AtCPK15	4	555	62,6	Si	8	7
AtCPK19	1	552	62,9	No	9	8
AtCPK17	5	529	58,5	Si	7	6
AtCPK34	5	524	58,2	Si	7	6

Tabla 1 – Comparación de StCDPK1 y diferentes CDPKs de *A. thaliana* y *O. sativa*

Se indica la localización cromosómica, el número de aminoácidos, su peso molecular, si posee sitio consenso de miristoilación y el número de exones e intrones para cada CDPK.

En análisis filogenéticos realizados, se ha comparado la posición de los intrones para determinar relaciones evolutivas entre familias de proteínas (Asano y col. 2005). Entre las CDPKs comparadas en la Tabla 2, el número de exones varía entre 7 y 9, siendo en su mayoría ocho los presentes. Es interesante destacar que se ha conservado la posición de los intrones en aquellas CDPKs que presentan 8 exones. A excepción del primer exón que incluye al dominio N-terminal variable, el tamaño (en pares de bases) de los exones 2 a 7 esta conservado, (indicado por los recuadros rojos en la Tabla 2). Estos exones se corresponden con los exones 3 a 8 de AtCPK19 ya que este gen incorporó un intrón que partió el exón 1 original. Por otro lado, los genes AtCPK17 y AtCPK34 presentan sólo 7 exones (están ausentes los intrones entre los exones 1 y 2 y entre los exones 6 y 7 respectivamente), pero conservan una organización genómica similar a las otras CDPKs analizadas.

	StCDPK1	AtCPK9	AtCPK33	OsCPK19	AtCPK21	AtCPK15	AtCPK19	AtCPK17	AtCPK34
Largo ATG-Stop (pb)	5950	2907	2158	3750	3288	2821	2514	2561	2053
Ex 1	715	923	682	718	831	809	414	794	811
Ex 2	144	143	143	144	143	143	345	143	152
Ex 3	153	152	152	153	152	152	143	152	115
Ex 4	116	115	115	113	112	112	152	115	167
Ex 5	168	167	167	168	167	167	115	167	127
Ex 6	128	127	127	127	127	127	167	127	99
Ex 7	100	99	99	100	99	99	127	468	95
Ex 8	73	377	74	78	445	343	99	x	x
Ex 9	x	x	x	x	x	x	91	x	x
In 1	918	253	72	1484	453	360	123	125	85
In 2	97	90	100	109	80	84	244	103	73
In 3	→ 2301	110	92	84	231	97	80	76	92
In 4	→ 779	84	80	70	157	80	80	81	81
In 5	97	77	77	87	82	81	79	110	75
In 6	82	96	94	227	128	81	73	100	81
In 7	79	94	84	88	81	86	80	x	x
In 8	x	x	x	x	x	x	102	x	x

Tabla 2 – Comparación del tamaño de los exones e intrones entre diferentes CDPKs.

Se detalla el largo total de cada secuencia genómica y de cada exón e intrón.

En recuadro rojo se marcan los exones con un tamaño igual o similar de algunas de las CDPKs descritas, el recuadro rojo pequeño indica un desplazamiento de los exones de tamaño conservados en AtCPK19. Los recuadros verdes indican las CDPKs AtCPK17 donde falta el exón de 99pb y AtCPK34 donde falta el exón de 143pb.

Las flechas negras señalan los intrones 3 y 4 de StCDPK1.

Las CDPKs de arroz y Arabidopsis han sido clasificadas en 4 grupos filogenéticos (I-IV) de acuerdo a su secuencia aminoacídica (Asano y col., 2005). Las CDPKs analizadas en esta comparación, que presentan 8 exones / 7 intrones

pertencen al grupo II-a. En base a su secuencia y a la organización del gen podría clasificarse a StCDPK1 dentro de este grupo. A diferencia, las dos isoformas de CDPK (AtCPK17 y AtCPK34) que pertenecen al grupo II-b están más alejadas de StCDPK1, tanto en homología de secuencia como en su estructura génica.

Las mayores diferencias en la secuencia codificante de las CDPKs se encuentran en el dominio aminoterminal variable (incluido en el primer exón) y el dominio carboxiterminal (incluido en el último exón), es por ello que en estos exones se registran las mayores diferencias. Por ejemplo, en cuatro CDPKs de Arabidopsis (AtCPK9, AtCPK21, AtCPK15 y AtCPK17) el tamaño del último exón es unas cinco veces mayor que los demás exones finales.

En la Figura 7 se puede apreciar gráficamente el tamaño proporcional de los exones y los intrones. Aquellos similares están unidos por líneas para su más fácil interpretación.

Se destaca la enorme diferencia de tamaño en el intrón 3 de StCDPK1, entre 10 y 30 veces superior a los intrones 3 de las demás CDPKs comparadas.

El intrón 1 de 918 pb en StCDPK1 también es entre 2 y 12 veces superior en tamaño que los demás intrones 1, a excepción de OsCPK19 que es de 1484 pb. Asimismo, el intrón número 4 de StCDPK1 es entre 5 y 11 veces superior a las demás CDPKs estudiadas con 779 pb.

Los demás intrones son similares en tamaño en todas las CDPKs.

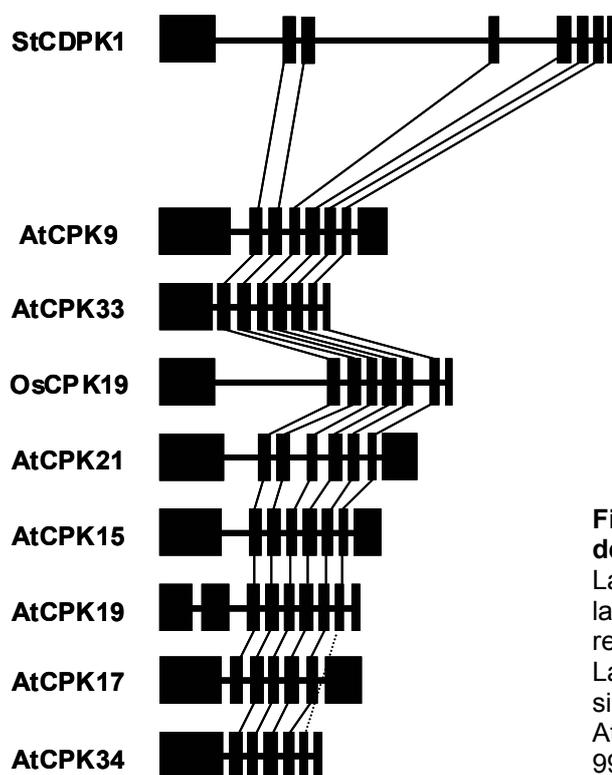


Figura 7 – Representación esquemática de genes de CDPK.

Las cajas negras representan los exones y las barras los intrones, ambos representados en escala.

Las líneas unen aquellos exones que son similares en largo, la línea punteada une AtCPK19 y AtCPK34 ya que el exón de 99pb no se encuentra en AtCPK17.

1.3 – Localización cromosómica de *StCDPK1*

Obtenida la secuencia completa del gen *StCDPK1* se quiso identificar la localización del mismo en el genoma de *Solanum tuberosum*.

Este proyecto se realizó en colaboración con el laboratorio del Dr. Sergio Feingold en el INTA-Balcarce. Se utilizó la técnica de Polimorfismo Conformacional de Simple Hebra (SSCP - Single Strand Conformation Polymorphism), en la cual se utilizaron oligonucleótidos específicos de las regiones exónicas e intrónicas en cuatro combinaciones diferentes.

Las amplificaciones por PCR se realizaron utilizando 2 genotipos de papa como templado (M200-30 y H11-9), que son progenitores de una población segregante (retrocruza) de *S. tuberosum* x *S. bethaultii* (Bonierbale y col., 1994) y que fue recientemente usada para localización genética de marcadores de microsatélites derivados de ESTs (Feingold y col. 2005).

Se utilizó para la amplificación un perfil “touch-down” que consistió en temperaturas de hibridación entre 60°C y 54°C durante los primeros 12 ciclos con un decrecimiento de 0,5°C por ciclo y 23 ciclos adicionales a 54°C. Los productos de PCR fueron desnaturalizados en formamida para obtener hebras simples de ADN y se sometieron a electroforesis parcialmente nativa en geles de 5% poliácridamida MDE (Cambrex, USA), corriéndose a 5 Watts durante 16 horas y se visualizaron mediante tinción con plata (Figura 8).

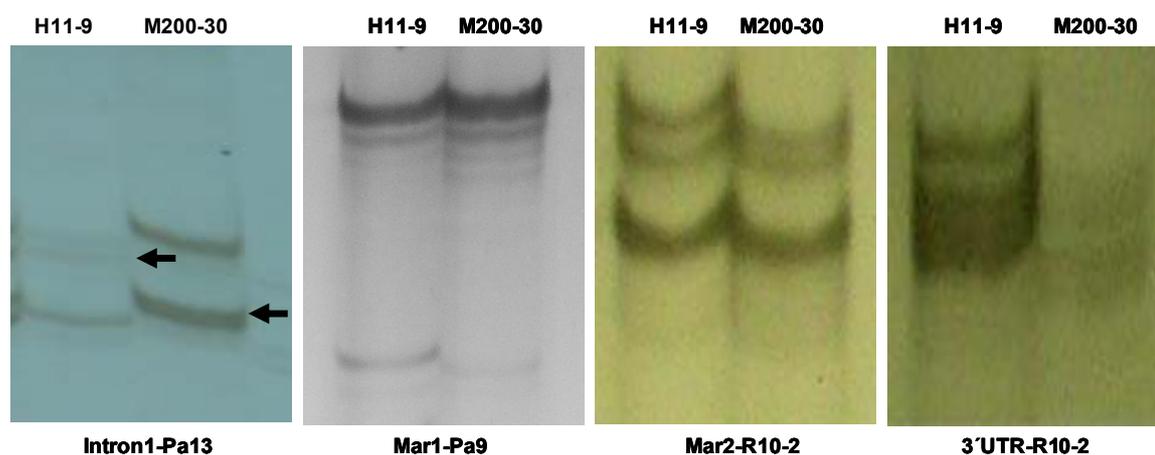


Figura 8 - Polimorfismo Conformacional de Simple Hebra (SSCP)

Se observan los productos de PCR obtenidos de la combinación entre cuatro pares de primers específicos para *StCDPK1* tanto de los intrones como exones, utilizando como templado dos genotipos de plantas de papa (M200-30 y H119). Las bandas mapeadas se indican con flechas.

Mediante esta técnica los productos amplificados migran en el campo eléctrico como hebras simples, cuya conformación es dependiente de su secuencia. Los patrones de bandas distintos observados en los geles de poliacrilamida indican diferencias en la secuencia nucleotídica de los fragmentos amplificados.

La existencia de estas variaciones permitió la localización genética en un mapa marco (Feingold et al., 2005) a través de la determinación de la segregación del patrón del amplicon Intron1-Pa13 en 31 individuos de la población BCT (Bonierbale et al., 1994) seleccionados mediante el programa MapPop v1.0 (Vision y col., 2000) como el subgrupo de mayor información. La localización se realizó mediante la co-segregación con marcadores previamente asignados a los diferentes cromosomas, utilizando el programa "Mapmanager QTX" (www.mapmanager.org).

La posición más probable de StCDPK1 es en el extremo distal "inferior" del cromosoma 12. La segregación de dos bandas correspondientes cada una a uno de los progenitores permitió la localización de StCDPK1 en ambos mapas de ligamiento.

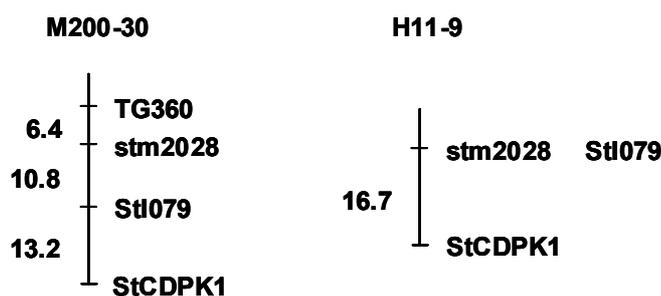


Figura 9 - Mapa de ligamiento de M200-30 y H11-9

Porción distal inferior del cromosoma 12. Se indican las distancias entre marcadores en cM.

En el caso del mapa de M200-30 el gen StCDPK1 se localizó a 13.2 cM del marcador StI079 con un LOD score de 4.2. Concordantemente, en el mapa de H11-9 se localizó en el mismo lugar a 16.7cM de StI079 con un LOD score de 3.4 (Figura 9).

StI079 es un microsatélite que se encuentra ligado a 10,8 cM de STM2028 (otro microsatélite publicado por Milbourne y col., 1998) en el mapa de M200-30 y totalmente ligado en el mapa de H11-9.

Si bien los valores de verosimilitud (LOD scores) son suficientemente altos, la localización en la misma posición en los dos mapas (son eventos independientes) refuerza la probabilidad de que el extremo inferior del cromosoma 12 sea la ubicación real del gen. De todos modos, la ubicación exacta con fines de mapeo

posicional debería ser realizada en un mapa de alta densidad con un número sensiblemente mayor que el aquí utilizado.

El hecho de que se haya amplificado una región intrónica, permite asegurar que se amplificó (y localizó) el gen en cuestión y no alguna otra CDPK (en TIGR hay 9 TCs de CDPKs, aunque 2 son posiblemente formas de “splicing” alternativo, i.e. TC114281 y TC114282).

2 - Producción de un anticuerpo policlonal que reconozca StCDPK1

Hasta el momento en nuestro laboratorio se utilizaban anticuerpos policlonales anti-CDPK proporcionados por la Dra. Alice Harmon (Department of Botany, University of Florida) los cuales están dirigidos contra el dominio regulatorio semejante a la calmodulina de la CDPK α de soja. Dado que el mismo reconocía varias isoformas de CDPK en diferentes organismos debido a lo conservado de este dominio, se quiso obtener un anticuerpo que reconozca específicamente a StCDPK1.

Objetivos particulares:

- 1- Obtener un anticuerpo policlonal que reconozca específicamente StCDPK1.
- 2- Detección de StCDPK1 en extractos de papa por Western blot.
- 3- Inmunolocalización de StCDPK1 en cortes histológicos.

2.1 – Obtención del anticuerpo policlonal anti-StCDPK1

2.1.1 – Clonado de la región amino terminal de StCDPK1

Con el objetivo de producir un anticuerpo que reconozca específicamente StCDPK1 se procedió a clonar la región amino terminal de este gen dado que es la porción que presenta más variabilidad entre las CDPKs descriptas.

Esta zona abarcó desde la misma región amino terminal variable hasta el subdominio V de la región catalítica inclusive (Figura 10).



Figura 10 – Esquema de StCDPK1.

Se señalan los oligonucleótidos específicos utilizados y la región de StCDPK1 amplificada.

La secuencia de interés (634 pb) se amplificó usando como templado el clon completo de StCDPK1 y dos oligonucleótidos específicos que poseían en sus extremos sitios de corte para enzimas de restricción (BamHI y XhoI). El producto de la reacción de PCR se digirió con ambas enzimas y se introdujo en el vector de expresión pET22b(+) diseñado para agregar un “tag” (etiquetado) de seis histidinas a las secuencias clonadas.

En el esquema se observan las características del vector de expresión utilizado y el fragmento de *StCDPK1* insertado en la orientación que deja el “tag” de histidinas en su sitio carboxilo terminal (Figura 11).

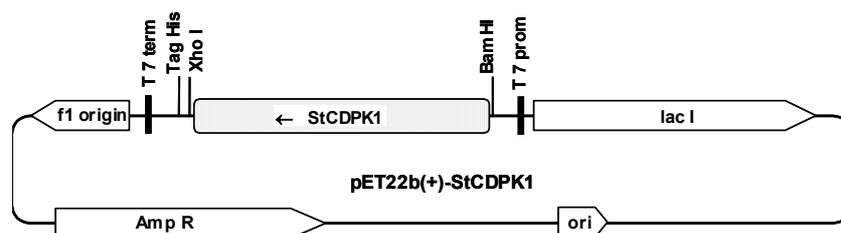


Figura 11 – Esquema del vector de expresión pET22b(+)-StCDPK1.
Se indica la región del gen de StCDPK1 clonado en los sitios de restricción XhoI y BamHI.

2.1.2 – Expresión de StCDPK1 recombinante en bacterias

El plásmido pET22-StCDPK1 se usó para transformar bacterias BL21pLysS. Se determinó experimentalmente las condiciones de tiempo y temperatura que dieran la mejor expresión de la proteína recombinante StCDPK1-6xhis.

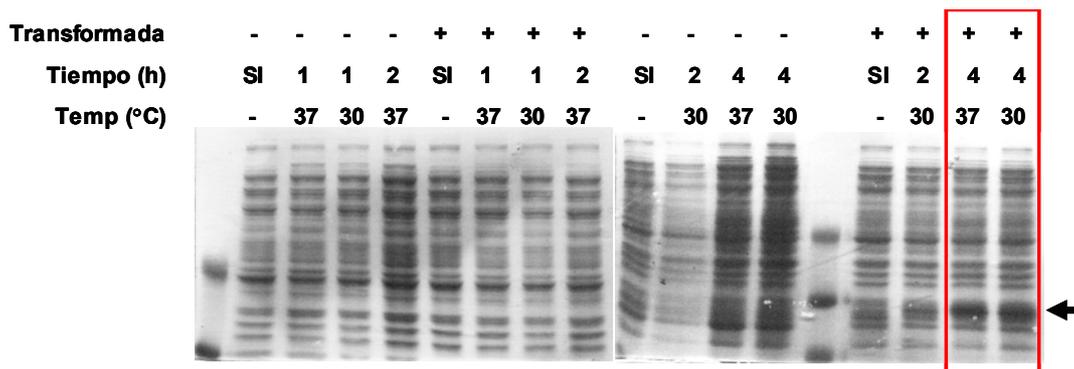


Figura 12 – Determinación de las condiciones óptimas para la expresión.
Se indican las diferentes condiciones analizadas. El recuadro rojo indica las condiciones óptimas de cultivo. Con una flecha se indica la posición de la proteína expresada. (SI: Sin Inducir)

La proteína recombinante se expresó induciendo el cultivo con 1 mM de IPTG durante 4 horas a 30°C. Se procedió a la ruptura del cultivo en buffer de lisis

nativo y posterior ultrasonido. La proteína recombinante se detectó tanto en la fracción soluble como en la particulada (Figura 13).

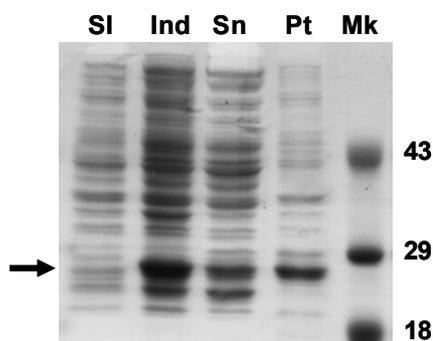


Figura 13 – Determinación de la expresión de la proteína recombinante.

Una alícuota (30 μ l SI e Ind, y 10 μ l Sn y Pt) de cada cultivo fue sembrada en un gel de poliacrilamida y teñido con Coomassie blue. (SI: Sin Inducir, Ind: Inducido, Sn: Sobrenadante, Pt: Particulado). La flecha indica la posición de la proteína recombinante.

2.1.3 – Purificación de la proteína recombinante StCDPK1-His6x

Se purificó la proteína StCDPK1-His6x a partir de la fracción particulada utilizando una resina de níquel (Ni-NitriloTriAcético). La fracción particulada se resuspendió en buffer B conteniendo 8M urea y se sembró en la columna de níquel. Luego de lavar, la proteína se eluyó secuencialmente con los buffers D y E descritos en Materiales y Métodos. Las diferentes fracciones se sembraron en un gel de poliacrilamida para determinar dónde se encontraba la proteína (Figura 14).

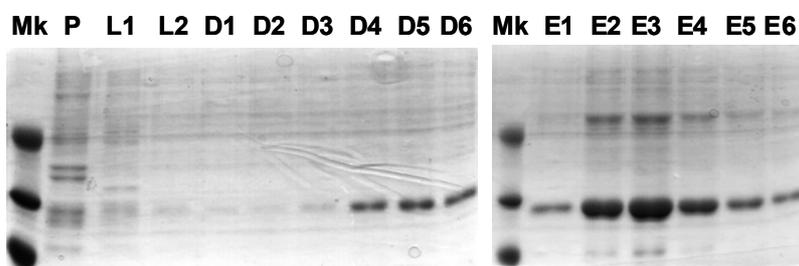


Figura 14 – Purificación de la proteína recombinante mediante una columna de níquel.

Alícuotas (50 μ l) de las distintas fracciones fueron sembradas en un gel de poliacrilamida. (P: Percolado, L: Lavado, D: Eluído con buffer D, E: Eluído con buffer E)

Los distintos eluídos se agruparon en A: D4, D5, D6 y E1; B: E2, E3 y E4 y C: E5 y E6; de acuerdo a la cantidad de proteína observada en el gel.

2.1.4 – Producción de anticuerpos policlonales anti-StCDPK1 en conejos

Para la producción de anticuerpos policlonales se inyectaron dos conejos por vía subcutánea con dos dosis de 0,8 y 0,7 mg de proteína recombinante purificada mezclada con el adyuvante de Freund completo. A los 50 días se realizó la punción a blanco obteniéndose unos 70 ml de suero aproximadamente.

Una alícuota (5 ml) del suero fue purificado por columna de Sepharose CL4B – Proteína A o mediante las columnas HiTrap Proteína G HP (Amersham). Los eluidos obtenidos de estas columnas fueron dializados toda la noche en PBS 1X pH 7,2 a 4°C.

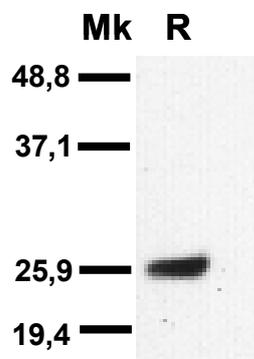


Figura 15 – Western blot de la proteína recombinante. Se sembró 100 ng de proteína recombinante StCDPK1 (R) y se reveló utilizando el anticuerpo policlonal purificado en una dilución 1:400.

Se confirmó que el antisuero obtenido reconoce la proteína recombinante mediante un ensayo de Western blot. Se sembró 100 ng de la proteína recombinante en un gel de poliacrilamida al 12% y luego se incubó con una dilución 1:400 del anticuerpo policlonal purificado con proteína A. El revelado dio una única banda de peso molecular esperado (Figura 15).

2.2 - Detección de StCDPK1 en extractos de papa

2.2.1 – Ensayo de Western blot

Para determinar la especificidad del anticuerpo generado en la detección de la isoforma StCDPK1 se procedió a realizar un ensayo de Western blot.

Se extrajo proteínas totales de diferentes estadíos de tuberización de plantas crecidas en invernadero, desde estadíos tempranos poco inducidos hasta estadíos maduros del desarrollo del tubérculo.

Cada extracto fue centrifugado para separar la fracción particulada (Pt) de la soluble (Sn) y se sembraron ambas fracciones en un gel de poliacrilamida que se transfirió posteriormente a una membrana de nitrocelulosa.

Para el ensayo se utilizó una dilución 1:400 del anticuerpo policlonal anti-StCDPK1 purificado.

Se observó la presencia una banda en las fracciones solubles y de dos bandas muy intensas en las fracciones particuladas (Figura 16). En ambos casos la intensidad de las bandas aumenta en los estadíos más avanzados de tuberización

(E3 y E4) lo que concuerda con los datos de expresión de esta isoforma (Raices y col., 2001).

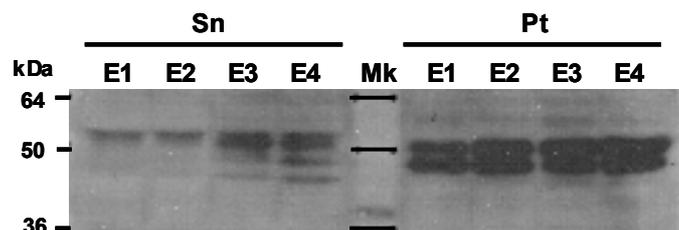


Figura 16 – Western blot de estadios de tuberización.

Se sembraron alícuotas de extractos proteicos solubles (Sn) y particulados (Pt) de estadios de tuberización (100 μ g y 50 μ g respectivamente) en un gel de poliacrilamida al 12%.

Se incubó con el anticuerpo anti-StCDPK1 purificado (1:400).

E1 a E4 corresponden a diferentes estadios con signos progresivos de tuberización.

Las bandas de menor PM observadas en las fracciones solubles de los estadios E3 y E4 son posiblemente productos de degradación de StCDPK1. La mayor intensidad de las bandas presentes en la fracción particulada (junto al hecho de que se sembró menos proteína total) sugiere que esta isoforma se encuentra mayoritariamente asociada a membrana. La presencia de dos bandas en esta fracción puede deberse a que este anticuerpo pueda detectar dos isoformas muy relacionadas o a que StCDPK1 sufra una modificación post-traduccional como ser la fosforilación. Datos previos del laboratorio indican que una CDPK de papa purificada a homogeneidad es capaz de autofosforilarse (MacIntosh y col, 1996). No podría descartarse que la presencia de dos bandas se deba al método de extracción utilizado ya que cuando se extrajeron proteínas totales en condiciones desnaturalizantes (1% SDS) se detectó la presencia de una única banda (Figura 17).

StCDPK1 se expresa principalmente en estolones inducidos (Raices y col, 2001). Sin embargo, se observó inducción de la expresión de *StCDPK1* en plantas cultivadas *in vitro* en presencia de alta sacarosa (8%) bajo luz continua (Raices y col, 2003b). Se quiso estudiar el efecto de la sacarosa para ver si ese aumento en la expresión se reflejaba en la abundancia de la proteína (Figura 17).

Entrenudos de plantas de papa crecidas *in vitro* durante 45 días fueron pasados a medio MS suplementado con diferentes concentraciones de sacarosa, desde condiciones de multiplicación (2% de sacarosa) hasta condiciones inductoras de tuberización (8% de sacarosa). Se cultivaron en oscuridad total a una temperatura controlada de 20 °C durante 8 días. Los estadios obtenidos fueron cosechados y se extrajeron las proteínas totales según se indica en Materiales y Métodos. En el caso del tratamiento con 8% sacarosa, los estadios obtenidos se separaron en aquellos que se encontraron inducidos a tuberizar (8% I = Inducidos) y aquellos que aún no habían sido inducidos (8% SI = Sin Inducir).

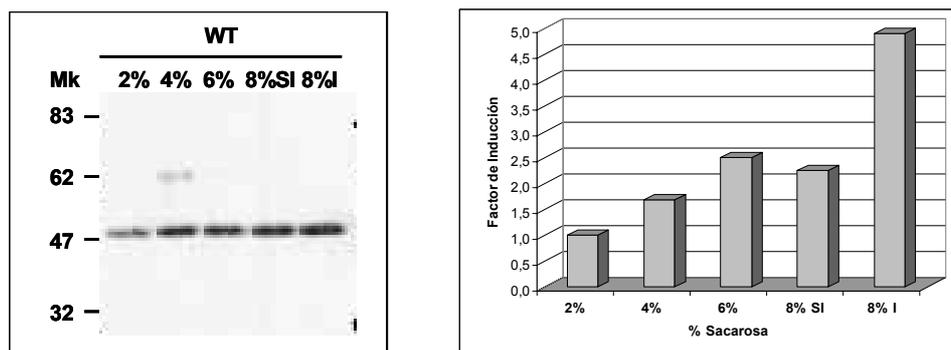


Figura 17 – Western blot para StCDPK1 en plantas salvajes (WT) a diferentes concentraciones de sacarosa.

Se indican los diferentes porcentajes de sacarosa utilizados (SI: Sin Inducir, I: Inducido).

El gráfico indica la cuantificación de las bandas como factor de inducción respecto a la intensidad obtenida en condiciones de multiplicación (2% sacarosa).

Se sembraron 50 μ g de cada condición en un gel 12% de poliacrilamida y luego de su transferencia a una membrana de nitrocelulosa se realizó un ensayo de Western blot utilizando el anticuerpo anti-StCDPK1 en una dilución 1:400.

Luego del revelado se cuantificaron las bandas obtenidas utilizando el programa ImageQuant (Molecular Dynamics) y se graficaron.

Se encontró que la sacarosa es capaz de inducir un aumento de StCDPK1 en las concentraciones estudiadas, siendo de casi cinco veces mayor la cantidad de proteína detectada en los estadíos inducidos a tuberizar (8% I), lo cual concuerda con datos de expresión a nivel de ARNm (Raíces y col., 2001).

2.3 - Inmunolocalización de StCDPK1

2.3.1 – Inmunolocalización en cortes histológicos de *Solanum tuberosum*

Se utilizaron como muestra estadíos de plantas de *S. tuberosum* que ya presentaban características de inducción a tuberizar para determinar si el anticuerpo obtenido podía ser utilizado para inmunolocalizar StCDPK1. Las secciones obtenidas de estos estadíos fueron bloqueadas con 5% de suero normal de burro y se las incubó con el anticuerpo específico anti-StCDPK1 o con el suero preinmune como se indica en Materiales y Métodos.

Luego de la incubación con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con el fluorocromo Cy3 se observaron las muestras en un microscopio de

epifluorescencia Leica DM LB equipado con una lámpara de mercurio de alta presión de 50-W (Wetzlar, Alemania) y filtros adecuados para Cy3. Las imágenes fueron adquiridas con una cámara CCD.

En la figura 18 se muestran fotos de dos cortes incubados con el suero preinmune (1:100) o con el anticuerpo específico anti-StCDPK1 (1:100) respectivamente.

Se observó una localización en la periferia de todas las células, siendo la señal más intensa en aquellas células externas del súber y la felodermis.

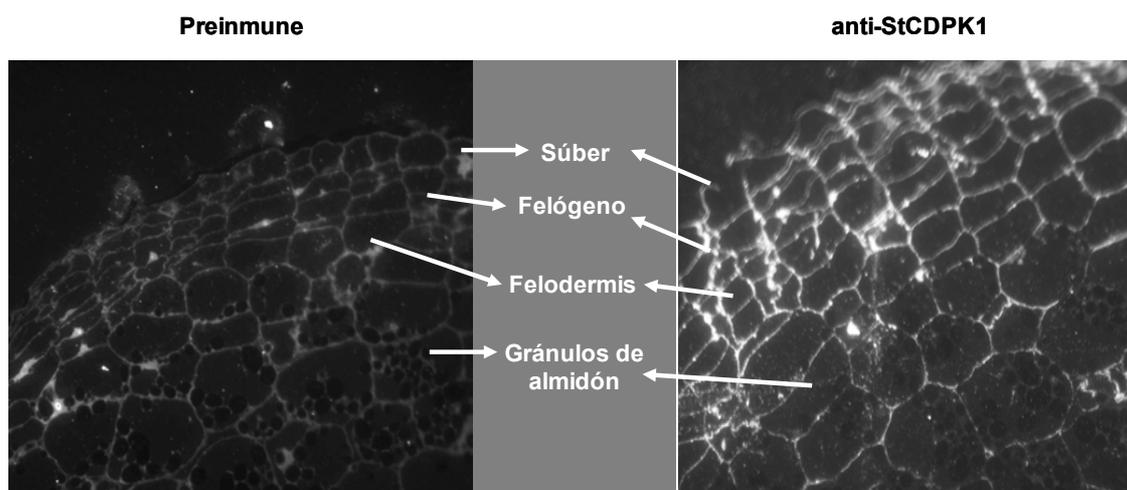


Figura 18 – Inmunolocalización de StCDPK1.

Se muestran dos cortes de estadios de plantas de papa inducidos a tuberizar.

Se señalan las diferentes secciones y los gránulos de almidón que confirman que estos estadios va estaban diferenciados a tuberizar.

Aunque la señal encontrada pareciera indicar una localización asociada a membrana plasmática, lo cual estaría confirmando datos de ensayos de expresión transitoria (Raices y col, 2003a), la distribución periférica del citoplasma en estas células y la capacidad de resolución del microscopio no permiten descartar una localización citoplasmática de StCDPK1.

3 - Obtención de plantas transgénicas para StCDPK1

El desarrollo de plantas transgénicas es una herramienta importante utilizada para estudiar la participación de genes en distintos procesos. Como otra estrategia para estudiar el rol de StCDPK1 durante el proceso de tuberización se desarrolló plantas transgénicas de papa que posean una expresión aumentada o disminuida de esta isoforma.

Objetivos particulares:

1 - Obtener plantas de papa (*Solanum tuberosum*) que posean una expresión de StCDPK1 aumentada o disminuida.

2 - Analizar plantas con expresión alterada de StCDPK1 en diferentes condiciones de tuberización.

3.1 – Construcciones

3.1.1 – Estrategias de clonado

Se diseñaron oligonucleótidos específicos de StCDPK1 para amplificar toda la secuencia o sólo la región amino terminal de la misma (Figura 19).

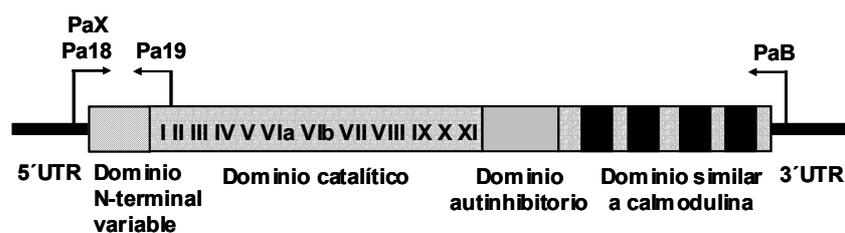


Figura 19 – Esquema de StCDPK1.

Se señalan los oligonucleótidos específicos utilizados y la región de StCDPK1 amplificada.

Se utilizaron dos vectores binarios:

pCB201: que se expresa constitutivamente porque posee el promotor 35S derivado del cauliflower mosaic virus (CaMV).

pGUT: que se expresa exclusivamente en tubérculo ya que posee el promotor de GBSS (Granule Bound Starch Synthase).

A partir de los oligonucleótidos PaX y PaB se obtuvo el ADNc correspondiente a StCDPK1 desde el ATG hasta el codón de terminación (TAA). Dicha secuencia se subclonó en el vector pGEM T-easy (Promega) del que fue

luego liberada por digestión con las enzimas de restricción XbaI y SacI. El fragmento ($\cong 1700$ pb) así obtenido fue subclonado en orientación sentido en el vector pCB201 bajo el promotor 35S.

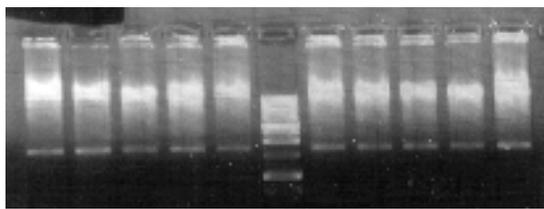
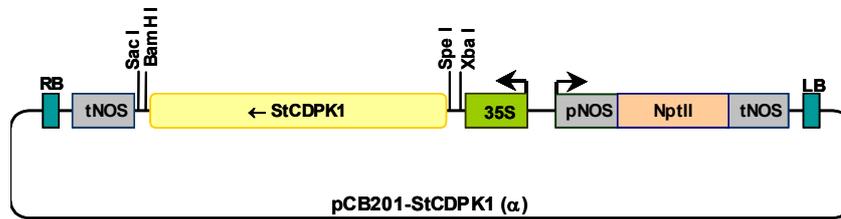


Figura 20 – Chequeo del vector pCB201-StCDPK1 (PaX/PaB)

Los clones resultantes de ligar pCB201 y StCDPK1 fueron digeridos con las enzimas SacI y SpeI, obteniéndose un fragmento de aproximadamente 1700 pares de bases correspondiente a StCDPK1.

Utilizando los oligonucleótidos Pa18 y PaB se obtuvo la secuencia completa de StCDPK1, que se introdujo en el vector pGEM T-easy. Se utilizó la enzima de restricción BamHI para liberar el fragmento subclonado. Esta secuencia fue introducida en el vector binario pGUT bajo el promotor GBSS. En este caso el clonado no estuvo direccionado, pudiéndose obtener la secuencia en orientación sentido o antisentido.

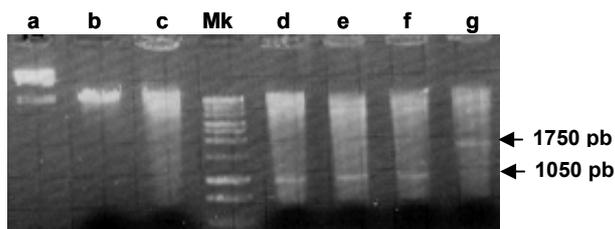
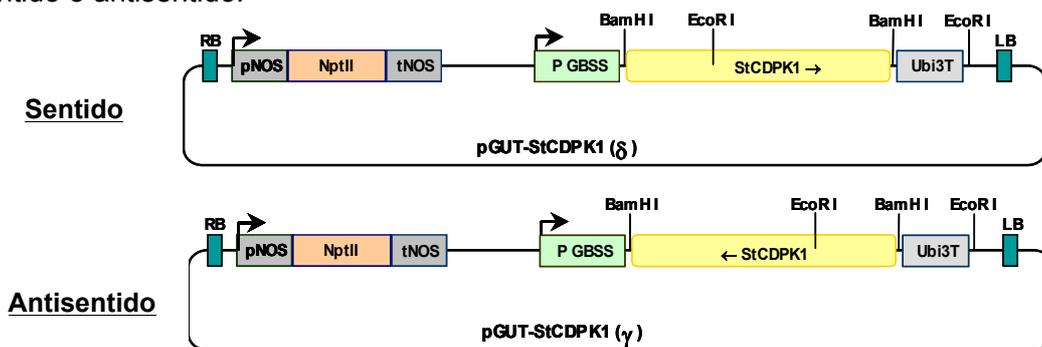


Figura 21 – Chequeo del vector pGUT-StCDPK1(Pa18/PaB)

Los clones resultantes de ligar pGUT con StCDPK1 fueron digeridos con la enzima EcoRI, obteniéndose un fragmento de aproximadamente 1750 pb cuando está insertado en orientación sentido (calle g), y de aproximadamente 1050 pb en orientación antisentido (calles d, e y f). Calle a: pGUT sin digerir. Calle b: pGUT digerido con EcoRI. Calle c: clon negativo.

Finalmente, con los oligonucleótidos Pa18 y Pa19 se obtuvo una secuencia parcial de *StCDPK1*, que abarca desde el ATG hasta el subdominio catalítico I (\cong 350 pb). Esta secuencia se introdujo en el vector pGEM T-easy y luego fue liberada mediante digestión con la enzima de restricción BamHI. Finalmente se subclonó el fragmento liberado en el vector pGUT.

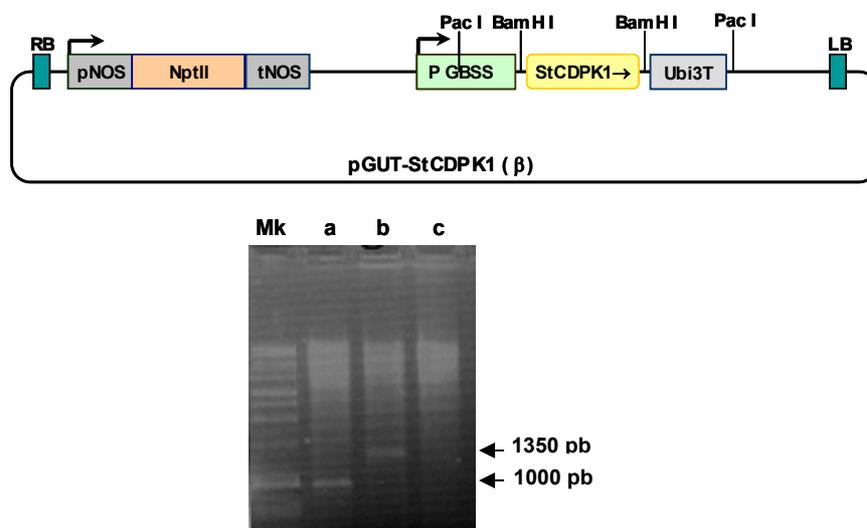


Figura 22 – Chequeo del vector pGUT-StCDPK1(Pa18/Pa19)

Los clones resultantes de ligar pGUT con *StCDPK1* incompleta, fueron digeridos con la enzima *PacI*, obteniéndose un fragmento de aproximadamente 1350 pb (calle b) Calle a: pGUT sin inserto (aprox. 1000 pb). Calle c: clon negativo.

Se nombró a cada construcción con una letra griega para una mejor organización:

Alfa (α) = pCB201-*StCDPK1* (secuencia completa en orientación sentido)

Beta (β) = pGUT-*StCDPK1* (secuencia incompleta en orientación sentido)

Delta (δ) = pGUT-*StCDPK1* (secuencia completa en orientación sentido)

Gamma (γ) = pGUT-*StCDPK1* (secuencia completa en orientación antisentido)

3.2 – Transformación de agrobacterias

Se transformó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV2260-6 con cada una de las construcciones de los vectores binarios (α , β , δ , γ). Las transformaciones fueron seleccionadas en medio MGL con el agregado de kanamicina. Tres colonias de cada construcción fueron analizadas para chequear las transformaciones (Figura 23).

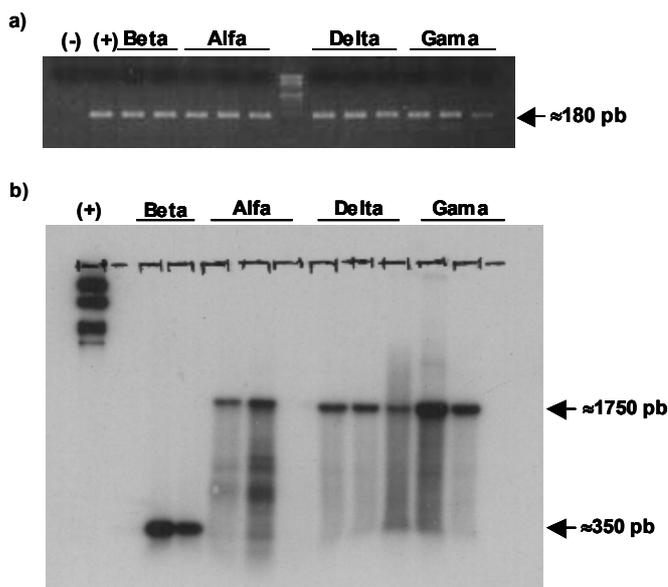


Figura 23 – Chequeo de las transformaciones de *A. tumefaciens*.

a) PCR de las colonias utilizando los oligonucleótidos Mar1 y Nt3. (-): control negativo; (+): control positivo. b) Southern blot de las colonias utilizando la enzima de restricción BamH1 para la construcción alfa, y las enzimas SacI y SpeI para las demás construcciones. (+): control positivo.

3.3 – Transformación de discos de papa

Discos de papa *Solanum tuberosum* variedad spunta fueron transformados según se describe en Materiales y Métodos con las colonias de agrobacterias chequeadas. Se realizaron controles de regeneración (discos de papa no transformados cultivados en ausencia de kanamicina) y de selección (discos de papa no transformados cultivados en presencia de kanamicina) en cada una de las transformaciones realizadas (Figura 24).

Los discos de papa fueron pasados a medio fresco cada aproximadamente cada 20 días y a partir del cuarto repique se obtuvieron las primeras plántulas que se traspararon a tubos individuales. Se transformaron entre 35 y 50 discos de papa con cada construcción y se repicaron hasta 8 veces limitándose en función del número de plántulas obtenidas o las contaminaciones ocurridas.

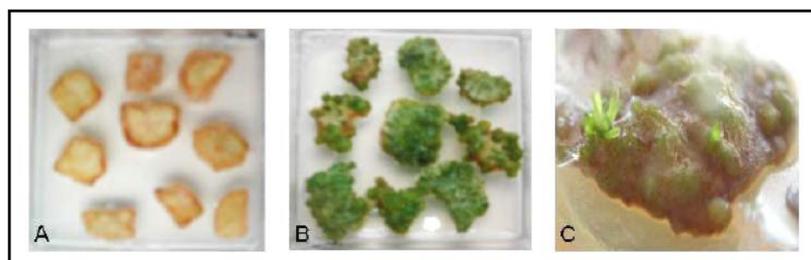


Figura 24 – Proceso de obtención de plantas transgénicas de papa.

A) Control de selección: discos de papa no transformados con agrobacterias crecidos en presencia de kanamicina. **B)** Control de regeneración: discos de papa no transformados con agrobacterias crecidos en ausencia de kanamicina. **C)** Plántulas en un disco de papa transformado con una construcción y crecido bajo selección de kanamicina.

Los controles de selección (15 a 20 discos) no sobrevivieron más allá del tercer repique en todas las transformaciones y fueron descartados.

Los controles de regeneración (15 a 20 discos) demostraron que el medio en que se realizó la transformación era viable, obteniéndose abundantes callos de color verde en todos los discos.

Construcción	Discos Transformados	Controles	Repiques	Plántulas	No enraizadas
Alfa	50	20	8	70	19
Beta	50	20	7	72	18
Delta	40	15	5	21	4
Gamma	35	15	5	5	4

Tabla 3 – Resumen de la transformación de discos de papa para obtener plantas transgénicas. Se describe brevemente los números totales de cada etapa en la producción de plantas de papa transgénicas para *StCDPK1*.

Al comparar el número de líneas transgénicas obtenidas a partir de las diferentes construcciones (Tabla 3) se observa que la eficiencia fue muy dispar. Cabe destacar sin embargo, que recién a partir del cuarto o quinto repique se generan plántulas de un tamaño adecuado para poder retirarlas del callo y pasarlas a contenedores individuales. Por eso en aquellas construcciones donde sólo se pudo repicar cinco veces el número de plántulas disminuyó significativamente.

En tres casos, el porcentaje de plántulas obtenidas que no enraizaron varió entre un 19 y un 27 % al pasarlas al medio de selección con kanamicina. Sin embargo cuando se utilizó la construcción gamma la pérdida fue del 80%, siendo la resultante de esto una única línea para dicha construcción.

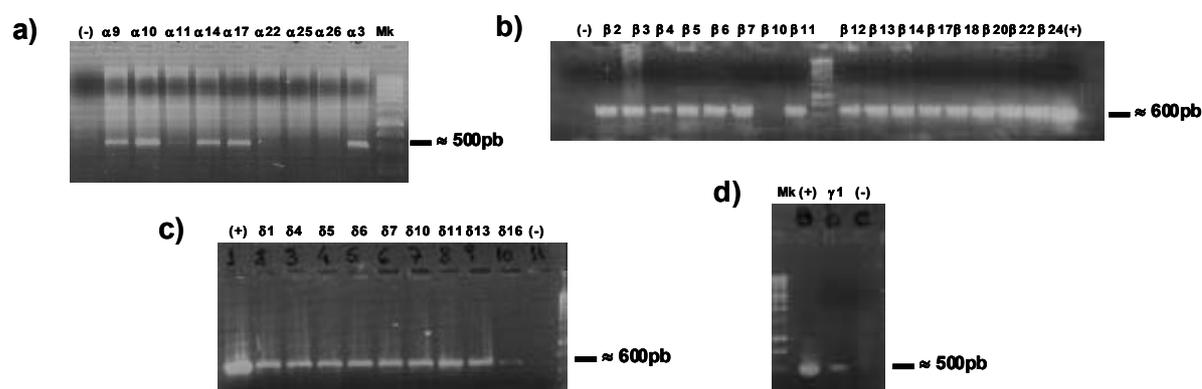


Figura 25 – Análisis por PCR de las diferentes líneas transgénicas .

a) Líneas α : los oligonucleótidos 35S y R11-2 amplificaron un fragmento de 500 pb en los clones positivos. **b) c) Líneas β y δ :** se utilizaron los oligonucleótidos GBSS y Pa19, dando en las positivas una banda de \cong 600 pb. **d) Línea γ :** los oligonucleótidos GBSS y R10-2 amplificaron un fragmento de \cong 500 pb. Los controles positivos utilizados son los mismos vectores con los que se transformó las agrobacterias.

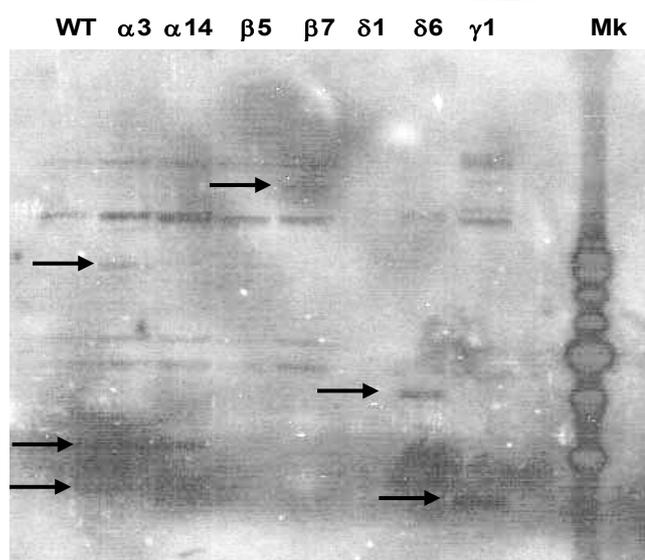


Figura 26 – Chequeo por S. blot de distintas plantas de papa transgénicas.

Se digirió unos 10 μg de ADN genómico de cada planta transgénica utilizando 3 unidades de la enzima de restricción EcoRI por cada μg de ADN. Se hibridó la membrana con una sonda que abarcaba la secuencia completa de *StCDPK1*. Las flechas indican bandas extras del transgén.

3.4 – Estudio de la expresión del transgén

En las diferentes líneas transgénicas, se estudió la expresión de *StCDPK1* en condiciones tuberizantes en plantas seleccionadas que contenían el transgén. Entrenudos de estas plantas fueron cultivados en condiciones inductoras de la tuberización durante 22 días. Además se quiso comparar los niveles de expresión de *StCDPK1* con *StCDPK3* dado que esta última isoforma se expresa tempranamente en estadios inducidos a tuberizar (Raíces y col. 2001).

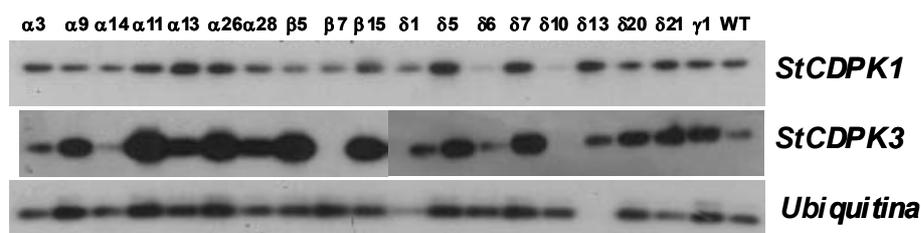


Figura 27 – Estudio de la expresión del transgen.

Se sintetizó ADNc a partir de 2 μg de ARN tratado previamente con ADNasa y se lo utilizó como templado para realizar las RT-PCRs.

Para *StCDPK1* y *StCDPK3* se emplearon un oligonucleótido específico de la región 3'UTR de cada isoforma (UTRSt1 y UTRSt3) y un oligonucleótido conservado en ambas (5'St), generando un fragmento de 420 pb para *StCDPK1* y uno de 500 pb para *StCDPK3*. Para Ubiquitina se emplearon oligonucleótidos específicos (Ubi5' y Ubi3') obteniéndose un fragmento de 250 pb.

Los productos de amplificación transferidos a membranas Hybond N+ fueron hibridados empleando sondas radiactivas específicas para cada gen.

Se cosecharon los estadios de tuberización, se extrajo el ARN con TRizol y se sintetizó el ADNc previo tratamiento con ADNasa para eliminar toda

contaminación con ADN genómico. Los ADNc se utilizaron como molde en reacciones de PCR, empleando oligonucleótidos específicos para *StCDPK1*, *StCDPK3* y *StUbiquitina*.

Luego de analizar y transferir los productos de PCR a membranas de nylon Hybond N+, éstas fueron hibridadas con sondas específicas para cada uno de los genes estudiados para así obtener un patrón de expresión particular de cada planta transformada (Figura 27).

Utilizando el programa ImageQuant (Amersham Biosciences) se cuantificó cada banda y se calculó la expresión relativa de cada isoforma respecto al gen constitutivo Ubiquitina. Los valores fueron expresados con relación a la planta salvaje (WT), relativizándose ésta con un valor igual a uno (=1) (Figura 28).

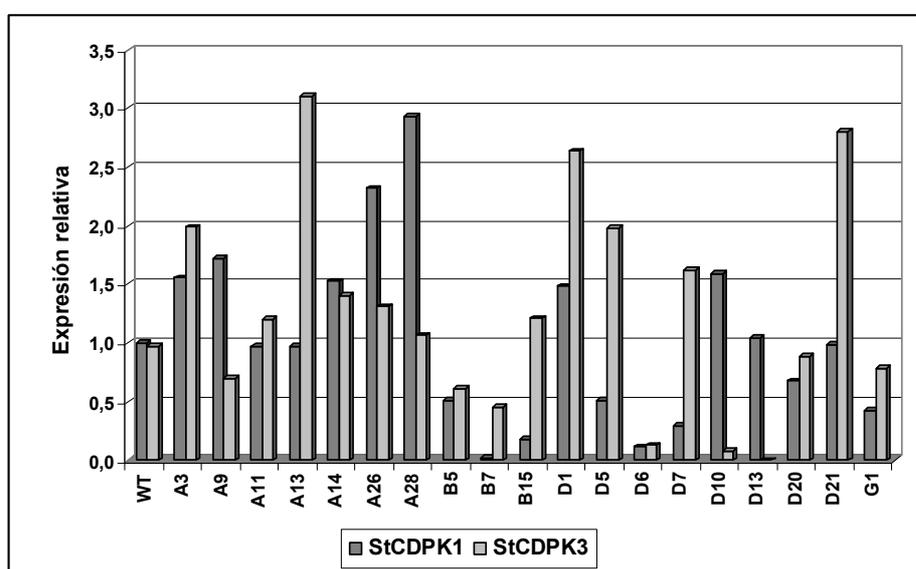


Figura 28 – Expresión relativa de *StCDPK1* y *StCDPK3* en condiciones inductoras de la tuberización de diferentes plantas transformadas. Se grafican los valores obtenidos con el programa ImageQuant.

3.5 – Selección de plantas con expresión alterada de *StCDPK1*

A partir de los datos de expresión de *StCDPK1* durante el proceso de tuberización se seleccionaron plantas que presentaran una diferencia considerable respecto a la planta salvaje (WT) y cuya expresión de *StCDPK3* no estuviera muy afectada (salvo $\beta 5$).

Las plantas seleccionadas fueron $\alpha 3$, $\alpha 14$, $\beta 5$, $\beta 7$, $\delta 1$, $\delta 6$ y $\gamma 1$, ya que presentaban una expresión aumentada o disminuida de *StCDPK1* y esto se correlacionó con posteriores chequeos de la expresión (datos no mostrados).

3.5.1 – Análisis por Western blot

En *Saccharomyces cerevisiae* se analizó la relación entre la abundancia de un transcripto y la cantidad de proteína presente (Gygi y col, 1999). Los autores demostraron que estimar directamente la cantidad de proteína a partir de la abundancia del mensajero correspondiente puede dar lugar a errores.

Para corroborar si los niveles de expresión a nivel de ARNm se correlacionaba con los niveles de proteínas, se realizó un ensayo de Western blot utilizando extractos proteicos totales de estadios inducidos a tuberizar de las plantas seleccionadas (Figura 29).

En estos ensayos se utilizó el antisuero policlonal específico dirigido contra el dominio catalítico amino terminal de *StCDPK1* descrito en el capítulo 2 de esta Tesis.

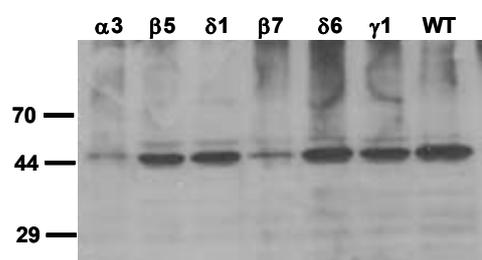


Figura 29 – Ensayo de Western blot de plantas seleccionadas.

Se utilizó 75 μ g de extracto proteico total de estolones inducidos a tuberizar. Se utilizaron geles SDS-PAGE 12%. Los geles fueron transferidos y las membranas fueron reveladas con un antisuero policlonal específico contra el dominio catalítico de *StCDPK1*.

Es destacable que entre las líneas analizadas, la línea $\beta 7$ mostró una correlación entre la disminución de la expresión del gen y la cantidad de proteína detectada en los extractos.

3.5.2 – Análisis de plantas con expresión alterada de *StCDPK1* en diferentes condiciones de tuberización

Para el estudio de la expresión en las plantas transgénicas se desarrolló un método de tuberización *in vitro*, en el cual se modificaron algunos de los parámetros conocidos que afectan el desarrollo del tubérculo (ver Introducción). Es así como los entrenudos se crecieron en un medio Murashige-Skoog modificado con 1/10 de la concentración de nitratos (NO_3NH_4 y NO_3K) ya que una alta concentración de los

mismos inhibe la tuberización, y un 8% de sacarosa como fuente de carbono. Las condiciones establecidas fueron de oscuridad total y bajas temperaturas ($\cong 21$ °C).

Se utilizaron entrenudos de aproximadamente un mes de edad de las plantas seleccionadas crecidas *in vitro*.

Planta	Tratamiento	n	Sin inducir	Inducidos	
				Pequeños	Medianos
WT	8% Sac	16	16		
	CCC 0,05	17		9	8
	CCC 0,5	15		5	10
α 3	8% Sac	18	18		
	CCC 0,05	19	1	9	9
	CCC 0,5	17		15	2
α 14	8% Sac	19	19		
	CCC 0,05	20	1	17	2
	CCC 0,5	20		13	7
β 5	8% Sac	20	16	4	
	CCC 0,05	20		14	6
	CCC 0,5	19		14	5
β 7	8% Sac	18		12	6
	CCC 0,05	18		13	5
	CCC 0,5	20		6	14
δ 1	8% Sac	18	18		
	CCC 0,05	17	2	12	3
	CCC 0,5	17		15	2
δ 6	8% Sac	18	15		3
	CCC 0,05	17		11	6
	CCC 0,5	20		15	5
γ 1	8% Sac	20	20		
	CCC 0,05	17	4	9	4
	CCC 0,5	20		14	6

Tabla 4 – Efecto del inhibidor de la biosíntesis de giberelinas CCC en la inducción de la tuberización de plantas con expresión alterada de *StCDPK1*.

Se crecieron en condiciones inductoras de la tuberización o en presencia de 0,05 y 0,5 μ M GA y de 0,05 y 0,5 mg/ml Cloruro de Clorocolina (CCC), inhibidor temprano de la biosíntesis de giberelinas. Las concentraciones de hormona y de CCC se seleccionaron en base a trabajos que estudiaron el efecto inhibitor de las giberelinas sobre el proceso de tuberización (Xu y col., 1998; Abdala y col., 1995). En paralelo se analizaron plantas no modificadas (WT).

Luego de 10 días en estas condiciones de cultivo, se procedió a cosechar los entrenudos y se los separó en inducidos o no a tuberizar. Se determinó el peso total de los estadíos inducidos y se los clasificó de acuerdo a su tamaño en estadíos de tuberización pequeños o medianos. El CCC indujo la tuberización en todas las líneas

analizadas al igual que en las plantas salvajes. Cabe destacar que la línea $\beta 7$ mostró una inducción temprana de la tuberización aún en ausencia del inhibidor de giberelinas mientras que no se observaron estadios inducidos en las plantas salvajes y las otras líneas transgénicas a estos tiempos cortos (Tabla 4).

Se determinó el peso en miligramos a los tubérculos producidos en las plantas tratadas con 0,5 mg/ml de CCC, concentración capaz de inducir la tuberización en el 100% de los casos.

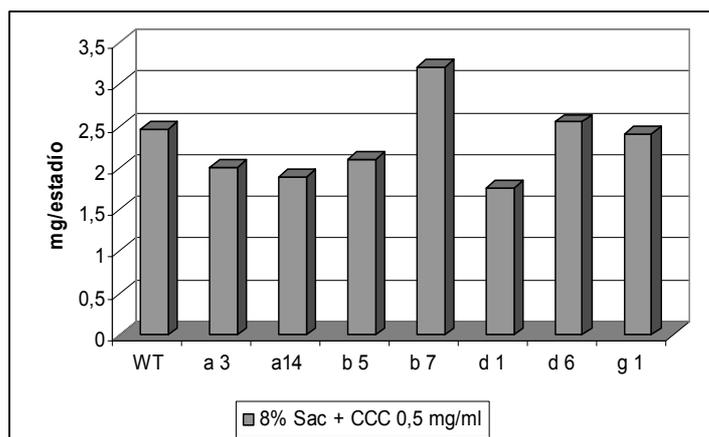


Figura 30 – Promedio del peso en miligramos de los estadios para cada planta con expresión alterada de *StCDPK1* en presencia del inhibidor de la síntesis de giberelinas CCC.

Puede observarse que el peso promedio de los tubérculos fue 30% mayor en las plantas $\beta 7$ respecto de las plantas salvajes.

Los diferentes entrenudos tratados durante 10 días con giberelinas no presentaron signos de haber iniciado el proceso de tuberización. Se determinó la longitud de los estolones no inducidos desde el meristema axilar hasta el extremo de los mismos.

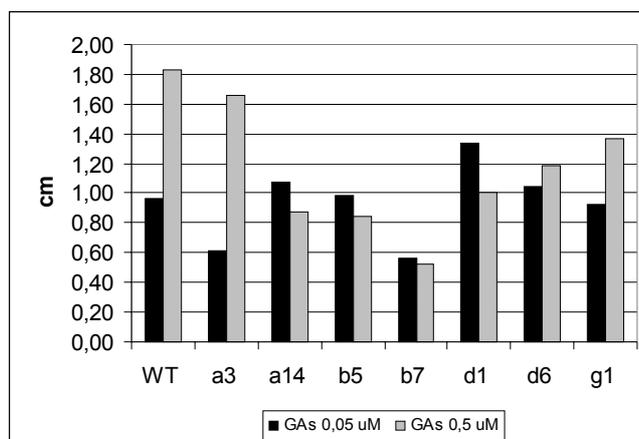


Figura 31 – Promedio en centímetros del largo de los estadios sin inducir luego del tratamiento con giberelinas durante 10 días.

Se determinó la longitud de los estadios sin inducir desde el meristema hasta la punta del estolón.



Figura 32 – Fotos de estadios representativos para cada uno de los tratamientos indicados en cada planta con expresión alterada de *StCDPK1*.

Como se puede observar, la respuesta de las plantas $\beta 7$ (que tienen una expresión disminuida de *StCDPK1* tanto a nivel de ARNm como de proteína) al tratamiento con GAs fue significativamente diferente a la de los controles (Figura 31 y 32). Si bien las otras líneas mostraron diferencias, éstas no fueron muy significativas o no presentaban correlación con los niveles de expresión, pudiendo ser quizás producto de errores en las técnicas utilizadas para el estudio.

Cuando se comparó la respuesta de la planta $\beta 7$ a diferentes tiempos de cultivo en presencia de giberelinas se encontró que la respuesta se mantenía disminuída de una manera significativa respecto a la planta salvaje (Figura 33).

Por lo tanto los futuros experimentos se realizaron sobre esta línea.

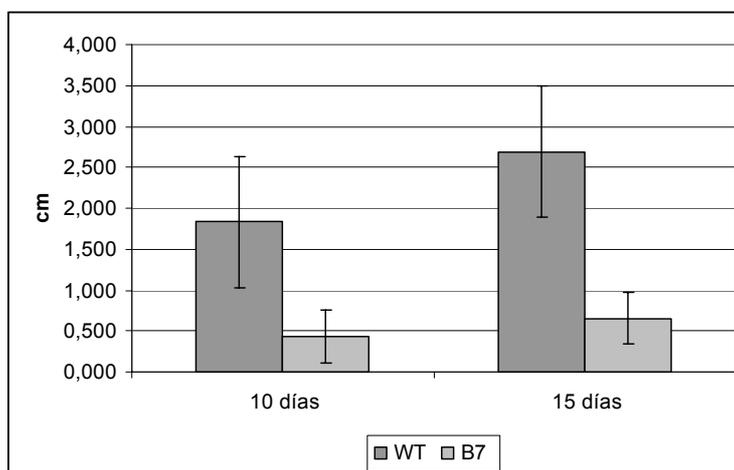


Figura 33 – Promedio en centímetros del largo de los estadios sin inducir luego del tratamiento con giberelinas a diferentes tiempos.

Se determinó la longitud de los estadios sin inducir desde el meristema hasta la punta del estolón.

3.5.3 – Efecto de la concentración de sacarosa

In vitro, la formación de tubérculos depende básicamente de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo (Garner y Blake, 1989). Altas concentraciones de sacarosa inducen la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de carbono en el tubérculo (Müller-Röber *et al.*, 1990). Asimismo, la expresión de *StCDPK1* se induce en plantas cultivadas en presencia de 8% sacarosa en condiciones de luz continua (Raices y col., 2003b) y ensayos de Western blot revelaron un aumento de la proteína *StCDPK1* (Figura 17 de esta tesis).

Se quiso estudiar como respondían las plantas $\beta 7$ al agregado de concentraciones crecientes de sacarosa en el medio de cultivo.

Se cultivaron entrenudos de plantas salvajes y $\beta 7$ en medio MS con diferentes porcentajes de sacarosa durante 8 días en condiciones inductoras oscuridad total a 21°C.

Sólo se encontraron estadios inducidos (pequeños, medianos y grandes) en las plantas (WT y $\beta 7$) tratadas con 8% sacarosa. En las demás condiciones no se observó inducción de la tuberización salvo en las plantas $\beta 7$ tratadas con 6% de sacarosa donde hubo un 19.6% de estadios inducidos. Se midió el largo de los estadios no inducidos y se observó que al aumentar la concentración de sacarosa en el medio de cultivo disminuía el largo del estolón, siendo este efecto más marcado en las plantas $\beta 7$ (Figura 33).

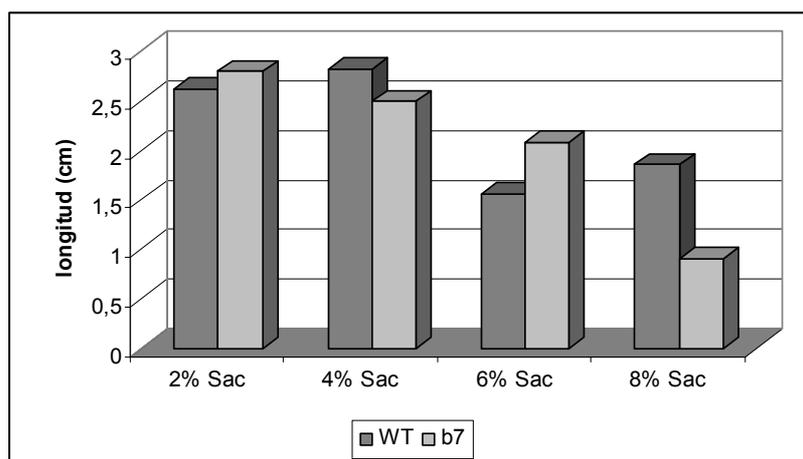


Figura 33 – Efecto del porcentaje de sacarosa en la longitud de los estadios sin inducir. Se determinó la longitud de los estadios sin inducir desde el meristema hasta la punta del estolón.

Se ha sugerido que la sacarosa regula el desarrollo del tubérculo porque afecta los niveles endógenos de las GAs. Estolones crecidos en 2% sacarosa tienen

niveles más elevados de la hormona que aquellos crecidos en 8% (Xu y col., 1998). El acortamiento de los estolones observado en las plantas cultivadas con alta sacarosa apoyaría esta hipótesis.

3.5.4 – Tratamiento con diferentes hormonas

Se procedió a estudiar el efecto del ácido absícico (ABA) y la bencilaminopurina (BAP), hormonas descritas como reguladores positivos de la tuberización, sobre plantas salvajes y de la línea $\beta 7$ crecidas durante 10 días en condiciones inductoras. Asimismo, se repitió el experimento con GAs (inhibidor del proceso). Se utilizaron las siguientes concentraciones de hormonas: GAs = 0,5 μM , ABA = 7,6 μM , BAP = 5 mg/l. Luego se determinó el número de estadios sin inducir e inducidos.

En las plantas salvajes y $\beta 7$ tratadas con ABA y BAP se observan estadios de tuberización a diferencia de las tratadas con giberelinas donde no hay estadios inducidos. Corroborando datos previos, se observa que las plantas $\beta 7$ presentan una respuesta disminuida ante el tratamiento con giberelinas (Figura 34).

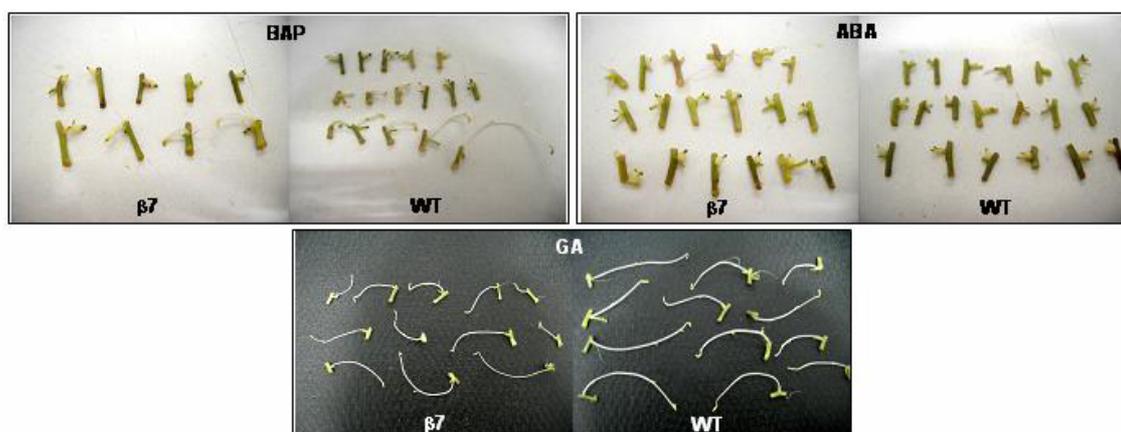


Figura 34 – Fotos de los diferentes estadios obtenidos luego del tratamiento con hormonas.

En nuestras condiciones, ABA tuvo un mayor efecto inductor que BAP tanto en las plantas control como en las transgénicas, sin embargo el número de plantas inducidas fue mayor en la línea $\beta 7$ en ambas condiciones (Figura 35).

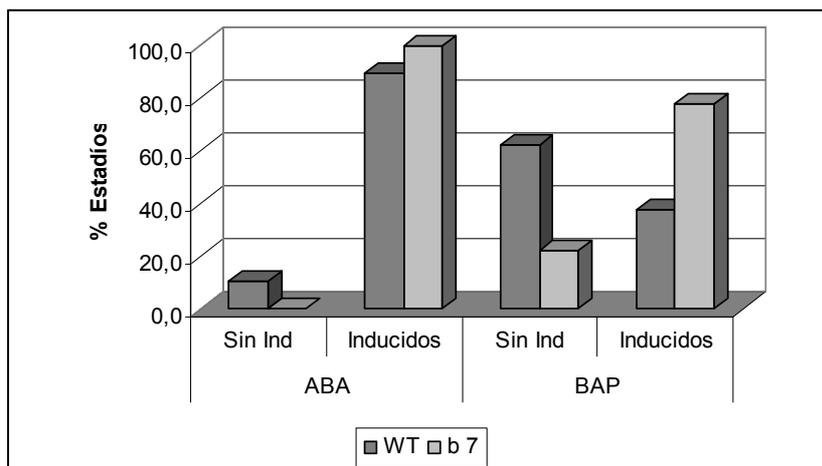


Figura 35 – Porcentaje de estadios de tuberización ante la presencia de diferentes hormonas.

Se determinó la expresión de *StCDPK1* en las plantas salvajes (WT) y $\beta 7$ tratadas o no con hormonas. Se la relativizó respecto de la expresión del gen constitutivo Ubiquitina. Como se observa en la figura 36, las diferentes hormonas inducen la expresión de *StCDPK1* en las plantas salvajes. Un comportamiento similar ha sido descrito para *NtCDPK1*, una isoforma de hojas de tabaco cuya expresión aumenta por el tratamiento con ABA, GAs y citoquininas (Yoon y col., 1999). Sin embargo, no se observó esta inducción en las plantas $\beta 7$.

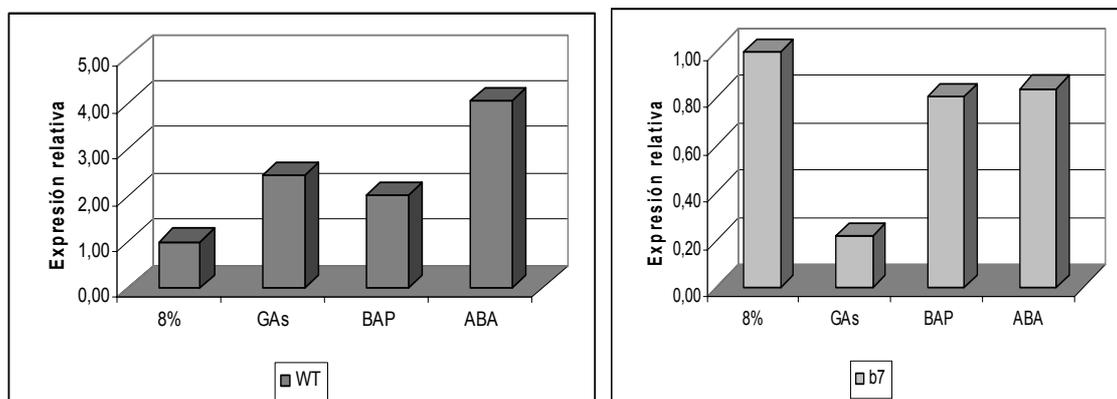


Figura 36 – Expresión relativa de *StCDPK1* en estadios de tuberización ante la presencia de diferentes hormonas.

Se sintetizó ADNc a partir de 2 μ g de ARN tratado previamente con ADNasa y se lo utilizó como templado para realizar las RT-PCRs.

Se utilizó un oligonucleótido específico de la región 3'UTR de *StCDPK1* (UTRSt1) y un oligonucleótido conservado (5'St), generando un fragmento de 420 pb. Para *StUbiquitina* se emplearon oligonucleótidos específicos (Ubi5' y Ubi3') obteniéndose un fragmento de 250 pb. Los productos de amplificación transferidos a membranas Hybond N+ fueron hibridados empleando sondas radiactivas específicas para cada gen.

En cada planta los valores están relativizados a la expresión en 8% Sacarosa (= 1).

3.6 – Características de las plantas $\beta 7$ cultivadas *in vitro*

Se quiso estudiar si las plantas $\beta 7$ presentaban características particulares cuando se las cultivaba *in vitro* en condiciones de multiplicación.

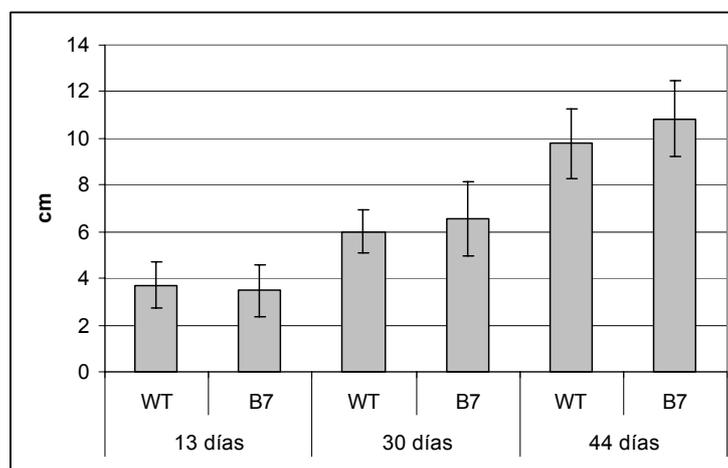


Figura 37 – Promedio en cm del largo de los tallos a diferentes tiempos.

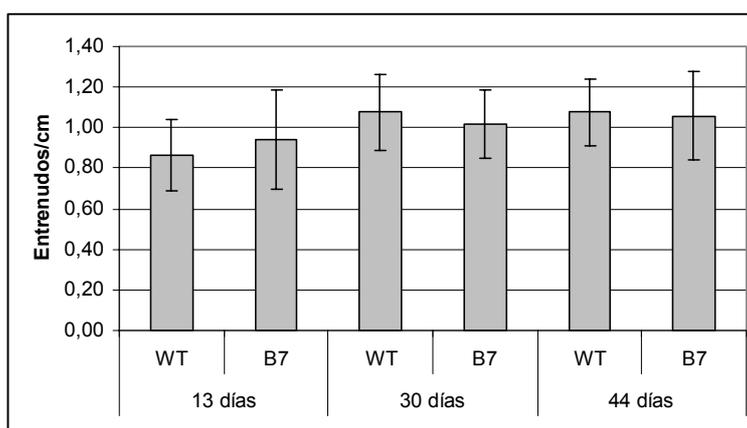


Figura 38 – Promedio del número de entrenudos por cm de tallo.

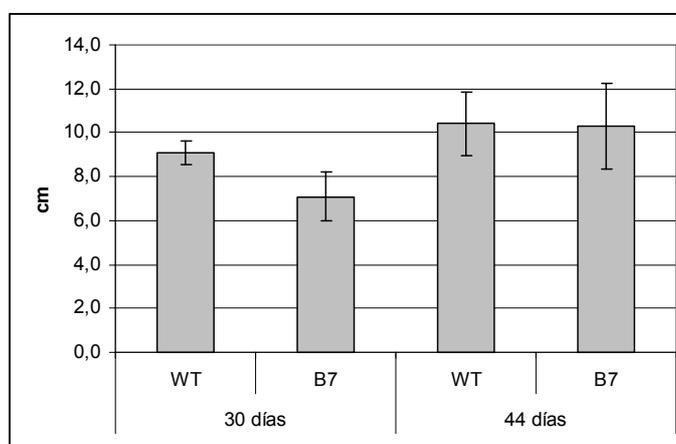


Figura 39 – Promedio en cm del largo de raíces a diferentes tiempos.

No se encontraron diferencias apreciables entre las plantas salvajes (WT) y las de la línea $\beta 7$ presentando ésta últimas el aspecto característico de plantas crecidas en condiciones de multiplicación. Con respecto al número de entrenudos, independientemente de los tiempos, se obtuvo en promedio un entrenudo por centímetro de tallo.

Además se determinó el contenido de clorofila en hojas de las plantas de 44 días. Se extrajo la clorofila y se midió la absorbancia a 652 nm contra un blanco del buffer de extracción. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{mg clorofila/gramo peso fresco} = \frac{\text{Abs}_{652} \times \text{ml volumen final}}{34,5 \times \text{g de peso fresco}}$$

Muestra	Abs (652nm)	mg clorofila/g peso fresco
WT	1.870	0.12
$\beta 7$	1.790	0.11

No se encontraron diferencias en el contenido de clorofila entre ambas muestras lo que concuerda con el aspecto de las plantas a simple vista.

3.7 – Efecto de las giberelinas sobre plantas salvajes

Si bien la línea $\beta 7$, con expresión disminuida de *StCDPK1*, no presentaba diferencias respecto de la plantas control cuando se crecía en condiciones de multiplicación, se observaron algunas diferencias cuando se las cultivaba en condiciones inductoras de la tuberización. Esta línea tuberizaba más tempranamente que las plantas control (aún en ausencia de CCC presentaba estolones inducidos a tuberizar), los estolones no inducidos eran más cortos, el peso promedio de los tubérculos era mayor y la respuesta de elongación en presencia de GAs era menor. Estos resultados junto a los datos previos de expresión (Raices y col., 2001; 2003a) sugieren que *StCDPK1* modula el proceso de tuberización, quizás participando en la transducción de GAs. Trabajos previos han propuesto a las CDPKs como componentes de la señalización de giberelinas (Abo-el-Saad y Wu, 1995; Khan y col, 2005, Zhang y col, 2005).

Para analizar si *StCDPK1* participa en la señalización de giberelinas se determinó nuevamente su expresión en plantas salvajes y $\beta 7$ luego de 10 días de tratamiento con 0,5 μ M GAs.

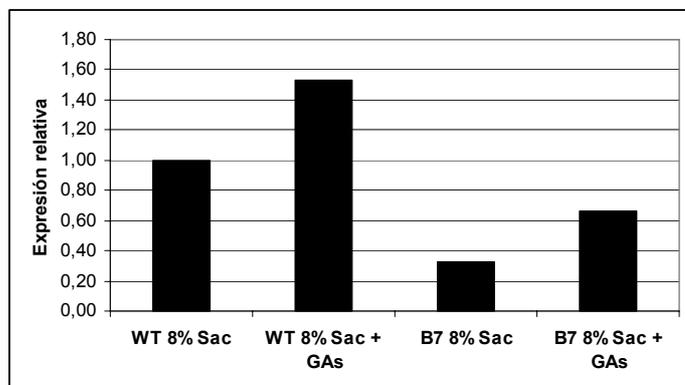


Figura 40 – Expresión relativa de *StCDPK1* ante el tratamiento con giberelinas durante 10 días.

Los valores fueron relativizados a la expresión del gen de ubiquitina para cada muestra. Se consideró la expresión de las plantas salvajes en condiciones normales de tuberización como referencia.

Se observó un aumento en la expresión de *StCDPK1* en las plantas tratadas con la hormona, sólo que en las plantas $\beta 7$ los niveles alcanzados fueron muy inferiores (30%) (Figura 40).

Para ver el efecto a tiempos cortos sobre la expresión de *StCDPK1* en plantas salvajes se incubaron entrenudos de plantas de 41 días de edad en condiciones inductoras de la tuberización durante 13 días. Luego se pasaron los entrenudos que ya habían desarrollado diferentes estadios de tuberización a medio MS + 8% Sac con 0,5 μ M GA durante 2 y 6 horas. Los controles se pasaron a medio MS + 8% Sac sin el agregado de la hormona.

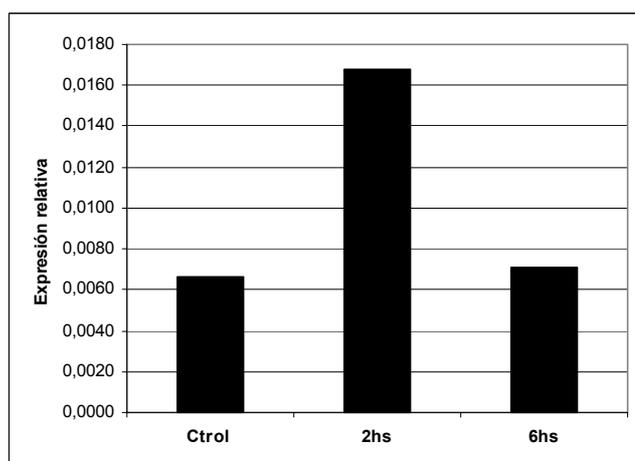


Figura 41 – Expresión relativa de *StCDPK1* luego del tratamiento a tiempos cortos con giberelinas.

En la Figura 41 se observa una inducción transitoria a las 2 horas de la expresión de *StCDPK1* en respuesta al agregado de GAs.

4 – CDPKs en el proceso de nodulación

Las plantas dependen de su ambiente y utilizan señales externas para iniciar eventos específicos de su desarrollo. Tal es el caso de la formación del tubérculo en la planta de papa, *Solanum tuberosum*, y de la formación de nódulos simbióticos en las raíces de leguminosas. Ambos procesos son regulados por carencia de nitrógeno, y en ambos casos, las células iniciales del órgano en formación presentan una gran acumulación de amiloplastos indicando que se originan como un pozo de carbono. Podría existir una cierta analogía entre los mecanismos moleculares responsables de la formación de nódulos en leguminosas y de tubérculos en papa aunque no existan relaciones anatómicas particulares entre ambos órganos. Como parte de un proyecto de colaboración con el laboratorio del Dr. Martín Crespi en el Instituto de Ciencias Vegetales (ISV-CNRS, Gif sur Yvette, Francia), se estudió la participación de CDPKs en la interacción simbiótica y durante el proceso de nodulación en plantas de *Medicago*.

Objetivos particulares:

- 1 - Obtención de la secuencia codificante para *MtCPK3*.
- 2 - Determinación de la expresión de *MtCPK3* en diferentes órganos de la planta y durante el proceso de nodulación.
- 3 - Análisis de la actividad quinasa en raíces noduladas o no.
- 4 - Estudios de localización:
 - a) Localización subcelular de MsCPK3 en un sistema transitorio de células epidérmicas de cebolla.
 - b)- Inmunolocalización de MtCPK3 en raíces de *M. truncatula*.
- 5 - Obtención de raíces transgénicas MtCPK3-RNAi.

4.1 – Obtención de *MtCPK3*

La planta modelo *Medicago truncatula* esta estrechamente relacionada con la planta de alfalfa, *Medicago sativa*. Ambas comparten la capacidad de establecer relaciones simbióticas con bacterias del suelo del género *Rhizobium* y así fijar nitrógeno. Se identificó una isoforma de CDPK, MsCPK3, en alfalfa (Davletova et al., 2001) y con dicha secuencia se realizó una búsqueda de secuencias homólogas en

la base de datos EST de *M. truncatula* (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/mta1/>). Se encontraron 21 genes de CDPK expresados en diferentes tejidos, entre los cuales se identificaron dos secuencias consenso tentativas (TC) TC101857 y TC103686 expresadas en raíces.

La secuencia TC101857 comparte un 97% de identidad a nivel de aminoácidos con el dominio catalítico de *MsCPK3* (Davletova y col., 2001) y una alta similitud con el dominio amino terminal variable, mientras que TC103686 es 100% idéntico a la secuencia aminoacídica del dominio regulatorio similar a calmodulina (CLD) de *MsCPK3*, sugiriendo que ambos clones corresponden a la misma isoforma de CDPK en *M. truncatula*.

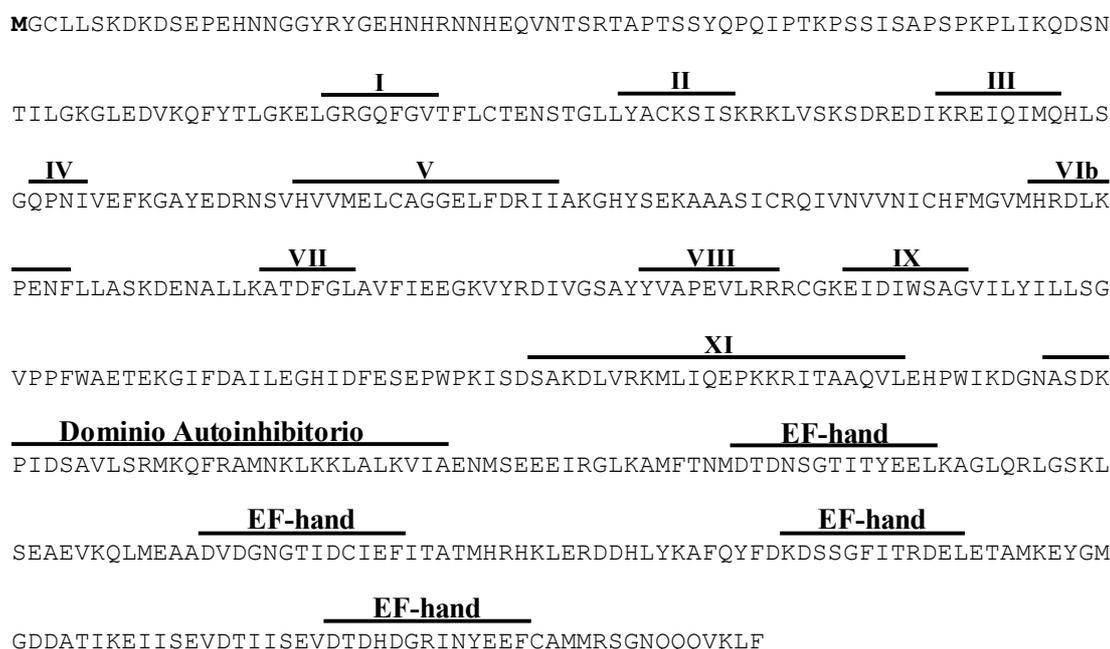


Figura 42 – Secuencia de aminoácidos de MtCPK3.

Se señalan los diferentes subdominios del dominio catalítico característicos de quinasas de serina y treonina, el dominio autoinhibitorio y las secuencias de unión al calcio (EF-hand).

La secuencia de ADNc completa de esta isoforma de CDPK fue amplificada por RT-PCR utilizando ARN de raíces de *M. truncatula* como templado y oligonucleótidos específicos diseñados para la región 5' del TC101857 y la región 3' del TC103686. El clon completo, designado *MtCPK3* (Genbank DQ454073), tiene un marco de lectura abierto de 1617 pb desde el ATG hasta el codón terminador, codificando una proteína de 538 aminoácidos con un peso molecular estimado de 60,6 kDa. La secuencia aminoacídica predicha de *MtCPK3* comparte la mayor homología (95-98%) con *MsCPK3* de *M. sativa* (Genbank X96723.1) y las isoformas gamma y c de CDPKs de *Glycine max* (Genbank AAB80693, AY247756.1).

MtCPK3 presenta los subdominios característicos I al XI de quinasas de serina y treoninas (Hanks y Quinn, 1991), el dominio autoinhibitorio y los cuatro sitios de unión a calcio (EF-hand) del dominio similar a calmodulina (Figura 42). El dominio variable de la región amino terminal sólo comparte alta identidad con el de MsCPK3 y presenta sitios consenso de miristoilación y un sitio putativo de palmitoilación. La proteína predicha también contiene numerosos sitios de fosforilación sugiriendo que esta actividad podría ser regulada por fosforilación reversible.

4.2 – Expresión de *MtCPK3* en diferentes órganos

La expresión de esta isoforma fue analizada en raíces, tallos, hojas y flores de plantas de *M. truncatula* mediante PCR cuantitativa.

Los oligonucleótidos fueron diseñados utilizando el programa LightCycler® Probe Design Software (Roche) con una eficiencia del 95%, lo cual es muy importante para la validación de los resultados obtenidos respecto a su especificidad.

Se sintetizaron tres ADNc por muestra y se evaluó la expresión del gen constitutivo *MtACTIN11* en cada una de ellas. Se seleccionaron las dos muestras que dieron resultados más similares para estudiar la expresión de *MtCPK3*. Se encontró que *MtCPK3* se expresaba principalmente en raíces, tal como lo determinaban los TCs de donde la secuencia fue obtenida, mientras que en los demás órganos la expresión obtenida resultó ser basal.

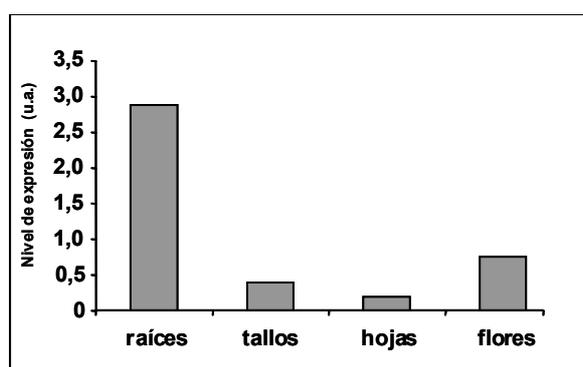


Figura 43 – Expresión de *MtCPK3* en diferentes órganos de *M. truncatula*.

Se graficó los niveles de expresión de *MtCPK3* en unidades arbitrarias (a.u.) en raíces, tallos, hojas y flores de plantas de *M. truncatula*.

4.3 – Ensayos de Western blot

Se desarrollaron anticuerpos específicos dirigidos contra un péptido del dominio amino terminal variable, H₂N-IPTKPSSISAPSPKP-CONH₂, presente tanto en MtCPK3 como en MsCPK3 pero no en otras CDPKs o proteínas presentes en los bancos de datos del TIGR o el NCBI.

Estos anticuerpos, purificados por afinidad, se utilizaron en ensayos de Western blot para analizar extractos crudos, fracciones solubles o particuladas de raíces de *M. truncatula*.

Los anticuerpos reconocieron dos bandas específicas de 60 y 63 kDa en extractos crudos. El mismo análisis realizado en fracciones solubles y particuladas mostró que la banda de 63 kDa era predominante en la fracción soluble mientras que la de 60 kDa estaba presente en la fracción particulada (Figura 44, panel A). Si bien no es posible determinar la cantidad de proteína CPK presente en cada fracción, la intensidad mayor de la banda de 60 kDa en los ensayos realizados con extractos crudos sugería que MtCPK3 estaba mayoritariamente asociada a la fracción particulada. En ensayos de Western blot utilizando mayor cantidad de proteínas (50 µg) se pudo detectar una segunda banda tenue en la fracción soluble (Figura 44, panel B).

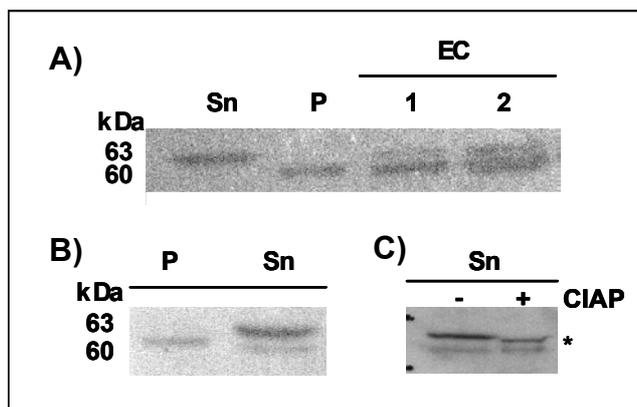


Figura 44 – Ensayo de Western blot.

Se utilizó un anticuerpo específico en una dilución 1:1000 en extractos de proteínas de raíces de plantas de *M. truncatula* (A17).

A) Sn: soluble (45µg) y P: particulada (15µg) o EC: extractos crudos (1: 10%, 2: 20% del total de proteína. B) Fracciones particulada (15µg) y soluble (50µg). C) Fracción soluble (90µg) incubada o no con 100 unidades de fosfatasa alcalina (CIAP) durante 15 minutos a 37°C. El asterisco (*) indica el cambio de movilidad.

Las diferentes bandas podrían corresponder a diferentes isoformas de CDPK (aunque el péptido inmunogénico utilizado para el desarrollo del anticuerpo no reveló similitudes en las bases de datos disponibles, TIGR y NCBI, cuando se desarrolló una búsqueda “blastx” para secuencias cortas permitiendo aminoácidos no apareados), o también podrían ser versiones de la misma quinasa modificadas post-traduccionalmente. Se ha descrito que la proteína recombinante MsCPK3 es capaz de autofosforilarse en forma dependiente de calcio (Davletova y col. 2001), esta modificación puede afectar la movilidad electroforética de una proteína.

A fin de evaluar esta última posibilidad, la fracción soluble fue incubada o no con una Fosfatasa Alcalina (CIAP – Invitrogen) y analizada por Western blot. Se detectaron dos bandas en ambas muestras pero en aquellas tratadas con CIAP se registró un cambio en el PM de la de menor movilidad. Se ha reportado cierta resistencia al tratamiento con fosfatasas para otras quinasas (Humphries y col. 2005), por lo que podría sugerirse que no se logró la desfosforilación completa de esta proteína.

Estos datos sugieren una transición dependiente de fosforilación entre estas dos formas, como se reportó para otras CDPKs (Romeis y col., 2001), sin embargo no se puede descartar que otras modificaciones post-traduccionales puedan afectar la movilidad de MtCPK3.

4.4 – Medición de la actividad quinasa dependiente de calcio

Se midió la actividad quinasa dependiente de calcio en fracciones solubles y particuladas de raíces de *M. truncatula* (A17) cosechadas a diferentes días después de la germinación (d.d.g.). Se utilizó Syntide-2 o Histona H1 como sustratos aceptores.

Ambos extractos proteicos fosforilaron los sustratos de una manera dependiente de calcio, y esta activación fue revertida por el agregado de EGTA o de los antagonistas de calmodulina clorpromazina (CPZ) y el compuesto 48/80 (Figura 45 y 46).

En términos de actividad total de CDPK, la mayor parte está asociada a la fracción soluble, sin embargo la actividad específica de la fracción particulada fue mayor que la de la soluble a los 5 d.d.g. y a los 7 d.d.g.

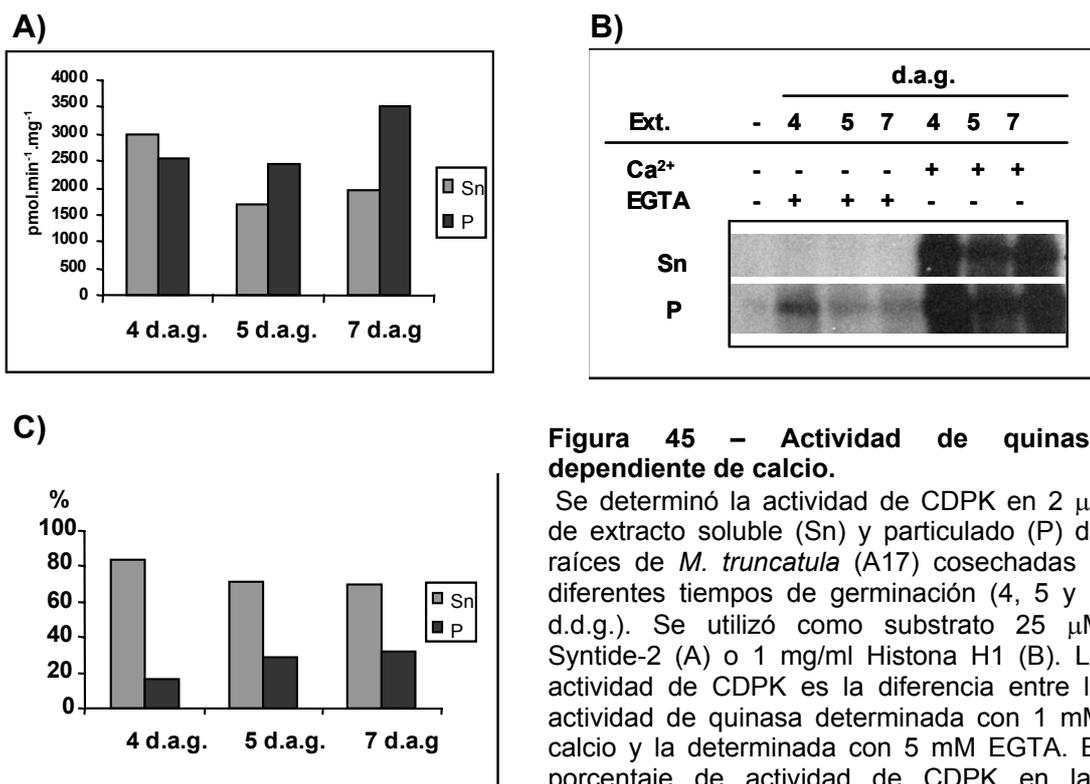


Figura 45 – Actividad de quinasa dependiente de calcio.

Se determinó la actividad de CDPK en 2 μ g de extracto soluble (Sn) y particulado (P) de raíces de *M. truncatula* (A17) cosechadas a diferentes tiempos de germinación (4, 5 y 7 d.d.g.). Se utilizó como sustrato 25 μ M Syntide-2 (A) o 1 mg/ml Histona H1 (B). La actividad de CDPK es la diferencia entre la actividad de quinasa determinada con 1 mM calcio y la determinada con 5 mM EGTA. El porcentaje de actividad de CDPK en las fracciones solubles o particuladas es graficada en el panel (C).

Los antagonistas de calmodulina inhiben las CDPKs debido a la similitud del dominio regulatorio (CLD) de estas quinasa con las calmodulinas. El inhibidor de quinasa estaurosporina (ST) también redujo la actividad en ambos extractos, mientras que la adición de ácido okadaico, un potente inhibidor de fosfatasa de proteínas de las familias PP1 y PP2A, incrementó la actividad de CDPK en la fracción particulada sugiriendo la presencia de fosfatasa activa en esta fracción.

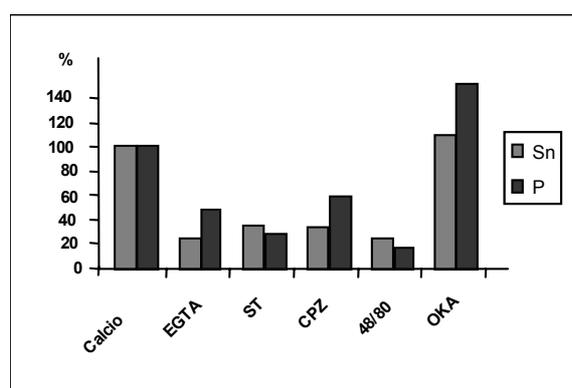


Figura 46 – Actividad de CDPK en presencia de distintos inhibidores.

Extractos de proteínas de raíces de 7 d.d.g. fueron incubados durante 30 minutos en un baño de hielo con 25 μ M calcio y los siguientes inhibidores: 1 μ M estaurosporina (ST), 0,5 mM clorpromazina (CPZ), 0,1 mg.ml⁻¹ compuesto 48/80 y 100 nM ácido okadaico (OKA) o con 5 mM EGTA.

100% de actividad de CDPK corresponde a 1430 pmol.min⁻¹.mg⁻¹ para la fracción soluble o 2540 pmol.min⁻¹.mg⁻¹ para la fracción particulada.

No se puede concluir que MtCPK3 sea la responsable exclusiva de la actividad de CDPK detectada, sin embargo los datos mostrados en la figura 44 sugieren que esta isoforma está presente tanto en los extractos particulados como solubles de las raíces en desarrollo.

4.5 – Expresión de *MsCPK3* en raíces de alfalfa inoculadas con *Sinorhizobium meliloti*

Datos de la base TIGR (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/mta1>) indican que los TCs correspondientes a *MtCPK3* fueron detectados en raíces noduladas y en raíces recolectadas 24 horas luego de la inoculación con *Sinorhizobium meliloti*. Considerando la especificidad de tejido de esta isoforma fue interesante estudiar si podría estar involucrada en el proceso simbiótico de la nodulación. *M. sativa* nodula más rápido que *M. truncatula*, por lo tanto se realizó un estudio de la cinética de la expresión de CPK3 durante la morfogénesis del nódulo en raíces de alfalfa infectadas con la cepa salvaje *S. meliloti* Sm41.

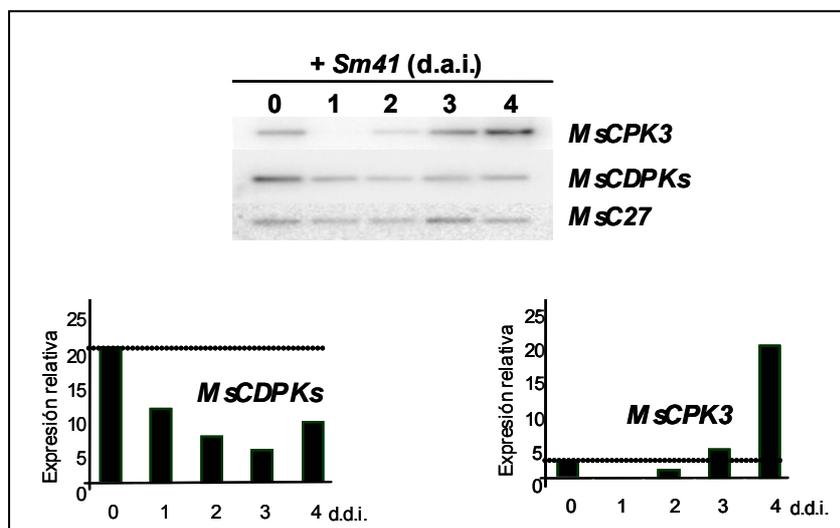


Figura 47 – Expresión de *MsCPK3* en raíces de alfalfa inoculadas con *S. meliloti*
RT-PCR semicuantitativa en raíces de *M. sativa* infectadas con *S. meliloti* Sm41 y recolectadas a diferentes días después de la infección (d.d.i.). El gen constitutivo *MsC27* fue utilizado como control para normalizar las muestras. En los gráficos se muestra la cuantificación de las bandas como expresión relativa.

Se realizó un ensayo de RT-PCR semicuantitativa utilizando ARNm obtenido de estadíos tempranos de la interacción simbiótica. Se utilizaron un par de oligonucleótidos dirigidos contra regiones conservadas de todas las CDPKs

(subdominio VIb y el dominio autoinhibitorio) o un oligonucleótido específico dirigido contra el dominio amino terminal de *MsCPK3* y el oligonucleótido del dominio autoinhibitorio.

Mientras que con los oligonucleótidos conservados no se encontró inducción de CDPKs a lo largo del proceso, cuando se utilizó el oligonucleótido específico se vió que la expresión de *MsCPK3* aumentaba a los 4 días después de la infección (d.d.i.), concomitantemente con la formación del primordio en el nódulo (Figura 47).

Se analizó también la actividad total de CDPK durante las etapas tempranas del desarrollo de la nodulación utilizando Histona H1 como aceptor de fosfato (Figura 48).

Se observó un aumento de la fosforilación de Histona H1 en la fracción particulada de los extractos proteicos de las raíces inoculadas (3 y 4 d.d.i.). Dicha fosforilación se vió significativamente reducida ante la presencia de EGTA. Los datos de actividad enzimática y la inducción de *MsCPK3* sugieren que ésta u otras CDPKs fueron responsables del incremento observado.

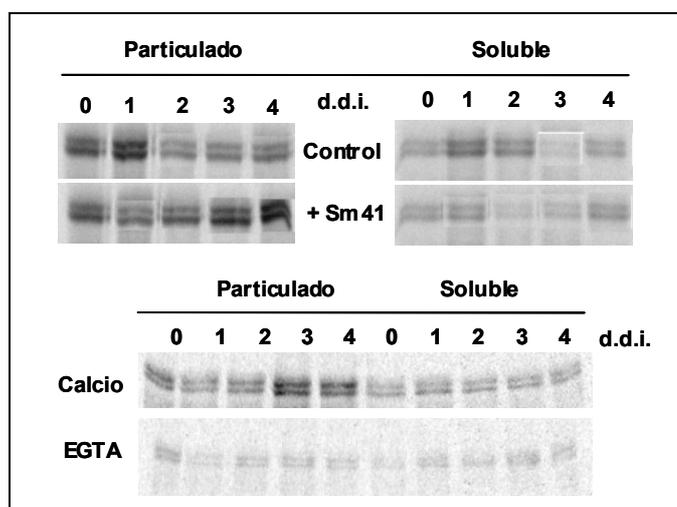


Figura 48 – Fosforilación de histona

La actividad de CDPKs fue determinada en raíces de *M. sativa* control e inoculadas en presencia de 1 mM calcio (panel superior) y en raíces inoculadas en presencia de 1 mM calcio o 1 mM EGTA (panel inferior).

Se utilizaron 2 μ g de extracto soluble y particulado como fuente de enzima. Las raíces fueron recolectadas a diferentes días después de la infección (1 a 4 d.d.i.).

4.6 – Localización subcelular de *MsCPK3* en células de cebolla

Dado que *MsCPK3* presenta sitios de miristoilación y palmitoilación en la región amino terminal, la acilación de la proteína podría promover su asociación a membranas (McCabe y Berthiaume, 1999; Thompson y Okuyama, 2000).

Para estudiar el rol de estos sitios en *MsCPK3* se bombardearon células epiteliales de cebolla con un vector que sobreexpresaba la proteína de fusión *MsCPK3::GFP* (proteína verde fluorescente) o versiones mutadas con el sitio de miristoilación y/o el sitio de palmitoilación alterados (Cys-3 por Gly-3 ó Gly-2 por Ala-2).

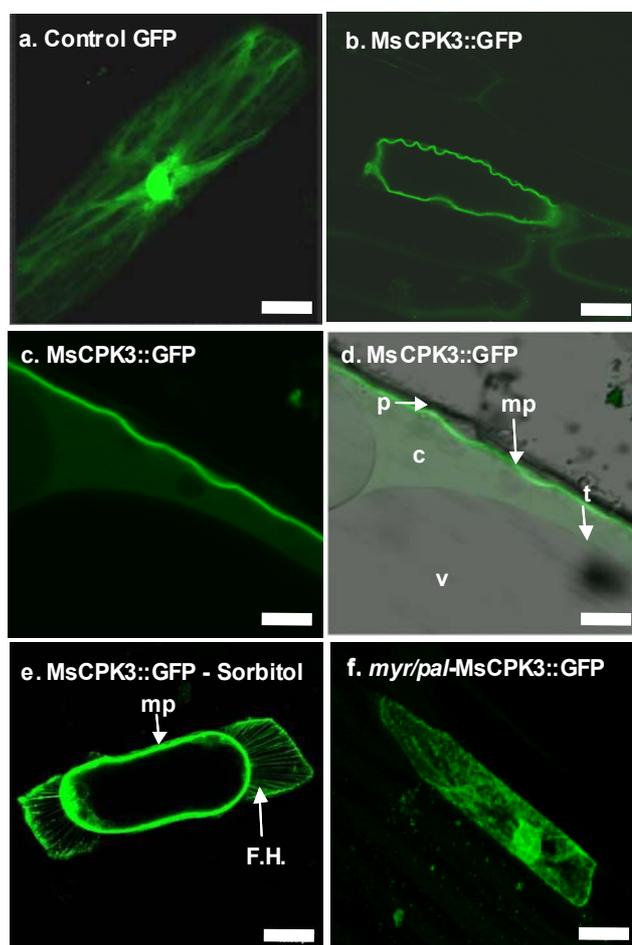


Figura 49 – Localización subcelular de *MsCPK3*-GFP en células epidérmicas de cebolla

MsCPK3 y sus mutantes en los sitios de palmitoilación y/o palmitoilación fueron expresadas transitoriamente bajo el control del promotor 2x35S como una proteína de fusión con la GFP en su extremo carboxilo terminal. Las imágenes fueron tomadas 24 horas luego del bombardeo.

a. Control GFP.

b. - d. *MsCPK3::GFP*.

e. Tratamiento de las células con 0,5 M de sorbitol. Se indican la membrana plasmática (mp) y los filamentos de Hechtian (F.H.) en una célula plasmolisada.

f. Mutantes *myr/palMsCPK3::GFP*.

Los paneles c y d son magnificaciones de b (barras: 8 μ m). La superposición mostrada en d permite confirmar la localización en la membrana plasmática (mp) de la proteína de fusión (p: pared celular; c: citoplasma; v: vacuola; t: tonoplasto).

Se realizaron tres bombardeos por cada construcción.

(Barras paneles a, b, e y f : 40 μ m).

El análisis de las imágenes del microscopio confocal mostró que la fusión *MsCPK3::GFP* se localizó en la periferia de la célula. La localización en la membrana plasmática fue posteriormente confirmada al tratar las células epidérmicas con sorbitol para producir la plasmólisis de la célula (Figura 49-e).

En contraste, las fusiones mutadas en uno o ambos sitios de acilación (miristoilación y palmitoilación) mostraron una deslocalización de la proteína *MsCPK3*.

Por lo tanto, la integridad de los consensos de miristoilación y palmitoilación son esenciales para la localización de las fusiones en la membrana plasmática de las células epidérmicas de cebolla. Esto sugiere que estas modificaciones postraduccionales podrían regular la localización subcelular de *CPK3*.

4.7 – Inmunolocalización de MtCPK3 en raíces de *M. truncatula*

El gen que codifica para MtCPK3 también presenta sitios consenso de miristoilación y palmitoilación en su secuencia 5´.

Debido a que se contaba con un anticuerpo específico para MtCPK3, se procedió a realizar un estudio de la inmunolocalización en raíces de plantas de *M. truncatula*.

La forma en puntos encontrada sugiere que MtCPK3 tenía una localización asociada a organelas (Figura 50). La asociación a membranas encontrada para MsCPK3 se correlaciona con la inmunolocalización de MtCPK3 dado que por el pequeño tamaño de los puntos detectados parece indicar que se encuentre asociada a las membranas de estas organelas. Sin embargo, la co-localización con marcadores específicos de organelas es necesaria para confirmar este dato.

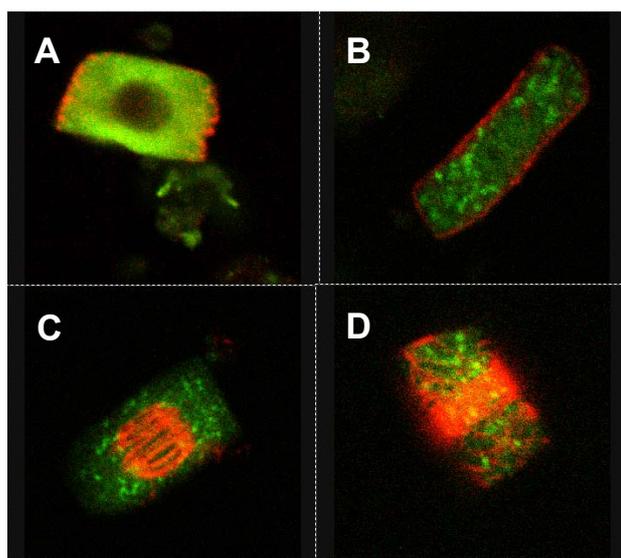


Figura 50 – Inmunolocalización de MtCPK3

En verde se observa la localización de MtCPK3 utilizando el anticuerpo específico, y en rojo se observa la localización de la tubulina alfa.

Se analizaron células en diferentes fases mitóticas: A) Preinmune, B) Telofase, C) Anafase v D) Profase.

4.8 – Expresión de *MtCPK3* en raíces de *M. truncatula* durante la nodulación

Las vías de transducción de señales mediadas por calcio son activadas en varios pasos durante la organogénesis de la nodulación, desde minutos (ej: se detectó un aumento de calcio a los 10 minutos luego del tratamiento con factores Nod; Oldroyd y Downie, 2006) hasta días luego de la infección donde ocurren

complejos cambios morfogénicos (ej: divisiones de las células corticales, reorganización del citoesqueleto). Se procedió a estudiar la expresión de *MtCPK3* en raíces de *M. truncatula* luego de la infección con la cepa salvaje *S. meliloti* Sm1021 desde tiempos muy cortos hasta ya establecida la infección (10 minutos hasta 14 días después de la infección).

Se observó un aumento de la expresión de *MtCPK3* a los 4 días de la interacción simbiótica que se correlacionaba con el determinado para la isoforma MsCPK3 de *M. sativa*. Además, se detectó un incremento (x20) transitorio de la expresión de *MtCPK3* a tiempos cortos post-infección (10 min-1 hora ddi), que se redujo a niveles basales a las 3 horas (Figura 51).

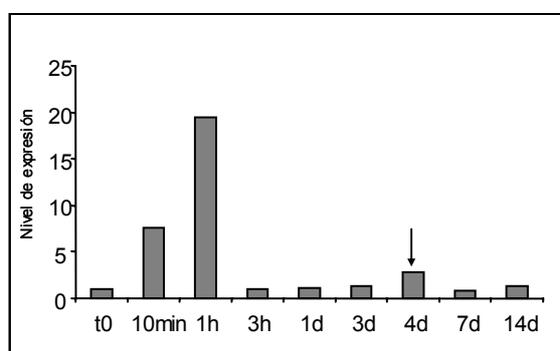


Figura 51 – Expresión de *MtCPK3* durante el proceso de nodulación

Las regiones inoculadas de las raíces de *M. truncatula* (A17) con Sm1021 fueron recolectadas a los tiempos indicados y se extrajo el ARN total. Se realizaron PCRs cuantitativas utilizando oligonucleótidos específicos de *MtCPK3* y oligonucleótidos específicos de *MsACTIN11* para normalizar las muestras. Se señala la inducción a 4 d.d.i. con una flecha.

Para estudiar si la inducción encontrada a los 4 días después de la infección era específica del proceso de nodulación, se analizó la expresión de *MtCPK3* en raíces de plantas de *M. truncatula* inoculadas con bacterias Nod-. Estas cepas mutantes no producen factores Nod, imprescindibles para el establecimiento de la infección.

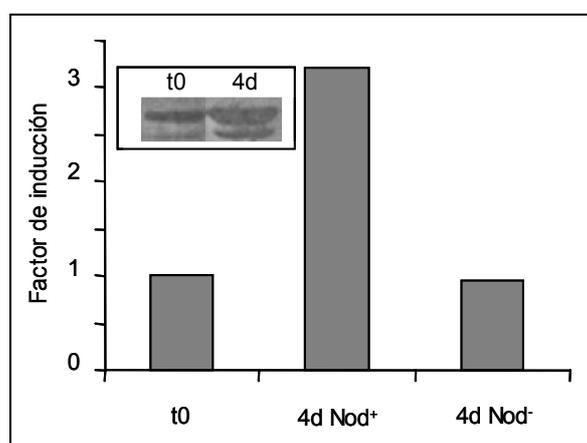


Figura 52 – Expresión de *MtCPK3* en plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* Nod-

PCR cuantitativas de raíces de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* Nod+ o Nod- y recolectadas a los 4 d.d.i. En el panel insertado se observa un ensayo de Western blot de extractos proteicos de raíces de plantas de *M. truncatula* utilizando un anticuerpo específico contra *MtCPK3* (1:1000).

En las raíces inoculadas con la cepa Nod- no se produjo la activación transcripcional de *MtCPK3* observada en las raíces inoculadas con la cepa Nod+ (capaz de llevar a cabo la infección) (Figura 52).

El análisis por Western blot de estas raíces inoculadas con la cepa Nod+ reveló un aumento en el contenido de proteína *MtCPK3* a los 4 d.d.i. que es concomitante con la formación del primordio nodular (Inserto Figura 52).

Esta inducción ocurre luego de la inducción de la expresión de *MtENOD40* (Figura 53), un marcador temprano de las divisiones de las células corticales (Crespi y col., 1994) que conducen a la formación del nódulo.

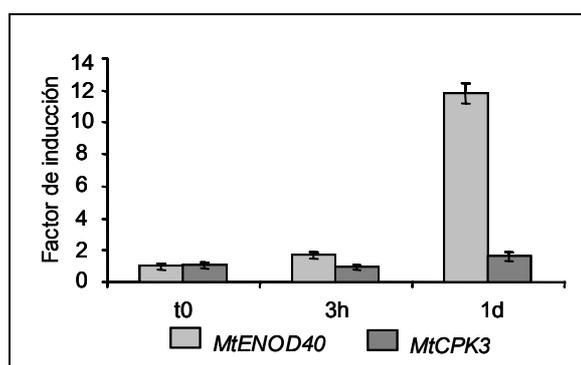


Figura 53 – Expresión comparativa entre *MtENOD40* y *MtCPK3* durante la nodulación.

Dada la correlación entre la inducción temprana de *MtCPK3* luego de la inoculación con *S. meliloti* y el aumento de la concentración de calcio a los pocos minutos del tratamiento con factores Nod, se estudió si la quinasa estaba directamente involucrada en las etapas tempranas de la nodulación. Para ello se analizó la expresión de *MtCPK3* a tiempos cortos (15 minutos) en plantas mutantes de *M. truncatula* denominadas dmi (“doesn’t make infection” – no producen infección) inoculadas con Sm1021.

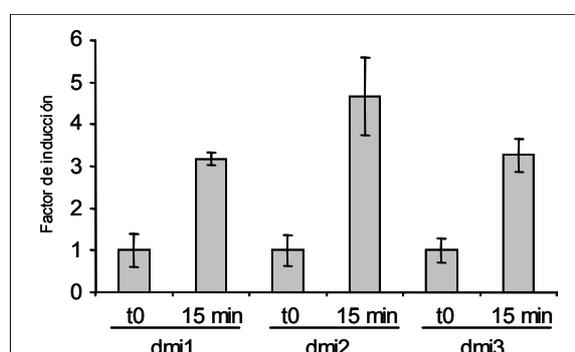


Figura 54 – Expresión de *MtCPK3* en plantas mutantes de *M. truncatula*

PCR cuantitativas de raíces de plantas mutantes dmi1, dmi2 y dmi3 sin inocular y luego de 15 minutos de inoculadas con Sm1021. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para *MtACTIN11* para normalizar las muestras. Para cada planta se tomó la expresión a t0 igual a 1.

Se encontró un aumento de entre 3 a 5 veces en la expresión de *MtCPK3* en todas las mutantes *dmi*, por lo que esta inducción temprana podría estar relacionada a una respuesta al estrés inducido por la infección y no estar directamente vinculada con el proceso de nodulación.

4.9 - Analisis de actividad CDPK en extractos de plantas inoculadas

Se determinó la actividad de CDPKs en plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* a diferentes tiempos post-infección.

Se evidenció una redistribución subcelular de la actividad CDPK al comparar las raíces control con las inoculadas. A los 3 días después de la infección (d.d.i.) se detectó un 43% de actividad CDPK en la fracción particulada, en comparación con el 22% presente en los controles (Tabla 5).

Tiempo luego de la inoculación	Actividad CDPK (%)			
	Raíces Control		Raíces Inoculadas	
	Soluble	Particulado	Soluble	Particulado
1 h.d.i.	90	10	63	37
1 d.d.i.	75	25	82	18
3 d.d.i.	78	22	57	43

Tabla 5 – Distribución de la actividad total de CDPK en extractos solubles y particulados

La actividad enzimática fue determinada utilizando 25 μ M Synthide-2 en presencia de 1 mM calcio o 1 mM EGTA. La actividad de CDPK es la diferencia entre las actividades determinadas en ambas condiciones. Se utilizaron 2 μ g de extracto proteico de raíces de *M. truncatula* inoculadas con Sm1021 o no. En cada tiempo, el 100% de actividad es la suma de las actividades determinadas para las fracciones particuladas y solubles. En todos los casos los extractos particulados contienen un 25% +/- 3% del total de proteína extraída.

Esto sugiere que la relocalización de la actividad de CDPK durante la nodulación podría también contribuir a la señalización del calcio en respuestas fisiológicas.

4.10 – Expresión de *MtCPK3* en raíces de *M. truncatula* ante diferentes estreses abióticos

Para comprobar si realmente existía una asociación entre *MtCPK3* y las respuestas a estrés se analizaron plántulas de *M. truncatula* de 5 días de edad sometidas a estreses abióticos: alta sal (100 mM de NaCl) o bajas temperaturas (4°C) durante 1 hora.

Se observó un incremento significativo en la expresión de *MtCPK3* (9 veces) luego del tratamiento con sal, mientras que no se encontraron diferencias en respuesta al frío (Figura 55).

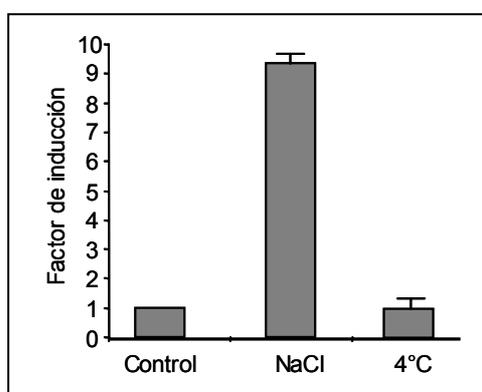


Figura 55 – Expresión de *MtCPK3* en raíces expuestas a condiciones de estrés

Plántulas de *M. truncatula* de 5 días de edad fueron colocadas en medio Fahreus suplementado o no con 100 mM NaCl e incubadas con agitación durante 1 hora a 24°C. Para el tratamiento con frío las plántulas fueron transferidas a 4°C durante 1 hora.

Para estudiar más en detalle la cinética de respuesta al estrés salino, se incubaron plántulas de *M. truncatula* con 100 mM de NaCl y se fueron recolectando las raíces a diferentes tiempos (15 minutos a 6 horas) (Figura 56).

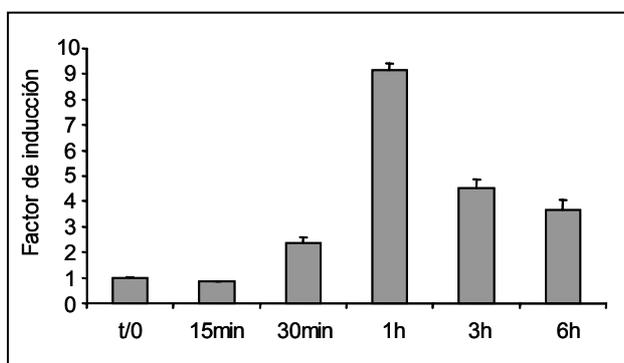


Figura 56 – Cinética de la expresión de *MtCPK3* en la respuesta al tratamiento con sal

PCR cuantitativa de raíces de plantas de *M. truncatula* incubadas en medio Fahreus suplementado con 100 mM NaCl e incubadas con agitación, utilizando oligonucleótidos específicos para *MtCPK3* y *MtACTIN11* como control constitutivo.

Se encontró que los niveles de *MtCPK3* alcanzaban su máximo a la hora de incubación y disminuía lentamente, siendo aún unas 4 veces superior al control luego de 6 horas.

Ensayos de Western blot revelaron que *MtCPK3* aumentaba a las seis horas del tratamiento con NaCl (Figura 57). Estos datos indican que *MtCPK3* es capaz de responder rápidamente ante un estrés abiótico, por lo cual la respuesta temprana a la inoculación con *S. meliloti* estaría asociada a este tipo de condición y no al proceso de nodulación.

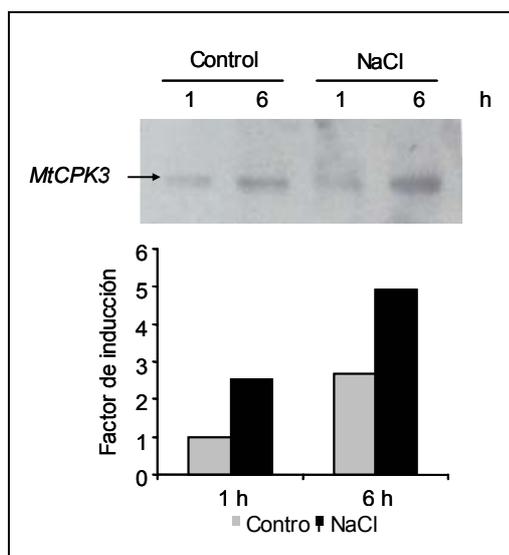


Figura 57 – Ensayo de Western blot luego del tratamiento con sal
Plántulas de *M. truncatula* de 3 días de edad fueron transferidas a medio Fahreus suplementado con 80 mM NaCl e incubadas durante 1 hora y 6 horas a 24°C. Se sembró 50 µg de extracto total de proteína y se utilizó un anticuerpo específico contra *MtCPK3* (1:1000).

Todo esto sugiere una participación tardía y específica de *MtCPK3* en el primordio del nódulo en desarrollo, a diferencia de la respuesta temprana relacionada a estrés que ocurre en las raíces infectadas.

4.11 – Expresión de *MtCPK3* en raíces de *M. truncatula* ante el tratamiento con citoquininas

Dado que las citoquininas imitan ciertas respuestas morfogénicas inducidas por rhizobia en la iniciación de la organogénesis nodular, se procedió a estudiar si *MtCPK3* podría estar ligada a la acción de las citoquininas en *M. truncatula*.

Se analizaron los niveles de expresión de *MtCPK3* luego del tratamiento con dos concentraciones de bencilaminopurina (BAP) a tiempos cortos (15 min a 6 horas).

Se observó una inducción transitoria de la expresión que alcanzó un máximo (x2,5) a los 30 minutos del tratamiento (Figura 58).

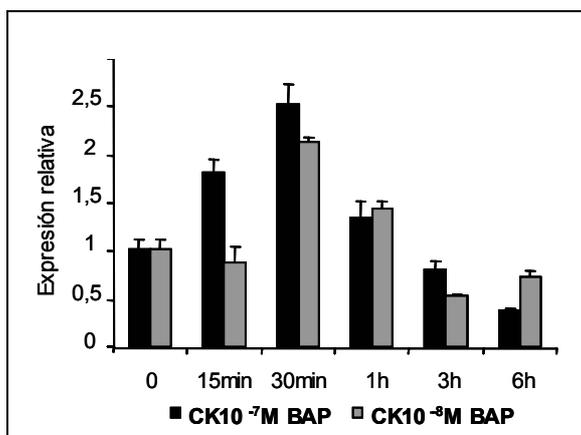


Figura 58 - Expresión de *MtCPK3* ante el tratamiento de raíces con BAP

PCR cuantitativa de muestras de *M. truncatula* tratadas con 10^{-7} y 10^{-8} M BAP durante 15 minutos hasta 6 horas. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para *MtCPK3* y para *MtACTIN11* como control para normalizar las muestras.

Además se evaluó la cantidad de MtCPK3 presente en los extractos proteicos mediante un ensayo de Western blot. Se utilizaron las mismas concentraciones de BAP y los tiempos analizados fueron a 1 y 6 horas de tratamiento.

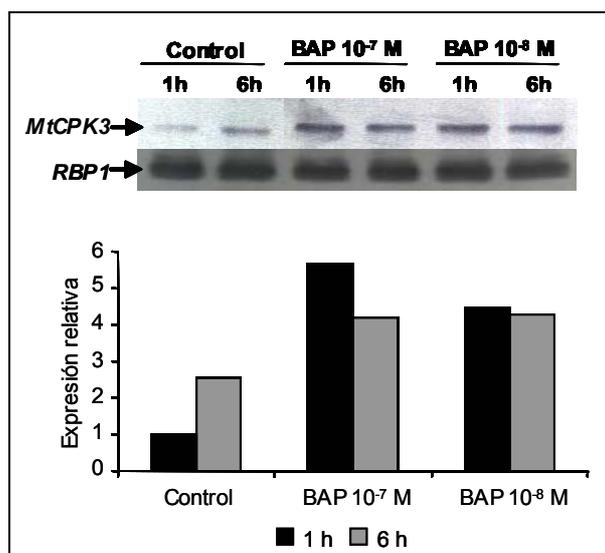


Figura 59 – Análisis por Western blot luego del tratamiento con BAP

Se extrajeron proteínas de raíces de *M. truncatula* tratadas con 10^{-7} y 10^{-8} BAP durante 1 y 6 horas, se sembraron 50 μ g de proteína total y se utilizó un anticuerpo específico para MtCPK3 (1:1000). Las cargas fueron normalizadas utilizando posteriormente un anticuerpo específico contra la proteína de unión al ARN (*MtRBP1*) (Campalans y col. 2004). La intensidad de las bandas fueron cuantificadas y graficadas.

El aumento a nivel proteico se correlacionó con la inducción observada a nivel del ARNm (Figura 59).

La activación fue más débil que la obtenida frente al estrés salino o a la infección bacteriana y no parece estar relacionada con una respuesta a estrés inducida por el tratamiento con hormonas, dado que los controles fueron tratados de manera similar excepto por la adición de hormona y el desarrollo de las raíces no se vio afectado a las concentraciones de BAP utilizadas a diferencia de las raíces estresadas abióticamente.

Estos datos indicarían que las citoquininas pueden modular la expresión de MtCPK3 a nivel de ARNm y de proteínas, sugiriendo que esta isoforma de CDPK podría estar vinculada a la inducción de las divisiones de las células corticales y a la formación del primordio nodular.

4.12 – Obtención de raíces transgénicas *MtCPK3-RNAi*

Para tratar de dilucidar la función de *MtCPK3* durante el proceso de nodulación se desarrollaron raíces transgénicas de *M. truncatula* para *MtCPK3*.

Se subclonó el extremo 5' de *MtCPK3* que abarca desde el dominio amino terminal variable hasta el subdominio II del dominio catalítico (≈ 300 pb) en el vector pFRN9 utilizando la tecnología Gateway (Invitrogen).

Esta construcción y otra control (pFRN9-GUS) fueron utilizadas para transformar *Agrobacterium rhizogenes* Arqua1 (Quandt y Hynes, 1993) con las cuales se generaron raíces transgénicas de *M. truncatula* A17.

El silenciamiento de MtCPK3 en las raíces transgénicas fue confirmado mediante ensayos de Western blot (Figura 60).

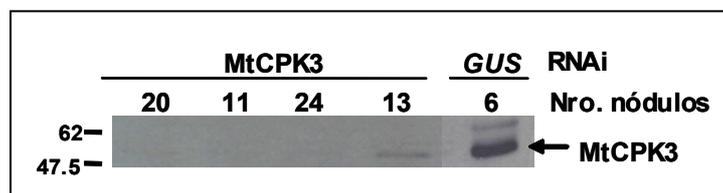


Figura 60 – Análisis de Western blot de raíces MtCPK3-RNAi

Se muestran diferentes líneas transgénicas independientes de MtCPK3-RNAi y del control con GUS. Se utilizó unos 50 μ g de extracto protéico y se utilizó un anticuerpo específico contra MtCPK3 (1:1000). Se indica el número de nódulos para cada raíz transgénica.

Recientemente Ivashuta y col. (2005) reportaron que el silenciamiento de otra CDPK de *M. truncatula*, *MtCDPK1*, resultaba en una reducción significativa del crecimiento de los pelos radiculares y del largo de las células de la raíz, estando también afectada la interacción simbiótica con hongos *Mycorrhizal* y bacterias *Rhizobium*.

En contraste, entre las 41 raíces transgénicas analizadas de MtCPK3-RNAi no se encontraron diferencias significativas en su fenotipo comparadas con los controles, ni se vio afectado el crecimiento de los pelos radiculares y el largo de las células de la raíz. Estas raíces transgénicas fueron luego inoculadas con la cepa

Sm1021 para estudiar si estaba afectado el proceso de la nodulación. Se encontró que el número de nódulos fue significativamente superior que aquel en las plantas control GUS-RNAi (Figura 61), sugiriendo que esta isoforma de CDPK participa en un control negativo del número de nódulos en *M. truncatula*.

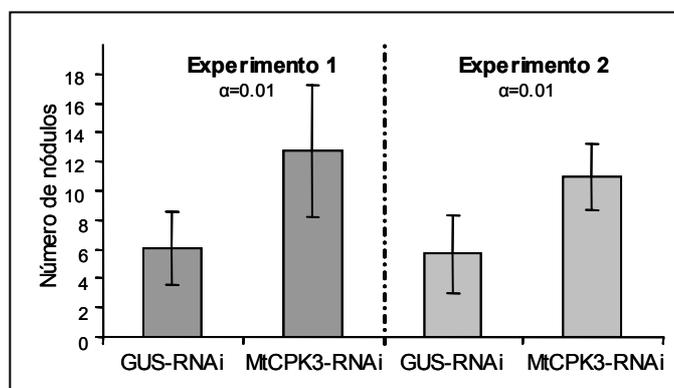


Figura 61 – Determinación del número total de nódulos en raíces transgénicas

Se determinó el número total de nódulos en dos experimentos independientes, luego de 15 días de la inoculación con *Sm1021*. Las barras de error representan un intervalo de confianza utilizado igual a 0.01.

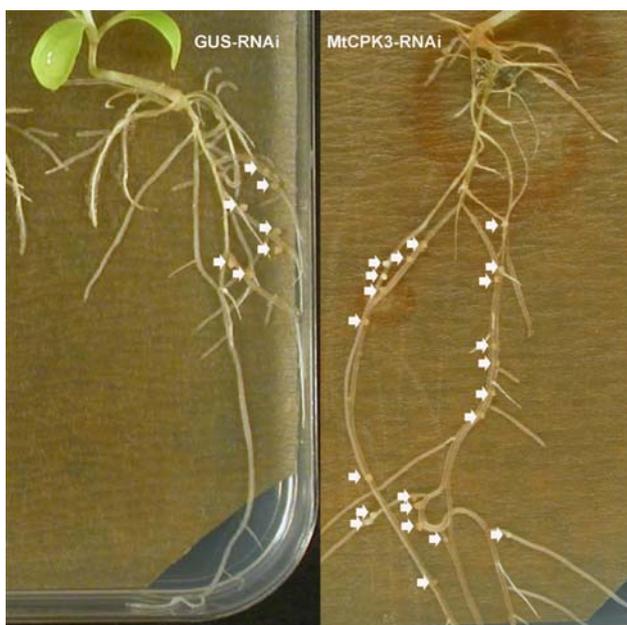


Figura 62 – Raíces transgénicas para MtCPK3-RNAi y GUS-RNAi

Se muestra una foto representativa de cada planta transgénica, señalándose con una flecha blanca la posición de los nódulos.

Luego se analizó la expresión de *MtCPK3* en plantas mutantes de *M. truncatula* denominadas *sunn* (super numeric nodules). Las raíces de las plantas *sunn* se inocularon con *S. meliloti* y fueron recolectadas a los 4 días. El análisis se realizó por PCR cuantitativa (Figura 63).

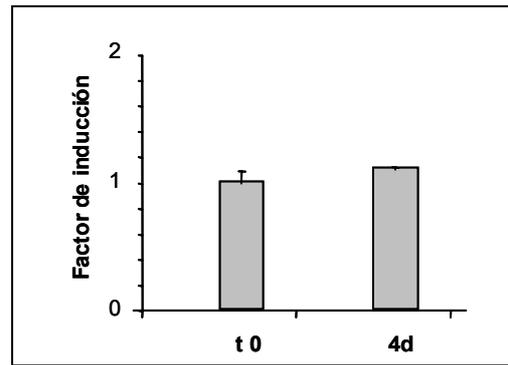


Figura 63 - Expresión de *MtCPK3* en plantas mutantes *sunn*

PCR cuantitativa de muestras de *M. truncatula* mutantes *sunn* luego de la inoculación con *Sm1021*. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para *MtCPK3* y para *MtACTIN11* como control para normalizar las muestras.

En contraste con las plantas salvajes, no se observó el incremento característico de la expresión de *MtCPK3* a los 4 días después de la infección.

Esto refuerza la idea de que la reducción de la expresión de *MtCPK3* estaría ligada a un incremento en la nodulación.

DISCUSIÓN

Obtención del clon genómico para StCDPK1

En el presente trabajo se obtuvo la primer secuencia genómica para una CDPK en plantas de *Solanum tuberosum*, a partir de la combinación de dos técnicas, rastreo de una biblioteca genómica y PCR, junto con la información previa de la secuencia codificante para StCDPK1 (Raíces y col., 2001). El armado final utilizando programas de comparación de secuencias dio como resultado una secuencia genómica de 5950 pares de bases desde el ATG hasta el codón terminador, conteniendo unos ocho exones y siete intrones (Figura 5).

Se realizó una comparación con otras secuencias genómicas de CDPKs de *Arabidopsis* y arroz (*Oryza sativa*) que presentan mayor homología a nivel aminoacídico. El peso molecular de las mismas es semejante en asociación con el número de aminoácidos que las componen y en 7 de las 9 secuencias comparadas se encuentra presente el sitio consenso de miristoilación en su región N-terminal. El tamaño total del clon genómico de StCDPK1 es el doble de las demás CDPKs analizadas, y esto es debido principalmente al tamaño de los intrones 1, 3 y 4, particularmente el tamaño del intrón 3 con 2301 pb (Tabla 2).

De acuerdo a la homología de secuencias se podría clasificar a StCDPK1 dentro del grupo II-a de las CDPKs (Asano y col., 2005). Asimismo, el análisis comparativo de la estructura génica de StCDPK1 con estas CDPKs indicó que comparten el tamaño de los exones 2 a 7 y la organización de 8exones-7intrones, por lo cual se podría sugerir que no solo la homología de secuencia sino la organización del gen es una característica del grupo.

Se podría afirmar que StCDPK1 forma parte de una familia multigénica, de hecho tres isoformas de CDPK se expresan diferencialmente durante el proceso de tuberización (Raíces y col., 2003). Datos de los proyectos genoma de arroz y *Arabidopsis* indican que los 29 genes de CDPK en arroz se encuentran distribuidos en los 12 cromosomas, a excepción del cromosoma 6 (Asano y col., 2005), y los 34 genes de CDPK de *Arabidopsis* en los 5 cromosomas. Utilizando la secuencia genómica de StCDPK1 y mediante la técnica de Polimorfismo Conformacional de Simple Hebra (SSCP - Single Strand Conformation Polymorphism), se determinó que la posición más probable de este gen es el extremo distal "inferior" del cromosoma 12 (Figura 9). En *Arabidopsis* se ha reportado que 5 genes de CDPK

pertenecientes al grupo II-a están organizados en tandem en el cromosoma 4 (Cheng y col., 2002, Hrabak y col., 2003), por lo cual sería interesante determinar si existe una organización similar en la región cromosómica circundante a StCDPK1. Se ha establecido un consorcio multinacional para la secuenciación completa del genoma de papa, lo cual aportará numerosos datos sobre la familia de CDPKs presente en esta *Solanacea*, ya que hasta el momento sólo se han identificado las 3 isoformas clonadas por nuestro grupo (Raices y col., 2003a).

En este proyecto participa Escocia a través del Scottish Crop Research Institute (SCRI); en colaboración con miembros de este instituto se intentará obtener la región promotora responsable de la expresión de este gen, lo cual serviría para profundizar el estudio de su regulación y poder conocer los posibles factores de transcripción que interactúen con ella durante la tuberización.

Producción de un anticuerpo policlonal que reconozca StCDPK1

Se obtuvo un anticuerpo policlonal contra la región N-terminal de StCDPK1. Hasta el momento es el único anticuerpo diseñado para reconocer una CDPK en plantas de papa.

La utilización del mismo en ensayos de Western blot confirmó la presencia de esta isoforma tanto en la fracción soluble como en la asociada a membranas de estadíos de tuberización (Figura 16). Los niveles fueron en aumento correlacionándose con el desarrollo del tubérculo, siendo superiores en aquellos estadíos más avanzados del desarrollo. Estos datos confirman lo observado anteriormente a nivel de la expresión de *StCDPK1* (Raices y col, 2001, Raices y col, 2003a).

La presencia de dos bandas en las fracciones particuladas podría indicar la existencia de modificaciones post-transduccionales, entre las cuales la autofosforilación de la enzima es una posibilidad. La autofosforilación o la fosforilación por otra quinasa es una característica de numerosas CDPKs de diferentes especies (Chehab y col., 2004; Hegeman y col., 2006) y en papa se observó la autofosforilación dependiente de calcio de una isoforma de CDPK purificada a homogeneidad (MacIntosh y col., 1996). Sin embargo, no podemos descartar que el anticuerpo esté reconociendo otra isoforma de CDPK presente en estas fracciones.

En cada estadio, la cantidad de enzima en la fracción particulada fue mayor que la presente en la fracción soluble, confirmando que esta isoforma puede asociarse a membranas. La presencia de sitios consenso funcionales de miristoilación y palmitoilación en la región N-terminal de StCDPK1 podría regular su asociación reversible a fracciones de membrana (Raíces y col, 2001, Raíces y col., 2003a). Este mecanismo ha sido descrito para diferentes CDPKs de otras especies (Martin y Busconi, 2000, Hraback y col, 2003).

Experimentos previos de expresión transitoria en células de cebolla demostraron que la miristoilación y la palmitoilación son necesarias para que StCDPK1 localice en la membrana plasmática (Raíces y col., 2003a). A su vez, cuando se utilizó el anticuerpo para inmunolocalizar la proteína en cortes histológicos de estadios de tuberización, se la encontró aparentemente asociada a membranas (Figura 18).

Las CDPKs presentan localizaciones subcelulares diversas (Chehab y col., 2004; Dammann y col., 2003; Lu y Hrabak, 2002; Martin y Busconi, 2000) lo que sería fundamental para regular la respuesta a las distintas señales de calcio presentes en la célula. En conjunto, nuestros datos señalan que StCDPK1 podría asociarse a membranas debido principalmente a la presencia de los sitios de miristoilación y de palmitoilación. Es tentador sugerir que la localización subcelular de esta isoforma podría regularse en respuesta a determinados estímulos permitiendo una regulación más fina de la señalización del calcio.

Luego del tratamiento con diferentes concentraciones de sacarosa se encontró un aumento gradual en la cantidad de StCDPK1 (Figura 17), que fue mayor en condiciones inductoras de tuberización (8%). Esto se correlaciona con datos previos donde *StCDPK1* se induce en respuesta a sacarosa pero no en respuesta a glucosa ni fructosa (Raíces y col., 2003b). La sacarosa ha sido reportada como inductora de la tuberización (Xu y col., 1998; Gibson, 2004; Raíces y col., 2003c), el hecho que esta quinasa sea un blanco de la acción de sacarosa apoyaría su participación en este proceso morfogénico.

Obtención de plantas transgénicas para StCDPK1

Mediante el clonado de la secuencia completa o de sólo la región N-terminal de StCDPK1 en vectores binarios, se procedió a transformar discos de papa *Solanum tuberosum*, obteniéndose plantas que presentan una expresión aumentada

o disminuía de StCDPK1. La expresión del transgén fue ubicua en toda la planta por utilizarse el promotor no específico 35S, o fue direccionada al tubérculo mediante el promotor específico de la GBSS (Granule Bound Starch Synthase).

El análisis de la expresión de StCDPK1 en las diferentes líneas mostró, como se esperaba, un aumento o una disminución de los niveles de ARNm específicos (Figura 28). Sin embargo no se pudo obtener una correlación en las construcciones α y δ ya que presentaron plantas tanto con alta o con baja expresión de StCDPK1, no pudiéndose determinar si era debido a un problema en la técnica de análisis o a una característica propia de la construcción. En el caso de la construcción γ , al poseer sólo una línea no se puede determinar si realmente la disminución en la expresión de StCDPK1 se debe a las características de la construcción utilizada.

Por su lado la construcción β presentó en dos de las tres líneas analizadas una disminución de StCDPK1 a nivel transcripcional. Esta disminución podría deberse a un silenciamiento parcial del gen endógeno provocado por la presencia de la secuencia incompleta. Sin embargo en este estudio no se analizó el mecanismo por el cual se obtuvieron plantas con expresión reducida. Al confrontar los datos de expresión a nivel transcripcional con los de expresión a nivel proteico se vio que sólo en el caso de la línea $\beta 7$ existía una correlación entre ambos (Figura 29).

No se encontraron diferencias a nivel morfológico entre la línea $\beta 7$ y la planta salvaje en plantas crecidas en condiciones de multiplicación *in vitro* o en tierra (maceta). Estas presentaron un crecimiento normal conservando el largo de los tallos y su número de entrenudos, así como el largo de las raíces y el contenido total de clorofila en sus hojas (Figuras 37, 38 y 39). Sin embargo las plantas de esta línea mostraron diferencias significativas cuando fueron cultivadas en condiciones de tuberización.

Cuando se analizó el efecto de las giberelinas, conocido inhibidor de la tuberización (Simko, 1994; Xu y col., 1998), sobre las diferentes líneas transgénicas cultivadas en condiciones inductoras de la tuberización se encontró en todos los casos estolones elongados que no habían iniciado el proceso de tuberización. Sin embargo, los estolones sin inducir de la línea $\beta 7$ presentaban una longitud menor que el resto, quizás indicando cierta insensibilidad a las giberelinas. Este efecto fue aún más notable al utilizar concentraciones mayores de giberelinas ($0,5 \mu\text{M}$) donde los estolones $\beta 7$ fueron 3,5 veces más cortos que los salvajes (Figura 31). La isoforma *OsCDPK13* de arroz se autofosforila en respuesta al frío y a GAs y se ha reportado que líneas antisentido eran más bajas que las plantas control. A su vez, mutantes enanas de arroz tenían disminuida la expresión de esta quinasa (Abbasi y col.,

2004). Estos datos sugieren que las CDPKs podrían participar en la transducción de la hormona.

Al utilizar un inhibidor de la síntesis de giberelinas como el CCC, que favorece la tuberización, se obtuvieron estadios inducidos a tuberizar en todas las líneas estudiadas (Tabla 4). Es destacable que si bien no se encontraron diferencias en el número de estadios inducidos, el peso de los $\beta 7$ fue un 30% mayor que el de los salvajes (Figura 30). Si como hemos sugerido, la línea $\beta 7$ es insensible al efecto de las giberelinas, el agregado de un inhibidor de la biosíntesis de las mismas no produciría una respuesta marcada en las características de los estadios desarrollados.

La sacarosa es fundamental para promover la tuberización *in vitro* (Simko, 1994; Xu y col., 1998) y además es capaz de inducir varios de los genes marcadores del proceso de tuberización (ej. Patatina, Inhibidor de Proteasa II, y Pirofosforilasa ADP-Glc). Al igual que las citoquininas, induce un aumento en los niveles de expresión de la CiclinaD (Riou-Khamlichi y col, 1999), sugiriendo que el azúcar podría jugar un papel importante modulando la división celular y el engrosamiento del estolón durante la diferenciación del tubérculo. Todas estas observaciones indican un rol central de la sacarosa en promover la tuberización.

En condiciones normales de tuberización *in vitro* (oscuridad y alta sacarosa), la línea $\beta 7$ presentó el 100% de sus plántulas inducidas a tuberizar a los 10 días del cultivo mientras que las plantas salvajes se encontraban todavía sin inducir (Tabla 4). Esto indicaría que esta línea responde más temprano a las condiciones inductoras. Asimismo, al analizar el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa sobre entrenudos de plantas control o de la línea $\beta 7$ se observó que el largo de los estadios sin inducir obtenidos con bajas concentraciones de sacarosa no variaba pero a concentraciones altas (8%) la longitud de los mismos era menor en las plantas $\beta 7$, sugiriendo una sensibilidad aumentada a la concentración de sacarosa. Esto es apoyado por el hecho que en 6% de sacarosa sólo las plantas $\beta 7$ desarrollaron estadios inducidos a tuberizar (Figura 33).

Como se menciona en la introducción, existen otras hormonas asociadas al proceso de tuberización tales como ABA y citoquininas (BAP). Los efectos de ambas fueron analizados en presencia de alta sacarosa. Mientras las GAs tuvieron un marcado efecto inhibitor sobre la tuberización, las otras hormonas promovieron la formación de estadios inducidos a tuberizar (Figura 34), como ya ha sido descrito

(Rodríguez-Falcón y col., 2006). En nuestras condiciones, el ABA tuvo un mayor efecto inductor que las citoquininas tanto en plantas control como en la línea transgénica (Figura 35).

No se encontraron diferencias muy significativas en el porcentaje de estadios inducidos entre las plantas salvajes o la línea $\beta 7$ cuando se cultivaron en presencia de ABA, aunque la línea $\beta 7$ presentó un 10 % más de estadios inducidos. Se ha reportado que ABA no es requerido para la inducción de la tuberización sino que actúa contrarrestando el efecto de las GAs (Xu y col., 1998), por lo cual en este caso observamos un resultado similar al tratamiento con CCC (Tabla 4). Tal antagonismo podría darse a nivel de los microtúbulos corticales, donde el ABA promueve un arreglo longitudinal de los microtúbulos y es capaz de revertir el efecto de GA_3 en la orientación de los mismos (Shibaoka, 1993).

Estudios de los efectos del ABA y los azúcares en una variedad de procesos de desarrollo han mostrado interacciones entre las vías de señalización que pueden ser antagónicas, sinérgicas o simplemente aditivas, dependiendo del proceso afectado y de la concentración y la estructura química del azúcar. En la tuberización tanto el ABA como la sacarosa promueven el desarrollo de tubérculos (Finkelstein y Gibson, 2002).

A su vez, el tratamiento con BAP indujo la tuberización tanto en las plantas salvajes como en las $\beta 7$, pero el porcentaje de estadios inducidos a tuberizar fue mayor ($\approx 40\%$) en la línea $\beta 7$ (Figura 35). Las citoquininas estimulan la expresión de la ciclina D y activan la división celular en *Arabidopsis* (Riou-Khamlichi y col, 1999) por lo que podrían estar involucradas en la proliferación celular durante las fases tempranas del desarrollo del tubérculo. Se ha sugerido que las citoquininas (BAP), actúan controlando el tamaño y desarrollo del tubérculo pero no son determinantes para la inducción (Rodríguez-Falcón y col, 2006). Aunque durante la inducción y en fases más tardías del desarrollo del tubérculo se ha observado un aumento en los niveles endógenos de citoquininas (Mauk y Langille, 1978; Obata-Sasamoto y Suzuki, 1979), el efecto promotor de la hormona sólo pudo observarse en presencia de alta sacarosa ($\geq 4\%$) (Palmer y Smith, 1970).

Numerosos trabajos postulan interacciones entre las vías de señalización de hormonas y señales metabólicas (ej: sacarosa). Muchos de los mediadores identificados genéticamente de estas interacciones son quinasas de proteínas o factores de transcripción que pueden regular la actividad de una variedad de proteínas o genes, respectivamente, dependiendo de otros reguladores en una

célula dada (Finkelstein y Gibson, 2002). Conociendo que la sacarosa promueve la expresión de *StCDPK1*, se determinaron los niveles de expresión relativos de esta quinasa ante la presencia de hormonas (ABA, BAP y GAs) en altas concentraciones de sacarosa (8%). Mientras que las plantas salvajes mostraron inducciones de entre 2 y 4 veces dependiendo de la hormona, en las plantas transgénicas $\beta 7$ no se observó ninguna modificación en los niveles de expresión (Figura 36). Podría sugerirse que las vías de señalización de sacarosa y hormonas se entrelazan en un punto, involucrando la presencia de *StCDPK1*.

Experimentos realizados en arroz estudiando las vías de señalización involucradas en el proceso de elongación en respuesta a giberelinas revelaron un importante incremento de la fosforilación dependiente de calcio de varios sustratos necesarios para este proceso. Los autores reportaron que una CDPK estaría mediando dicha fosforilación y la postulan como componente de esta vía (Khan y col., 2005). Ya trabajos previos habían reportado que la actividad de una CDPK asociada a membrana era fuertemente inducida (10 veces) por giberelinas durante la germinación de la semilla de arroz (Abood-el Saad y Wu, 1995). A su vez, Abbassi y col (2004) observaron que la expresión de *OsCDPK13* aumentaba en respuesta al frío y a GAs. Por otro lado, las isoformas *NtCDPK1* (Yoon y col., 1999) y *NtCPK4* de tabaco (Zhang y col., 2005) también se inducen en respuesta a GAs.

Para estudiar un poco más a fondo el efecto de las giberelinas sobre la expresión de *StCDPK1* en condiciones inductoras de la tuberización (8% sacarosa y oscuridad) se realizaron experimentos a diferentes tiempos (horas o días). Luego de 10 días de tratamiento se encontró un aumento (50%-100%) de la expresión relativa en las plantas salvajes (Figuras 36 y 40) como en la línea $\beta 7$ aunque, en éstas últimas, los niveles de ARNm detectados eran el 30% de los observados en las plantas control (Figura 40). En las plantas salvajes, a tiempos cortos (2hs), también se detectó una inducción (x3) de la expresión relativa de *StCDPK1*. Estos datos, junto a la respuesta disminuida de las plantas $\beta 7$ a GAs sugieren la participación de *StCDPK1* en la vía de transducción de esta hormona al igual que lo señalado para las isoformas de arroz y tabaco.

El análisis de la función de *StCDPK1*, a través del uso de plantas con expresión disminuida de la misma, conlleva ciertas complicaciones. *StCDPK1* pertenece a una familia multigénica cuyos miembros podrían tener funciones similares. Hasta el momento, los “*knockouts*” de genes quinasa no presentan un fenotipo obvio (Hrabak y col., 2003) ya sea porque la función de una determinada

isoforma puede ser llevada a cabo por otros miembros de la familia o porque se pueden haber omitido condiciones óptimas para identificar el fenotipo. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que StCDPK1 podría estar involucrada en la tuberización: su expresión y cantidad relativa aumenta en estolones inducidos (Figura 8, Introducción), y la sacarosa y las fitohormonas ABA y BAP (inductoras de la tuberización), estimulan su transcripción. Por otro lado su expresión es inducida por GAs (inhibidora del proceso), además las plantas $\beta 7$ con expresión disminuida de la quinasa presentan una tuberización más temprana y un peso promedio de los tubérculos mayor (30%), y presentan una respuesta disminuida a GAs. Estos datos hacen difícil interpretar el papel de StCDPK1 pero podría postularse que actúa como un regulador negativo del mismo a la luz de los datos aportados por las plantas transgénicas.

La tuberización, como muchos otros procesos de desarrollo en plantas, esta regulada por la disponibilidad de nutrientes, de azúcares solubles y por fitohormonas. Se postula que procesos como la embriogénesis, la germinación y el desarrollo temprano de la semilla, la regulación de la actividad α -amilasa y la tuberización son regulados vía interacciones o “*cross-talk*” entre azúcares y fitohormonas. Se ha sugerido que la tuberización es la resultante de un balance entre señales inductoras (sacarosa, ABA, CK) e inhibidoras (GAs) del proceso (Jackson, 1999, Fernie y Willmitzer, 2001). Podría pensarse a StCDPK1 como un blanco de estas señales.

A su vez, como ya mencionamos, las citoquininas y las GAs participan en el control de la elongación y el crecimiento. No podría descartarse que StCDPK1 sea un componente de la señalización de procesos de crecimiento.

CDPKs en el proceso de nodulación

En esta parte del trabajo se identificó un gen de la familia de CDPKs en *Medicago truncatula*, el cual está estrechamente relacionado con *MsCPK3* de *Medicago sativa* (Davletova et al., 2001). El clon completo, designado *MtCPK3* (Genbank DQ454073), tiene un marco de lectura abierto de 1617 pb desde el ATG hasta el codón terminador, codificando una proteína de 538 aminoácidos con un peso molecular estimado de 60,6 kDa. *MtCPK3* presenta los subdominios característicos I al XI de quinasas de serina y treonina (Hanks y Quinn, 1991), el

dominio autoinhibitorio y los cuatro sitios de unión a calcio (EF-hand) del dominio similar a calmodulina (Figura 42).

Muchos genes de CDPK se expresan en la mayoría de los tejidos de la planta, tal es el caso de la isoforma *MtCPK1* de *M. truncatula* (Ivashuta y col., 2005), sin embargo otras isoformas presentan una expresión tejido-específico que puede depender de las condiciones del entorno (Hrabak, 2000). *MtCPK3* y *MsCPK3* se expresan principalmente en raíces en desarrollo confirmando los datos aportados por las secuencias consenso tentativas (TC) TC101857 y TC103686 a partir de donde se obtuvo la secuencia completa de esta isoforma (Figura 43).

Mediante la utilización de un anticuerpo policlonal específico dirigido contra un péptido del dominio aminoterminal variable se reconocieron dos bandas específicas de 60 y 63 kDa en extractos crudos de proteínas de raíces. Cuando se analizaron fracciones solubles y particuladas de raíces se revelaron dos bandas en la fracción citosólica siendo predominante la banda de mayor PM, mientras que en la fracción particulada estaba presente sólo la de mayor movilidad (Figura 44). Las diferentes bandas encontradas en la fracción soluble podrían corresponder a diferentes isoformas de CDPK, o también podrían ser versiones modificadas post-traduccionalmente de la misma quinasa, ya que se ha descrito que la proteína recombinante *MsCPK3* es capaz de autofosforilarse de manera dependiente de calcio (Davletova y col. 2001). La autofosforilación intramolecular en los residuos serina/treonina puede modular la actividad enzimática de las CDPKs como ya ha sido demostrado para *NtCDPK2* (Romeis y col, 2001).

A fin de comprobar si éste era el caso, se incubó la fracción soluble con Fosfatasa Alcalina (CIAP – Invitrogen) y se analizó por Western blot. Aunque luego del tratamiento se detectaron dos bandas, la banda de mayor PM mostró un cambio en su movilidad (Figura 44). Se ha reportado que ciertas quinasas son parcialmente resistentes a la desfosforilación por fosfatasas (Humphries y col. 2005), podría inferirse que éste es un caso similar. Estos datos sugieren una transición dependiente de fosforilación entre estas dos formas, como se reportó para otras CDPKs (Romeis y col., 2001), sin embargo no se puede descartar que otras modificaciones post-traduccionales puedan afectar la movilidad de *MtCPK3*.

Los ensayos de RT-PCR semicuantitativos revelaron que *MsCPK3* se induce a los 3-4 días después de la infección (momento en el cual se detecta un primordio temprano del nódulo), no detectándose transcritos de otras isoformas al utilizar oligonucleótidos diseñados contra regiones conservadas de CDPKs (Figura 47).

Coordinadamente con este aumento de expresión se observó que la actividad quinasa dependiente de calcio aumentó en la fracción particulada de raíces de alfalfa inoculadas con *Rhizobia* (Figura 48). A su vez, se detectó un cambio en la distribución de actividad CDPK en raíces inoculadas de *M. truncatula* (Tabla 5) que se correlacionó temporalmente con el incremento de expresión de *MtCPK3* (Figura 51). Estos resultados sugieren que estas isoformas pueden participar en los eventos de fosforilación dependientes de calcio que ocurren durante la formación del nódulo.

Las CDPKs forman una familia multigénica, sin embargo cada una de ellas puede participar en una vía de señalización específica; dicha especificidad puede lograrse a través de sus características cinéticas (Km), por patrones estrictos de expresión espacio-temporal o por la localización subcelular de cada isoforma. La acilación post-traducciona es determinante para la localización subcelular de una variedad de proteínas. Tanto la miristoilación como la palmitoilación de la proteína de fusión CPK3::GFP son necesarias para la localización en membrana plasmática de esta isoforma (Figura 49) como ya se mencionó para otras CDPKs incluyendo StCDPK1. La miristoilación co-traducciona permite la posterior palmitoilación, mecanismo dinámico y reversible. La redistribución de la actividad CDPK durante de la formación del nódulo sugiere que, *in vivo*, estos mecanismos de acilación podrían regular la ubicación de CPK3 logrando así la especificidad requerida.

Los ensayos de RT-PCR cuantitativa confirmaron el aumento del ARNm de CPK3 a los 4 días después de la infección (Figura 51), pero también se detectó una inducción temprana a los 10-15 minutos que se correlacionaba con los incrementos tempranos del calcio en respuesta a los factores Nod (Wais y col., 2002). Sin embargo, cuando realizamos experimentos utilizando las plantas mutantes *dmi* (doesn't make infection) se encontró que esa inducción no estaba directamente relacionada con el proceso de nodulación sino que podría estar asociada a una respuesta al estrés inducido por la infección (Figura 54). En efecto, se ha reportado la inducción de los consensos tentativos TC101857 y TC103686 en cultivos celulares de raíces tratados con extractos de pared celular de levadura o en raíces tratadas con oligogalacturónidos, inoculadas con *Phytophthora medicaginis*, colonizadas con *Glomus versiforme* y en respuesta a la infección con áfidos (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/mta1/>). En la primera fase de la interacción simbiote, luego de la colonización de la raíz, los rhizobios inducen una respuesta de defensa contra un amplio espectro de patógenos (Verhagen y col., 2004), sin embargo se ha sugerido que para lograr una eficiente colonización, podrían luego suprimir esta respuesta defensiva (García-Garrido and Ocampo, 2002; Mithofer, 2002).

Además hemos observado que *MtCPK3* se induce ante un estrés salino de manera similar a lo encontrado para *AtCDPK1* y *AtCDPK2* (Urao y col., 1994), *OsCDPK7* (Saijo y col., 2000) y *McCDPK1* (Patharkar y Cushman, 2000), pero no se induce al exponer las plantas a bajas temperaturas (Figura 55). El calcio es una señal común a muchas vías de señalización dado que aumenta en respuesta a numerosos estreses abióticos, de desarrollo, hormonales y bióticos (Sanders y col., 2002). Por lo tanto, esta quinasa dependiente de calcio podría estar involucrada en la respuesta a diferentes estreses.

Sin embargo, la segunda activación observada a los 3-4 días luego de la infección es específica de la nodulación y no se encontró en raíces control o en raíces infectadas con bacterias deficientes de la nodulación (Figura 52).

Además de las señales exógenas, las señales endógenas, como las hormonas vegetales, son importantes para el correcto desarrollo del nódulo. En particular, la inducción de la organogénesis del nódulo puede ser mediada por cambios locales en la relación auxinas/citoquininas (Hirsch y Fang, 1994). La transformación de cepas de *S. meliloti* deficientes en factores Nod, con un gen de la síntesis de citoquininas (el gen de secreción de trans-zeatin) le confiere la habilidad de inducir estructuras similares a nódulos en las plantas de alfalfa (Cooper y Long, 1994). Más aún, el tratamiento con citoquininas induce rápidamente la expresión de ENOD2 en plantas de *Sesbania rostrata* (Dehio y de Bruijn, 1992) y divisiones de las células corticales e inducción de ENOD12 y ENOD40 en plantas de alfalfa (Bauer y col., 1996; Fang y Hirsch, 1998). La aplicación exógena de citoquininas también indujo la expresión de ENOD40 en raíces de trébol blanco de forma similar a la inducción por factores Nod (Mathesius y col., 2000) y aumentó la nodulación en raíces de arveja (Lorteau y col., 2001). Finalmente, el análisis funcional de las oxidasas de citoquininas en *Lotus japonicus* confirmó el rol central de las mismas en la regulación de la nodulación (Lohar y col., 2004).

Algunos años atrás se reportó que la adición de citoquininas inducía un incremento en el calcio citosólico en el musgo *Funaria hygrometrica* (Hahm y Saunders, 1991) y que los inhibidores de calmodulina y los antagonistas del calcio bloqueaban la formación de brotes en *Funaria* (Saunders y Hepler, 1983). Los inhibidores de calmodulina y los antagonistas del calcio inhiben la actividad de CDPK (Harper y col., 2004, Figura 46) por lo tanto podría postularse que una CDPK está involucrada en la respuesta a citoquininas en *Funaria*. Recientemente, el tratamiento con citoquininas indujo la expresión de *NtCDPK1* de tabaco (Yoon y col., 1999). Nuestros resultados demostraron que la expresión de CPK3 es rápidamente

regulada por citoquininas en raíces de *M. truncatula* (Figuras 58 y 59), sugiriendo que esta isoforma podría ser un componente común en las señales de transducción disparada por *Rhizobium*, citoquininas y estrés abiótico.

La función de CPK3 en la interacción entre *M. truncatula* – *S. melloti* fue explorada utilizando una estrategia de RNAi. Las raíces transgénicas crecieron normalmente y produjeron nódulos fijadores de nitrógeno, sin embargo su número fue significativamente mayor (hasta 28 nódulos por planta) que en las plantas control (6 nódulos en promedio) (Figura 61 y 62). Es destacable que el aumento de expresión de MtCPK3 a los 4 días no se observó en las mutantes supernodulantes *sun*. Estos resultados sugieren que CPK3 podría estar involucrada en el control del número de nódulos. En la nodulación, la planta puede controlar y optimizar la iniciación de este proceso de desarrollo (Gresshoff, 2003) para mantener la relación carbono/nitrógeno apropiada. La inhibición de la formación de nódulos radiculares en las leguminosas por nódulos ya existentes es conocida como autorregulación, la cual parece depender del número de nódulos y no de su capacidad fijadora de nitrógeno.

En varias leguminosas se han identificado receptores quinasa putativos involucrados en la autorregulación (Krusell y col., 2002; Nishimura y col., 2002; Searle y col., 2003; Penmetsa y col., 2003). Recientemente, van Noorden y col. (2006) demostraron que las mutantes *sun* tenían incrementado el transporte de auxinas desde el tallo hacia la raíz en comparación con las plantas salvajes. Luego de la inoculación, las semillas salvajes mostraron una disminución de la acumulación de auxinas, sin embargo las mutantes *sun* no lo hicieron. Los autores proponen un nuevo modelo para el rol de las auxinas durante la autorregulación: (1) altos niveles de auxinas endógenas están correlacionados con el incremento del número de nódulos, (2) la inoculación de raíces reduce la acumulación de auxinas desde el tallo hacia la raíz y (3) esa reducción en los niveles de auxinas en las raíces inhibe subsecuentemente la iniciación de los nódulos.

En esta Tesis se demostró que la expresión de *MtCPK3* es estimulada por citoquininas (Figura 58 y 59) y a su vez Davletova y col. (2001) observaron que *MsCPK3* (su homólogo en alfalfa) es rápidamente estimulada por auxinas en suspensiones celulares. A la luz de estos datos se podría especular que CPK3 responde a una determinada relación auxinas:citoquininas en las raíces de leguminosas. En el caso de los mutantes *sun*, esta relación está alterada, por lo cual la quinasa no respondería y no se regularía el número de nódulos.

Las vías de señalización disparadas por estos receptores quinasa involucran posiblemente cascadas de fosforilación y MtCPK3 podría ser un componente

relevante en este escenario. De acuerdo a Wopereis y col. (2000) la respuesta de autorregulación se debe en parte al mecanismo de sensado y regulación de la división celular en relación con la formación de un órgano de reserva. Este proceso ha sido relacionado con la acción de las citoquininas y los procesos de comunicación célula a célula (Bauer y col., 1996; Complainville y col., 2003). El hecho de que la expresión de *MtCPK3* es regulada tanto por la nodulación como por las citoquininas, además de la evidencia revelada por las raíces transgénicas, sugiere que esta quinasa podría regular negativamente la acción de señales vegetales que controlan la relación entre los tejidos proveedores de energía (hojas fotosintéticas) y los de reserva (nódulos en las raíces).

Es necesario realizar otros experimentos para entender mejor la regulación de esta quinasa, sin embargo nuestros datos refuerzan la importancia de las proteínas que unen calcio durante el proceso de nodulación de *Medicago truncatula*. Junto a la quinasa de proteína dependiente de calcio independiente de calmodulina DMI3 (Lévy y col., 2004; Mitra y col., 2004) y a la familia de proteínas similares a calmodulina (CaMLKs) expresadas específicamente en los nódulos radiculares (Liu y col., 2006), *MtCPK3* sugiere la complejidad de las cascadas de la señalización del calcio que son necesarias para regular el desarrollo del nódulo.

CONCLUSIONES:

En esta tesis se ha investigado la participación de dos isoformas de CDPKs en procesos de desarrollo. De manera general, la formación de órganos vegetales esta condicionada por estímulos ambientales y hormonales, tal es el caso de la formación del tubérculo en la planta de papa, *Solanum tuberosum*, y de la formación de nódulos simbióticos en las raíces de leguminosas. Ambos procesos se originan como un pozo de carbono, las células iniciales del órgano en formación presentan una gran acumulación de amiloplastos, y son regulados por carencia de nitrógeno. En los nódulos el exceso de carbono es acumulado como almidón antes de la fijación de nitrógeno, particularmente durante las etapas tempranas de desarrollo (Forrest y col., 1991), y es luego utilizado en condiciones limitantes de fotosintatos. Podría existir una cierta analogía entre los mecanismos moleculares responsables de la formación de nódulos en leguminosas y de tubérculos en papa aunque no existan relaciones anatómicas particulares entre ambos órganos.

El crecimiento y desarrollo de las plantas están determinados por el tamaño y la forma de las células, lo que refleja una variación tejido específica en la composición de la pared celular y la matriz extracelular (Knox, 1990), además de un re-arreglo a nivel celular de microtúbulos y otras estructuras intracelulares. El análisis de mutantes de señalización en combinación con estudios de aplicaciones exógenas de hormonas, han concluido que las giberelinas, auxinas y brasinosteroides (BR) regulan la expansión a través de los ejes longitudinales e influyen enormemente en la estatura de la planta y el tamaño de los órganos. Por otro lado, el etileno y las citoquininas actúan principalmente aumentando la expansión celular a través de los ejes transversales y reducen de forma notable la estatura de plantulas crecidas en oscuridad. Se ha demostrado que el ácido abscísico antagoniza el crecimiento estimulado por GA y BR (revisado en Nemhauser y col., 2006). Ambos procesos estudiados están regulados por múltiples señales hormonales y posiblemente el desarrollo del tubérculo o del nódulo surja de un balance entre los diferentes efectores.

Las vías de transducción de señales constituyen complejas redes, donde coexisten múltiples puntos de convergencia y divergencia que permiten una integración de la señal a diferentes niveles. Se considera que la señalización mediada por CDPKs opera a tres niveles: a) diferentes estímulos por estrés pueden inducir respuestas del calcio en ciertas partes de la célula; b) estas variaciones en las concentraciones del calcio activarán isoformas específicas de CDPK, las cuales

pueden ser expresadas diferencialmente en la planta. Dependiendo de la señal de calcio, el grado y duración de la activación enzimática de la CDPK variará, con un efecto directo en el estado de fosforilación de sus sustratos; c) las CDPKs muy probablemente participen en el “cross-talk” entre las vías de señalización.

Los miembros de la superfamilia de CDPK han sido implicados en diversos procesos biológicos como es esperado para una familia de quinasas multifuncionales con múltiples sustratos. Debido a estas características y por sobre todo a una posible redundancia (Sheen, 1996), no se puede asignar una función fisiológica clara a las isoformas de CDPK basándonos en el análisis fenotípico de líneas “knockout” simples, sino que se necesitaría de la inactivación simultánea de las CDPKs altamente homólogas (Ludwig y col., 2004).

Nuestros datos relacionan espacio-temporalmente a estas isoformas con un proceso de desarrollo específico, indican que las mismas son capaces de responder a hormonas reguladoras de estos procesos y sugieren que ambas isoformas pueden regular su localización subcelular. En cada caso la disminución de la isoforma conlleva a un aumento del número de nódulos o a una tuberización más temprana sugiriendo que estas quinasas actuarían como reguladores negativos en ambos procesos. No podemos olvidar la complejidad de los procesos estudiados y los datos obtenidos reafirman dicha complejidad. La observación que isoformas específicas de CDPK pueden llevar a cabo respuestas específicas indica que estas isoformas diferentes tienen funciones distintivas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi F, Onodera H, Toki S, Tanaka H, Komatsu S.** (2004) OsCDPK13, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced by cold and gibberellin in rice leaf sheath. *Plant Mol Biol.* 55:541-52.
- Abdala, G., Guñazú, M., Tizio, R., Pearce, D.W., Pharis, R.P.** (1995) Effect of 2-chloroethyl trimethyl ammonium chlorides on tuberization and endogenous GA3 in roots of potato cuttings. *Plant Growth Regul.* 17:95-100.
- Abo-el-Saad, M. y Wu, R.** (1995) A rice membrane calcium-dependent protein kinase is induced by gibberellin. *Plant Physiol.* 108:787-93.
- Albrecht, C., Geurts, R., Bisseling, T.** (1999) Legume nodulation and mycorrhizae formation; two extremes in host specificity meet. *EMBO J.* 18:281-8.
- Amor, B.B., Shaw, S.L., Oldroyd, G.E., Maillet, F., Penmetsa, R.V., Cook, D., Long, S.R., Denarie, J., Gough, C.** (2003) The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J.* 34:495-506.
- Ané, J.M., Kiss, G.B., Riely, B.K., Penmetsa, R.V., Oldroyd, G.E., Ajax, C., Levy, J., Debelle, F., Baek, J.M., Kalo, P., Rosenberg, C., Roe, B.A., Long, S.R., Denarie, J., Cook, D.R.** (2004) *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science.* 303:1364-7.
- Anil, V.S., Harmon, A.C., Rao, K.S.** (2000) Spatio-temporal accumulation and activity of calcium-dependent kinases during embryogenesis, seed development, and germination in sandalwood. *Plant Physiol.* 122:1035-43.
- Appeldoorn, N.J.G, de Bruijn, S.M., Koot-Gronsveld E.A.M., Visser R.G.F., Vreugdenhil D., van der Plas L.H.W.** (1997) Developmental changes of enzymes involved in conversion of sucrose to hexose-phosphate during early tuberization of potato. *Planta* 202:220-26.
- Asamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S., Tabata, S.** (2005) Comparison of the transcript profiles from the root and the nodulating root of the model legume *Lotus japonicus* by serial analysis of gene expression. *Mol Plant Microbe Interact.* 18:487-98.
- Asano, T., Tanaka, N., Yang, G., Hayashi, N., Komatsu, S.** (2005) Genome-wide identification of the rice calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase gene families: comprehensive analysis of the CDPKs gene family in rice. *Plant Cell Physiol.* 46:356-66
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G.** (1996) *En: Current Protocols in Molecular Biology.*
- Bachmann, M., Shiraiishi, N., Campbell, W.H., Yoo, B.C., Harmon, A.C., Huber, S.C.** (1996) Identification of the major regulatory phosphorylation site as Ser-543 in spinach leaf nitrate reductase and its phosphorylation by a calcium-dependent protein kinase in vitro. *Plant Cell,* 8:505-17.
- Ball KL, Dale S, Weekes J, Hardie DG.** (1994) Biochemical characterization of two forms of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase kinase from cauliflower (*Brassica oleracea*). *Eur. J. Biochem.* 219:743-50.
- Balamani, V., Veluthambi, K., Poovaiah, B.W.** (1986) Effect of calcium on tuberization in potato. *Plant Physiol.* 80: 856-58.
- Bandara, P.M.S. y Tanino, K.K.** (1995) Paclobutrazol enhances minituber production in Norland potatoes. *J. Plant Growth Regul.* 14:151-55.
- Banfalvi, Z., Molnar, A., Molnar, G., Lakatos, L., Szabo, L.** (1996) Starch synthesis, and tuber storage protein genes are differently expressed in *Solanum tuberosum* and in *Solanum brevidens*. *FEBS Lett.* 383:159-164.
- Barker JHA, Slocombe SP, Ball KL, Hardie DG, Shewry PR, Halford NG.** (1996) Evidence that barley HMG-CoA reductase kinase is a member of the SNF1-related protein kinase family. *Plant Physiol.* 112:1141-49.
- Barnett, M.J., Toman, C.J., Fisher, R.F., Long, S.R.** (2004) A dual-genome Symbiosis Chip for coordinate study of signal exchange and development in a prokaryote-host interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:16636-41.
- Bateman, A., Bycroft, M.** (2000) The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *J Mol Biol.* 299:1113-9.
- Battey N.H.** (1990) Calcium-activated protein kinase from soluble and membrane fractions of maize coleoptiles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170:17-22.
- Bauer, P., Ratet, P., Crespi, M.D., Schultze, M., Kondorosi, A.** (1996) Nod-factors and cytokinins induce similar cortical cell divisions, amyloplast deposition and MsENOD12A expression patterns in alfalfa roots. *Plant J.* 10:91-105.
- Baxter, I., Tchieu, J., Sussman, M.R., Boutry, M., Palmgren, M.G., Gribskov, M., Harper, J.F., Axelsen, K.B.** (2003) Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* 132:618-28.

- Berkowitz, G., Zhang, X., Mercier, R., Leng, Q., Lawton M.** (2000) Co-expression of calcium-dependent protein kinase with inward rectified guard cell K⁺ channel KAT1 alters current parameters in *Xenopus laevis* oocytes. *Plant Cell Physiol.* 41:785-90.
- Bonierbale, M.W., Plaisted, R.L., Pineda, O., Tanksley, S.D.** (1994) QTL analysis of trichome-mediated insect resistance in potato. *Theor Appl Genet* 87:973-87.
- Botella, J.R., Arteca, J.M., Somodevilla, M., Arteca, R.N.** (1996) Calcium-dependent protein kinase gene expression in response to physical and chemical stimuli in mungbean (*Vigna radiata*) *Plant Mol. Biol.* 30:1129-37.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Breviaro D, Morello L, Giani S.** (1995) Molecular cloning of two novel rice cDNA sequences encoding putative calcium-dependent protein kinases. *Plant Mol Biol.* 27:953-67.
- Bush, D.S.** (1995) Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:95-122.
- Caetano-Anolles, G. y Gresshoff, P.M.** (1991) Plant genetic control of nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 45:345-82.
- Campalans, A., Kondorosi, A. y Crespi, M.** (2004). Enod40, a short open reading frame-containing mRNA, induces cytoplasmic localization of a nuclear RNA binding protein in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 16:1047-59.
- Carrera, E., Bou, J., Garcia-Martinez, J.L., Prat, S.** (2000) Changes in GA 20-oxidase gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants. *Plant J* 22:247-56.
- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R.V., Journet, E.P., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C., Denarie, J.** (2000) Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell.* 12:1647-66.
- Chapman, H.W.** (1958) Tubercization in the potato plant. *Physiol. Plant.* 11:215-24.
- Chehab, E.W., Patharkar, O.R., Hegeman, A.D., Taybi, T., Cushman, J.C.** (2004) Autophosphorylation and subcellular localization dynamics of a salt- and water deficit-induced calcium-dependent protein kinase from ice plant. *Plant Physiol.* 135:1430-46.
- Cheng, S-H., Willmann, M.R., Chen, H-C., Sheen, J.** (2002) Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol.* 129:469-85.
- Chico, J.M., Raíces, M., Téllez-Iñón, M.T., Ulloa, R.M.** (2002) A calcium-dependent protein kinase is systemically induced upon wounding in tomato plants. *Plant Physiol.* 128:256-70.
- Clark, S.E., Williams, R.W., Meyerowitz, E.M.** (1997) The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. *Cell.* 89:575-85.
- Cobb M.H.** (1995) Casein kinase 1 (vertebrates). In *The Protein Kinase Factsbook*, ed. DG Hardie, Sk Hanks. London: Academic 1:347-49.
- Colebatch, G., Desbrosses, G., Ott, T., Krusell, L., Montanari, O., Kloska, S., Kopka, J., Udvardi, M.K.** (2004) Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *Plant J.* 39:487-512.
- Colebatch, G., Kloska, S., Trevaskis, B., Freund, S., Altmann, T., Udvardi, M.K.** (2002) Novel aspects of symbiotic nitrogen fixation uncovered by transcript profiling with cDNA arrays. *Mol Plant Microbe Interact.* 15:411-20.
- Complainville, A., Brocard, L., Roberts, I., Dax, E., Sever, N., Sauer, N., Kondorosi, A., Wolf, S., Oparka, K., and Crespi, M.** (2003). Nodule initiation involves the creation of a new symplasmic field in specific root cells of medicago species. *Plant Cell* 15:2778-91.
- Cooper, J.B., Long, S.R.** (1994) Morphogenetic Rescue of *Rhizobium meliloti* Nodulation Mutants by trans-Zeatin Secretion. *Plant Cell.* 6:215-25.
- Crespi, M.D., Jurkevitch, E., Poiret, M., d'Aubenton-Carafa, Y., Petrovics, G., Kondorosi, E., Kondorosi, A.** (1994) enod40, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. *EMBO J.* 13:5099-112.
- Cullimore, J., Denarie, J.** (2003) Plant sciences. How legumes select their sweet talking symbionts. *Science.* 302:575-8.
- Cullimore, J.V., Ranjeva, R., Bono, J.J.** (2001) Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci.* 6:24-30.
- Dammann, C., Ichida, A., Hong, B., Romanowsky, S.M., Hrabak, E.M., Harmon, A.C., Pickard, B.G., Harper, J.F.** (2003) Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from Arabidopsis. *Plant Physiol.* 132:1840-8.
- DasGupta M.** (1994) Characterization of a calcium-dependent protein kinase from *Arachis hypogea* (groundnut) seeds. *Plant Physiol.* 104:961-9.
- Davies, P.J.** (1995) The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (Davies, P.J., ed.) The Netherlands: Kluwer Academic, pp. 1-12
- Davletova, S., Meszaros, T., Miskolczi, P., Oberschall, A., Torok, K., Magyar, Z., Dudits, S., Deak M.** (2001) Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin-like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells. *J. Exp. Bot.* 52:215-21.

- Decroocqferrant V, Vanwent J, Bianchi MW, Devries SC, Kreis M.** (1995) *Petunia hybrida* homologs of shaggy/zeste-white-3 expressed in female and male reproductive organs. *Plant J.* 7:897-911.
- Dehio, C., de Bruijn, F.J.** (1992) The early nodulin gene *SrEnod2* from *Sesbania rostrata* is inducible by cytokinin. *Plant J.* 2:117-28.
- Denarie, J., Debelle, F., Prome, J.C.** (1996) Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signalling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 65:503-35.
- Donnelly, D.J., Coleman, W.K., Coleman, S.E.** (2003) Potato microtuber production and performance : a review. *Ann. J. Potato Res.* 80:103-15.
- Downie, J.A.** (1998) *The Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 387-402.
- Einzenberger E, Eller N, Heberlebers E, Vicente O.** (1995) Isolation and expresión during pollen development of tobacco cDNA clone encoding a protein kinase homologous to shaggy glycogen synthase kinase-3. *Biochim. Biophys. Acta* 1260:315-19.
- El Yahyaoui, F., Kuster, H., Ben Amor, B., Hohnjec, N., Puhler, A., Becker, A., Gouzy, J., Vernie, T., Gough, C., Niebel, A., Godiard, L., Gamas, P.** (2004) Expression profiling in *Medicago truncatula* identifies more than 750 genes differentially expressed during nodulation, including many potential regulators of the symbiotic program. *Plant Physiol.* 136:3159-76.
- Ellard-Ivey, M., Hopkins, R.B., White, T.J., Lomax, T.L.** (1999) Cloning, expression and N-terminal myristoylation of CpCPK1, a calcium-dependent protein kinase from zucchini (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Mol. Biol.* 39:199-208.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kalo, P., Kiss, G.B.** (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature.* 417:962-6.
- Esseling, J.J., Lhuissier, F.G., Emons, A.M.** (2004) A nonsymbiotic root hair tip growth phenotype in *NORK*-mutated legumes: implications for nodulation factor-induced signaling and formation of a multifaceted root hair pocket for bacteria. *Plant Cell.* 16:933-44.
- Estrada, R., Zovar, P., Dodds, J.H.** (1986) Induction of *in vivo* tubers in a broad range of phenotypes. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 7:3-10.
- Estruch, J.J., Kadwell, S., Merlin, E., Crossland L.** (1994) Cloning and characterization of a maize pollen-specific calcium-dependent calmodulin-independent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8837-41.
- Evans, N.H., McAinsh, M.R., Hetherington, A.M.** (2001) Calcium oscillations in higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:415-20.
- Ewing, E.E., Struik, P.C.** (1992) Tuber formation in potato: induction, initiation and growth. *Hortic Rev.* 14: 89-197.
- Fallon K.M, Shacklock P.S, Trewavas A.J.** (1993) Detection *in Vivo* of Very Rapid Red Light-Induced Calcium-Sensitive Protein Phosphorylation in Etiolated Wheat (*Triticum aestivum*) Leaf Protoplasts. *Plant Physiol.* 101:1039-45.
- Fang, Y., Hirsch, A.M.** (1998) Studying early nodulin gene *ENOD40* expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa. *Plant Physiol.* 116:53-68.
- Faux M.C, Scott J.D.** (1996) More on target with protein phosphorylation: conferring specificity by location. *Trends Biochem. Sci.* 21:312-15.
- Feingold, S.E., Lloyd, J., Norero, N., Bonierbale, M. y Lorenzen, J.** (2005) Map location and diversity values for new potato SSRs developed from EST databases. *Theor. Appl. Genet.* 111: 456-66.
- Feiler H.S, Jacobs T.W.** (1990) Cell division in higher plants: a *cdc2* gene, its 34 kDa product, and histone H1 kinase activity in pea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5397-401.
- Felle H.H, Hanstein S, Steinmeyer R, Hedrich R.** (2000) Dynamics of ionic activities in the apoplast of the sub-stomatal cavity of intact *Vicia faba* leaves during stomatal closure evoked by ABA and darkness. *Plant J.* 24:297-304.
- Ferl R.J.** (1996) 14-3-3 proteins and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:49-73
- Fernie, A.R., Willmitzer, L.** (2001) Update on tuber formation, dormancy and sprouting Molecular and Biochemical Triggers of Potato Tuber Development *Plant Physiol.* 127:1459-65.
- Finkelstein R.R, Gibson S.I.** (2002) ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? *Curr Opin Plant Biol.* 5:26-32.
- Fisher, R.F., Long, S.R.** (1992) Rhizobium--plant signal exchange. *Nature* 357:655-60.
- Forrest, S, I., Verma, D. P. S., Dhindsa, R. S.** (1991) Starch content and the activities of starch mobilizing enzymes in effective and ineffective root nodules of soybean. *Can. J. Bot.* 69:697-701.
- Francis, D. y Sorrell, D.A.** (2001) The interface between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review. *J. Plant Growth Regul.* 33:1-12.
- Furuichi, T., Mori I.C., Takahashi, K., Muto, S.** (2001) Sugar-induced increase in cytosolic Ca²⁺ in *Arabidopsis thaliana* whole plants. *Plant Cell Physiol.* 42:1149-55.
- Furumoto, T., Ogawa, N., Hata, S., Izui, K.** (1996) Plant calcium-dependent protein kinase-related kinases (CRKs) do not require calcium for their activities. *FEBS Lett.* 396:147-51.
- Garcia-Garrido, J.M., and Ocampo, J.A.** (2002). Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J. Exp. Bot.* 53:1377-86.

- Garner, N., Blake, J.** (1989) The induction and development of potato microtubers in vitro on media free of growth regulating substances. *Ann. Bot.* 63:663-74.
- Gazzarrini, S., McCourt, P.** (2001) Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 4:387-91.
- Geurts, R., Bisseling, T.** (2002) Rhizobium nod factor perception and signalling. *Plant Cell. Suppl.* S239-49.
- Gibson S.I.** (2004) Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *J Exp Bot.* 55:253-64.
- Gilroy, S., Trewavas, A.** (2001) Signal processing and transduction in plant cells: the end of the beginning? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:307-14.
- Gregory, L.E.** (1956) Some factors for tuberization in the potato. *Ann. Bot.* 41:281-88.
- Gresshoff, P.M.** (2003). Post-genomic insights into plant nodulation symbioses. *Genome Biol.* 4, 201-03.
- Gygi S.P., Rochon Y, Franza B.R, Aebersold R.** (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol.* 19:1720-30.
- Hahm S.H, Saunders M.J.** (1991) Cytokinin increases intracellular Ca²⁺ in *Funaria*: detection with Indo-1. *Cell Calcium.* 12(10):675-81.
- Halford N.G, Hardie D.G.** (1998) SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol. Biol.* 37:735-48.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M.** (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol.* 200:38-62.
- Hardie D.G, Carling D, Carlson M.** (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu. Rev. Biochem.* 67:821-55.
- Harmon, A.C., Gribskov, M., Harper, J.F.** (2000) CDPKs—a kinase for every Ca²⁺ signal? *Trends Plant Sci.* 5:154-59.
- Harmon, A.C., Gribskov, M., Gubrium, E., Harper J.F.** (2001) The CDPK superfamily of protein kinases. *New Phytol.* 151:175-83.
- Harmon, A.C., Lee, J-Y., Yoo, B.C., Shao, J.** (1996) Plant membrane-associated protein kinases. In M Smallwood, P Knox, D Bowles, eds, *Membranes: Specialized Functions in Plant Cells*. Bios Scientific Publishers, Oxford, pp 137-150.
- Harmon, A.C., Putnam-Evans, C., Cormier, M.J.** (1987) A calcium-dependent but calmodulin-independent protein kinase from soybean. *Plant Physiol.* 83:830-37.
- Harper, J.F., Harmon, A.** (2005) Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:555-66.
- Harper, J.F., Breton, G., Harmon, A.** (2004) Decoding Ca(2+) signals through plant protein kinases. *Annu Rev Plant Biol.* 55:263-88.
- Harper, J.F., Binder, B.M., Sussman, M.R.** (1993) Calcium and lipid regulation of an Arabidopsis protein kinase expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 32:3282-90.
- Harper, J.F., Huang, J-F, Lloyd S.J.** (1994) Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* 33:7267-77.
- Harper, J.F., Sussman, M.R., Schaller, G.E., Putnam-Evans, C., Charbonneau, H., Harmon, A.C.** (1991) A calcium-dependent protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin. *Science* 252:951-54.
- Harvey, B.M.R., Crothers, S.H., Evans, N.E., Selby, C.** (1991) The use of growth retardants to improve microtuber formation by potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 27:59-64.
- Hawley, S.A, Davison, M., Woods, A., Davies, S.P, Beri R.K.** (1996) Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver, and identification of threonine-172 as the major site at which it phosphorylates and activates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271:27879-87.
- Hedden, P., Phillips, A.L.** (2000) Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci.* 5:523-30.
- Hedden, P.** (2001) Gibberellin metabolism and its regulation. *J. Plant Growth Regul.* 20:317-18.
- Hegeman AD, Rodriguez M, Han BW, Uno Y, Phillips GN Jr, Hrabak EM, Cushman JC, Harper JF, Harmon AC, Sussman MR.** (2006) A phyloproteomic characterization of in vitro autophosphorylation in calcium-dependent protein kinases. *Proteomics.* 6:3649-64.
- Hepler, P.K., Vidali, L., Cheung, A.Y.** (2001) Polarized cell growth in higher plants. *Annu. Rev Cell Dev. Biol.* 17:159-87.
- Hirsch, A. M., Lum, M. R., Downie, J. A.** (2001) What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiol.* 127:1484-92.
- Hirsch, A.M.** (1992) Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122:211-37
- Hirsch, A.M., and Fang, Y.** (1994). Plant hormones and nodulation: what's the connection? *Plant Mol. Biol.* 26:5-9.
- Hirsch, A.M., Fang, Y., Brill, L.M., Wycoff, K.L., Niner, B.M., Brecht, J.P., van Rhyn, P.** (1995) Nodule development in legumes. *Proceedings of the 10th International Congress on Nitrogen Fixation.* pp. 299-304

- Hong, Y., Takano, M., Liu, C.M., Gasch, A., Chye, M.L., Chua, N.H. (1996) Expression of three members of the calcium-dependent protein kinase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 30:1259-75.
- Hrabak, E.M., Dickmann, L.J., Satterlee, J.S., Sussman, M.R. (1996) Characterisation of eight new members of the calmodulin-like domain protein kinase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 31:405-12.
- Hrabak, E.M., Chan, C.W., Gribskov, M., Harper, J.F., Choi, J.H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H.G., Sussman, M.R., Thomas, M., Walker-Simmons, K., Zhu, J.K., Harmon, A.C. (2003) The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol.* 132:666-80.
- Hrabak, E.M. (2000) Calcium-dependent protein kinases and their relatives. En M. Kreis, J.C. Walker, eds, *Advances in Botanical Sciences, Plant Protein Kinases*, Academic Press, New York, 32:185-223.
- Hua, W., Li, R.J., Wang, L., Lu, Y.T. (2004) A tobacco calmodulin-binding protein kinase (NtCBK2) induced by high-salt/GA treatment and its expression during floral development and embryogenesis. *Plant Sci.* 166:1253-59.
- Huber, S.C., Huber, J.L., Liao, P-C., Gage, D.A., McMichael, R.W. Jr., Chourey, P.S., Hannah, L.C., Koch, K. (1996) Phosphorylation of serine-15 of maize leaf sucrose synthase. Occurrence in vivo and possible regulatory significance. *Plant Physiol.* 112:793-802.
- Huber, S.C., Huber, J.L. (1996) Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:431-44.
- Humphries, K.M., Deal, M.S., Taylor, S.S. (2005) Enhanced dephosphorylation of cAMP-dependent protein kinase by oxidation and thiol modification. *J Biol Chem.* 280:2750-8.
- Hussey, G. y Stacey, N.J. (1984) Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann. Bot.* 53:565-78.
- Hwang, I., Sheen, J. (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature.* 413:383-9.
- Imaizumi-Anraku, H., Takeda, N., Charpentier, M., Perry, J., Miwa, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murakami, Y., Mulder, L., Vickers, K., Pike, J., Downie, J.A., Wang, T., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Yoshikawa, M., Murooka, Y., Wu, G.J., Kawaguchi, M., Kawasaki, S., Parniske, M., Hayashi, M. (2005) Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature.* 433:527-31.
- Ivashuta, S., Liu, J., Liu, J., Lohar, D.P., Haridas, S., Bucciarelli, B., Vandenbosch, K.A., Vance, C.P., Harrison, M.J., and Gantt, J.S. (2005). RNA Interference Identifies a Calcium-Dependent Protein Kinase Involved in *Medicago truncatula* Root Development. *Plant Cell* 17:2911-21.
- Iwata, Y., Kuriyama, M., Nakakita, M., Kojima, H., Ohto, M., Nakamura, K. (1998) Characterization of a calcium-dependent protein kinase of tobacco leaves that is associated with the plasma membrane and is inducible by sucrose. *Plant Cell Physiol.* 39:1176-83.
- Jackson, S., Heyer, A., Dietze, J., Prat, S. (1996) Phytochrome B mediates the photoperiodic control of tuber formation in potato. *Plant J.* 9:159-66.
- Jackson, S., Willmitzer, L. (1994) Jasmonic acid spraying does not induce tuberization in short-day requiring potato species kept in non-inducing conditions. *Planta* 194:155-59.
- Jackson, S.D. (1999) Multiple signaling pathways controls tuber induction in potato. *Plant Physiol.* 119:1-8.
- Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J. (1995) Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376:313-20.
- Jonak C, Heberlebers E, Hirt H. (1995) Inflorescence-specific expression of ATK-1, a novel *Arabidopsis thaliana* homolog of shaggy/glycogen synthase kinase-3. *Plant Mol. Biol.* 27:217-21.
- Kaffman A, Herskowitz I, Tijan R, O'Shea EK. (1994) Phosphorylation of the transcription factor PHO4 by a cyclin-CDK complex, PHO80-PHO85. *Science* 263:1153-56.
- Kaiser, W.M., Huber, S.C. (2001). Post-translational regulation of nitrate reductase: Mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J. Exp. Bot.* 52:1981-89.
- Kalo, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R.M., Hirsch, S., Jakab, J., Sims, S., Long, S.R., Rogers, J., Kiss, G.B., Downie, J.A., Oldroyd, G.E. (2005) Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science.* 308:1786-9.
- Kamiya, Y., Garcia-Martinez, J.L. (1999) Regulation of gibberellin biosynthesis by light. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:398-403.
- Kawasaki, T., Hayashida, N., Baba, T., Shinozaki, K., Shimada, H. (1993) The gene encoding a calcium-dependent protein kinase located near the *sbe1* gene encoding starch branching enzyme I is specifically expressed in developing rice seeds. *Gene* 129:183-9.
- Khan, M.M., Jan, A., Karibe, H., Komatsu, S. (2005) Identification of phosphoproteins regulated by gibberellin in rice leaf sheath. *Plant Mol Biol.* 58:27-40.
- Kistner, C. y Parniske, M. (2002) Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends Plant Sci.* 7:511-8.

- Kloosterman, B., Vorst, O., Hall, R.D., Visser, R.G.H., Bachem, C.W.** (2005) Tuber on a chip: differential gene expression during potato tuber development. *Plant Biotech. J.* 3:505-19.
- Klucis E, Polya GM.** (1987) Calcium-independent activation of two plant leaf calcium-regulated protein kinases by unsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 147:1041-7.
- Knight, M.R., Campbell, A.K., Smith, S.M., Trewavas, A.J.** (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352:524-26.
- Knight, H., Knight, M.R.** (2001) Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* 6:262-67.
- Knox, P.** (1990) Emerging patterns of organization at the plant cell surface. *J. Cell Sci.* 96:557-61.
- Koda, Y., Omer, E.A., Yoshihara, T., Shibata, H., Sakamura, S., Okazawa, Y.** (1988) Isolation of a specific potato tuber-inducing substance from potato leaves. *Plant Cell Physiol.* 29:1047-51.
- Koltai, H., Dhandaydham, M., Opperman, C., Thomas, J., Bird, D.** (2001) Overlapping plant signal transduction pathways induced by a parasitic nematode and a rhizobial endosymbiont. *Mol Plant Microbe Interact.* 14:1168-77.
- Kouchi, H., Shimomura, K., Hata, S., Hirota, A., Wu, G.J., Kumagai, H., Tajima, S., Suganuma, N., Suzuki, A., Aoki, T., Hayashi, M., Yokoyama, T., Ohyama, T., Asamizu, E., Kuwata, C., Shibata, D., Tabata, S.** (2004) Large-scale analysis of gene expression profiles during early stages of root nodule formation in a model legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res.* 11:263-74.
- Krauss, A.** (1985) Interaction of nitrogen nutrition, phytohormones and tuberization. In PH Li, eds, *Potato Physiology*. Academic Press, London, pp 209-31.
- Krauss, A. y Marschner, H.** (1982) Influence of nitrogen nutrition, daylength, and temperature on contents of gibberellic and abscisic acid and on tuberization in potato plants. *Potato Res.* 25:13-21
- Kreimer DI, Khotimchenko YuS.** (1985) Cytoplasm calcium-binding proteins of germ cells and embryos of the sea urchin. *Comp Biochem Physiol A Physiol.* 110:95-105.
- Krusell, L., Madsen, L.H., Sato, S., Aubert, G., Genua, A., Szczyglowski, K., Duc, G., Kaneko, T., Tabata, S., de Bruijn, F., Pajuelo, E., Sandal, N., Stougaard, J.** (2002) Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature.* 420:422-6.
- Kudla, J., Xu, Q., Harter, K., Gruissem, W., Luan, S.** (1999) Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:4718-23.
- Kumar, D. y Wareing, P.F.** (1974) Studies on tuberization of *Solanum andigena*. II. Growth, hormones and tuberization. *New Phytol.* 73:833-40.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-85.
- Lee, J.W., Zhang, Y., Weaver, C.D., Shomer, N.H., Louis, C.F., Roberts, D.M.** (1995) Phosphorylation of nodulin 26 on serine 262 affects its voltage-sensitive channel activity in planar lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* 270:27051-57.
- Lee, H., Hur, C.G., Oh, C.J., Kim, H.B., Pakr, S.Y., An, C.S.** (2004) Analysis of the root nodule-enhanced transcriptome in soybean. *Mol Cells.* 18:53-62.
- Levy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhoub, B., Kulikova, O., Duc, G., Journet, E.P., Ane, J.M., Lauber, E., Bisseling, T., Denarie, J., Rosenberg, C., Debelle, F.** (2004) A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science.* 303:1361-4.
- Li JM, Chory J.** (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90:929-38.
- Li H, Dauwalder M, Roux SJ.** (1991) Partial purification and characterization of a Ca(2+)-dependent protein kinase from pea nuclei. *Plant Physiol.* 96:720-7.
- Li, J., Lee, Y-R.J., Assmann, S.M.** (1998) Guard cells possess a calcium-dependent protein kinase that phosphorylates the KAT1 potassium channel. *Plant Physiol.* 116:785-95.
- Libbenga, K.R. y Bogers, R.J.** (1974) Root nodule morphogenesis. In *The Biology of Nitrogen Fixation* (Quispel, A., ed.) Amsterdam: North Holland Publishing Co., pp. 430-72.
- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemsse, J., Bisseling, T., Geurts, R.** (2003) LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science.* 302:630-3.
- Liu, Z.H., Xia, M., and Poovaiah, B.W.** (1998) Chimeric calcium/calmodulin-dependent protein kinase in tobacco: Differential regulation by calmodulin isoforms. *Plant Mol. Biol.* 38:889-97.
- Liu, J., Miller, S.S., Graham, M., Bucciarelli, B., Catalano, C.M., Sherrier, D.J., Samac, D.A., Ivashuta, S., Fedorova, M., Matsumoto, P., Gantt, J.S. and Vance, C.P.** (2006) Recruitment of Novel Calcium-Binding Proteins for Root Nodule Symbiosis in *Medicago truncatula* *Plant Phys.* 141:167-77.
- Lohar, D.P., Schaff, J.E., Laskey, J.G., Kieber, J.J., Bilyeu, K.D., Bird, D.M.** (2004) Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses. *Plant J.* 38:203-14.
- Lorteau, M.A., Ferguson, B.J., and Guinel, F.C.** (2001). Effects of cytokinin on ethylene production and nodulation in pea (*Pisum sativum*) cv. Sparkle. *Physiol. Plant.* 112:421-28.
- Lu, S.X., and Hrabak, E.M.** (2002) An *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase is associated with the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol.* 128:1008-21.

- Lu, S.X., Sullivan, C.M., Hrabak, E.M.** (2001) Membrane association of calcium-dependent protein kinases (CDPKs) in Arabidopsis (abstract no. 53). En American Society of Plant Biologists Meeting 2001. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp 36.
- Ludwig AA, Romeis T, Jones JD.** (2004) CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *J Exp Bot.* 55:181-8.
- Ma, L., Liang, S., Jones, R.L., Lu, Y.T.** (2004) Characterization of a novel calcium/calmodulin-dependent protein kinase from tobacco. *Plant Physiol.* 135:1280-93.
- MacIntosh, G.C., Ulloa, R.M., Raíces, M., Téllez-Iñón, M.T.** (1996) Changes in calcium-dependent protein kinase activity during in vitro tuberization in potato. *Plant Physiol.* 112:1541-50.
- Madsen, E.B., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J.** (2003) A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature.* 425:637-40.
- Marks, F.** (1996) Protein phosphorylation. pp. 1-380. VCH Weinheim, New York.
- Martin, M.L., Busconi, L.** (2000) Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. *Plant J.* 24:429-35.
- Mathesius, U., Charon, C., Rolfe, B.G., Kondorosi, A., Crespi, M.** (2000) Temporal and spatial order of events during the induction of cortical cell divisions in white clover by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* inoculation or localized cytokinin addition. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13:617-28.
- Matsuki, T., Tazaki, H., Fujimori, T., Hogetsu, T.** (1992) The influences of jasmonic acid methyl ester on microtubules in potato cells and formation of potato tubers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56: 1329-33.
- Mauk, C.S., Langille, A.R.** (1978) Physiology of Tuberization in *Solanum tuberosum* L: cis-Zeatin Riboside in the Potato Plant: Its Identification and Changes in Endogenous Levels as Influenced by Temperature and Photoperiod. *Plant Physiol.* 62:438-42.
- McCabe, J.B., Berthiaume, L.G.** (1999) Functional roles for fatty acylated amino-terminal domains in subcellular localization. *Mol. Biol. Cell* 10:3771-86.
- McCurdy, D.W., Harmon, A.C.** (1992) Phosphorylation of a putative myosin light chain in *Chara* by calcium-dependent protein kinase. *Protoplasma* 171:85–88.
- Meixner, C., Ludwig-Muller, J., Miersch, O., Gresshoff, P., Staehelin, C., Vierheilig, H.** (2005) Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant nts1007. *Planta.* 222:709-15.
- Menzel, C.M.** (1980) Tuberization in potato at high temperatures. Response of gibberellin and growth inhibitors. *Ann. Bot.* 46:259-65.
- Milbourne, D., Meyer, R., Collins, A.J., Ramsay, L.D., Gebhardt, C., Waugh, R.** (1998) Isolation, characterisation and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol Gen Genet* 259:233-45.
- Mithofer, A.** (2002). Suppression of plant defence in rhizobia-legume symbiosis. *Trends Plant Sci.* 7:440-44.
- Mitra, R.M., Gleason, C.A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J.A., Oldroyd, G.E., Long, S.R.** (2004) A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:4701-5.
- Mizoguchi T, Gotoh Y, Nishida E, Yamaguchishinozaki K, Hayashida N.** (1994) Characterization of 2 cDNAs that encode MAP kinase homologs in *Arabidopsis thaliana* and análisis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *Plant J.* 5:111-22.
- Mochly-Rosen, D.** (1995) Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* 268:247-51.
- Monroy, A.F., Dhindsa, R.S.** (1995) Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25°C. *Plant Cell* 7:321-31.
- Moutinho A, Trewavas AJ, Malhó R.** (1998) Relocation of a Ca²⁺-dependent protein kinase activity during tube reorientation. *Plant Cell* 10:1499-1509.
- Muller-Rober BT, Kossmann J, Hannah LC, Willmitzer L, Sonnewald U.** (1990) One of two different ADP-glucose pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to elevated levels of sucrose. *Mol Gen Genet.* 224:136-46.
- Murashige, T., Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-97.
- Nemhauser JL, Hong F, Chory J.** (2006) Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell.* 126:467-75.
- Nishimura, R., Hayashi, M., Wu, G.J., Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Murakami, Y., Kawasaki, S., Akao, S., Ohmori, M., Nagasawa, M., Harada, K., Kawaguchi, M.** (2002) HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature.* 420:426-9.
- Nishiyama, R., Mizuno, H., Okada, S., Yamaguchi, T., Takenaka, M., Fukuzawa, H., Ohyama, K.** (1999) Two mRNA species encoding calcium-dependent protein kinases are differentially expressed in sexual organs of *Marchantia polymorpha* through alternative splicing. *Plant Cell Physiol.* 40:205-12.

- Nutman, P.S.** (1948) Physiological studies on nodule formation. Part I. The relation between nodulation and lateral root formation in red clover. *Ann. Bot.* 12:81-94.
- Nutman, P.S.** (1949) Physiological studies on nodule formation. Part II. The influence of delayed inoculation on the rate of nodulation in red clover. *Ann. Bot.* 13:261-63.
- Obata-Sasamoto, H. y Suzuki, H.** (1979) Activities of enzymes relating to starch síntesis and endogenous levels of growth regulators in potato stolon tips during tuberization. *Physiol. Plant.* 45:320-24.
- Oldroyd, G.E. y Downie, J.A.** (2006) Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling. *Curr Opin Plant Biol.* 9:351-7.
- Oparka, K.J., Wright, K.M.** (1988) Influence of cell turgor on sucrose partitioning in potato tuber storage tissues. *Planta* 174:123-26.
- Orosz, L., Svab, Z., Kondorosi, A., and Sik, T.** (1973) Genetic studies on rhizobiophage 16-3. I. Genes and functions on the chromosome. *Mol. Gen. Genet.* 125:341-50.
- Palmer, C.E. y Smith, O.E.** (1970) Effect of kinetin on tuber formation on isolated stolons of *Solanum tuberosum* L. cultured in vitro. *Plant Cell Physiol.* 11:303-14.
- Parniske, M. y Downie, J.A.** (2003) Plant biology: locks, keys and symbioses. *Nature.* 425:569-70.
- Patharkar O.R., Cushman J.C.** (2000) A stress-induced calcium-dependent protein kinase from *Mesembryanthemum crystallinum* phosphorylates a two-component pseudo-response regulator. *Plant J.* 24:679-91.
- Patil, S., Takezawa, D., Poovaiah, B.W.** (1995) Chimeric plant calcium/calmodulin-dependent protein kinase gene with a neural visinin-like calcium-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:4897-901.
- Pay A, Jonak C, Bogre L, Meskiene I, Mairinger T.** (1993) The MSK family of alfalfa protein kinase genes encodes homologs of shaggy/glycogen-synthase kinase-3 and shows differential expression patterns in plant organs and development. *Plant J.* 3:847-56.
- Pei, Z.M., Ward, J.M., Harper, J.F., Schroeder, J.I.** (1996) A novel chloride channel in *Vicia faba* guard cell vacuoles activated by the serine/threonine kinase, CDPK. *EMBO J.* 15:6564-74.
- Penmetza, R.V. y Cook, D.R.** (1997) A Legume Ethylene-Insensitive Mutant Hyperinfected by Its Rhizobial Symbiont. *Science.* 275:527-30.
- Penmetza, R.V., Frugoli, J.A., Smith, L.S., Long, S.R., Cook, D.R.** (2003) Dual genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 131:998-1008.
- Perret, X., Staehelin, C. Broughton, W.J.** (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:180-201.
- Perry, D.J. y Bousquet, J.** (1998) Sequence-tagged-site (STS) markers of arbitrary genes: development, characterization and analysis of linkage in black spruce. *Genetics.* 149:1089-98.
- Pical C, Fredlund KM, Petit PX, Sommarin M, Moller IM.** (1993) The outer membrane of plant mitochondria contains a calcium-dependent protein kinase and multiple phosphoproteins. *FEBS Lett.* 336:347-51.
- Poovaiah, B.W., Reddy, A.S.N.** (1993) Calcium and signal transduction in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 12: 185-211.
- Prat, S., Frommer, W.B., Hofgen, R., Keil, M., Kossmann, J., Koster-Topfer, M., Liu, X.J., Muller, B., Peña-Cortés, H., Rocha-Sosa, M., Sanchez-Serrano, J.J., Sonnewald, U., Willmitzer L.** (1990) Gene expression during tuber development in potato plants. *FEBS Lett.* 268:334-38.
- Putnam-Evans C, Harmon AC, Cormier MJ.** (1990) Purification and characterization of a novel calcium-dependent protein kinase from soybean. *Biochemistry* 29:2488-95.
- Quandt J, Hynes MF.** (1993) Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene.* 127:15-21.
- Quarrie, S.A.** (1982) Droopy: a wilted mutant of potato deficient in abscisic acid. *Plant Cell Environ.* 5:23-26.
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Felle, H.H., Umehara, Y., Gronlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J.** (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature.* 425:585-92.
- Raices, M., Chico, J.M., Tellez-Inon, M.T., Ulloa, R.M.** (2001) Molecular characterization of StCDPK1, a calcium-dependent protein kinase from *Solanum tuberosum* that is induced at the onset of tuber development. *Plant Mol Biol.* 46:591-601.
- Raices, M., Gargantini, P.R., Chinchilla, D., Crespi, M., Tellez-Inon, M.T., Ulloa, R.M.** (2003a) Regulation of CDPK isoforms during tuber development. *Plant Mol Biol.* 52:1011-24.
- Raices, M., Ulloa, R.M., MacIntosh, G.C., Crespi, M., Tellez-Inon, M.T.** (2003) StCDPK1 is expressed in potato stolon tips and is induced by high sucrose concentration. *J Exp Bot.* 54:2589-91.
- Raices, M., MacIntosh, G.C., Ulloa, R.M., Gargantini, P.R., Voza, N.F., Tellez-Inon, M.T.** (2003) Sucrose increases calcium-dependent protein kinase and phosphatase activities in potato plants. *Cell Mol Biol* 49:959-64.
- Railton, I.D. y Wareing, P.F.** (1973) Effects of daylength on endogenous gibberellins in leaves of *Solanum andigena*. *Physiol. Plant.* 28:88-94.
- Reddy, A.S.N.** (2001a) Calcium: silver bullet in signaling. *Plant Sci.* 160:381-404.
- Reddy, A.S.N.** (2001b) Molecular motors and their functions in plants. *Int. Rev. Cytol.* 204:97-178.

- Redig, P., Shaul, O., Inze, D., Van Montagu, M., Van Onckelen, H.** (1996) Levels of endogenous cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid during the cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. *FEBS Lett.* 391:175-80.
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacquard, A., Murray, J.A.** (1999) Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science.* 283:1541-4.
- Roberts DM, Rowe PM, Siegel FL, Lukas TJ, Watterson DM.** (1986) Trimethyllysine and protein function. Effect of methylation and mutagenesis of lysine 115 of calmodulin on NAD kinase activation. *J Biol Chem.* 261:1491-4.
- Robertson, M., Chandler, P.M.** (1994) A dehydrin cognate protein from pea (*Pisum sativum* L.) with an atypical pattern of expression. *Plant Mol Biol.* 26:805-16.
- Rodríguez-Falcón M., Bou J., Prat S.** (2006) Seasonal control of tuberization in potato: conserved elements with the flowering response. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:151-80.
- Roitsch, T. y Ehne, R.** (2000) Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regul.* 32:359-67.
- Romeis, T., Ludwig, A.A., Martin, R., Jones, J.D.** (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J.* 20:5556-67.
- Rudd, J.J., Franklin-Tong, V.E.** (2001) Unravelling response-specificity in Ca²⁺ signalling pathways in plant cells. *New Phytol.* 151:7-33.
- Rutschmann, F., Stalder, U., Piotrowski, M., Oecking, C., Schaller, A.** (2002) LeCPK1, a calcium-dependent protein kinase from tomato. Plasma membrane targeting and biochemical characterization. *Plant Physiol.* 129:156-68.
- Saijo, Y., Hata, S., Sheen, J., Izui, K.** (1997) cDNA cloning and prokaryotic expression of maize calcium-dependent protein kinases. *Biochim Biophys Acta.* 1350:109-14.
- Saijo, Y., Hata, S., Kyoizuka, J., Shimamoto, K., Izui, K.** (2000) Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J.* 23:319-27.
- Sanders, D., Jérôme Pelloux, J., Brownlee C., Harper J.F.** (2002) Calcium at the Crossroads of Signaling. *Plant Cell* 14:401-17.
- Santella L, Carafoli E.** (1997) Calcium signaling in the cell nucleus. *FASEB J.* 11(13):1091-109. Review.
- Satterlee JS, Sussman MR.** (1998) Unusual membrane-associated protein kinase in higher plants. *J. Membr. Biol.* 164:205-13.
- Saunders, M.J., and Hepler, P.K.** (1983). Calcium antagonists and calmodulin inhibitors block cytokinin-induced bud formation in *Funaria*. *Dev. Biol.* 99:41-49.
- Schaller, G.E., Sussman, M.R.** (1988) Phosphorylation of the plasma-membrane H⁺-ATPase of oat roots by a calcium-stimulated protein kinase. *Planta* 173:509-18.
- Schmulling, T.** (2002) New Insights into the Functions of Cytokinins in Plant Development. *J Plant Growth Regul.* 21:40-49.
- Schnabel, E., Journet, E.P., de Carvalho-Niebel, F., Duc, G., Frugoli, J.** (2005) The *Medicago truncatula* SUNN gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant Mol Biol.* 58:809-22.
- Schnabel, E., Kulikova, O., Penmetsa, R.V., Bisseling, T., Cook, D.R., Frugoli, J.** (2003) An integrated physical, genetic and cytogenetic map around the sunn locus of *Medicago truncatula*. *Genome.* 46:665-72.
- Schroeder JI, Hagiwara S.** (1990) Repetitive increases in cytosolic Ca²⁺ of guard cells by abscisic acid activation of nonselective Ca²⁺ permeable channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:9305-9.
- Scott, A., Wyatt, S., Tsou, P.L., Robertson, D., and Allen, N.S.** (1999) Model system for plant cell biology: GFP imaging in living onion epidermal cells. *Biotechniques* 26:1128-32.
- Scrase-Field, S.A. y Knight, M.R.** (2003) Calcium: just a chemical switch? *Curr Opin Plant Biol.* 6:500-6.
- Searle, I.R., Men, A.E., Laniya, T.S., Buzas, D.M., Iturbe-Ormaetxe, I., Carroll, B.J., Gresshoff, P.M.** (2003) Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase. *Science.* 299:109-12.
- Sebastia, C.H., Hardin, S.C., Clouse, S.D., Kieber, J.J., Huber, S.C.** (2004) Identification of a new motif for CDPK phosphorylation in vitro that suggests ACC synthase may be a CDPK substrate. *Arch. Biochem. Biophys.* 428:81-89.
- Sheen, J.** (1996) Ca²⁺-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* 274:1900-02.
- Shibaoka, H.** (1993) regulation by gibberellins of the orientation of cortical microtubules in plant cells. *Aust. J. Plant Physiol.* 20:461-70.
- Simko, I.** (1994) Sucrose application causes hormonal changes associated with potato tuber induction. *J. Plant Growth Regul.* 13:73-77.
- Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debelle, F., Gough, C., Bisseling, T., Geurts, R.** (2005) NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science.* 308:1789-91.

- Snedden, W.A. y Fromm, H.** (2001) Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytol.* 151:35–66.
- Snyder, F., Ewing, E.E.** (1989) Interactive effects of temperature, photoperiod and cultivar on tuberization of potato cuttings. *Hortic Sci.* 24:336-38.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Morgan, D.R., Swensen, S.M., Mullin, B.C., Dowd, J.M., Martin, P.G.** (1995) Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:2647-51.
- Son M, Gundersen RE, Nelson DL.** (1993) A second member of the novel Ca²⁺-dependent protein kinase family from *Paramecium tetraurelia*. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 268:5940-48.
- Stone JM, Walker JC.** (1995) Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol.* 108:451-57.
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K., Parniske, M.** (2002) A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature.* 417:959-62.
- Suen, KL and Choi, JH.** (1991) Isolation and sequence analysis of a cDNA clone for a carrot calcium-dependent protein kinase: homology to calcium/calmodulin-dependent protein kinases and to calmodulin. *Plant Mol Biol.* 17:581-90.
- Takahashi, F., Fujino, K., Kikuta, Y., Koda, Y.** (1994) Expansion of potato cells in response to jasmonic acid. *Plant Sci.* 100:3-8.
- Thompson, G.A., Okuyama, H.** (2000) Lipid-linked proteins of plants. *Prog. Lipid Res.* 39:19-39.
- Thygesen, P.W., Dry, I.B., Robinson, S.P.** (1994) Polyphenol oxidase in potato tubers. En: Belknap WR, Vayda ME and Park WD. *The molecular and cellular biology of the potato*, 2nd. ed. CAB International, Wallingford, UK, pp. 151-60.
- Thygesen, P.W., Dry, I.B., Robinson, S.P.** (1995) Polyphenol oxidase in potato. A multigene family that exhibits differential expression patterns. *Plant Physiol.* 109:525-31.
- Toroser, D., Huber, S.C.** (1998) 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase kinase and sucrose-phosphate synthase kinase activities in cauliflower florets: Ca²⁺ dependence and substrate specificities. *Arch. Biochem. Biophys.* 355:291-300.
- Tovar, P., Estrada, R., Schilde-Renschler, L., Dodds, J.H.** (1985) Induction and used of in vitro tubers. *CIP circular* 13:1-5.
- Trewavas, A.** (1999) Le calcium, c'est la vie: Calcium makes waves. *Plant Physiol.* 20:1-6.
- Ullanat, R. y Jayabaskaran, C.** (2002) Distinct light-, cytokinin- and tissue-specific regulation of calcium-dependent protein kinase gene expression in cucumber (*Cucumis sativus*). *Plant Science.* 162:153-63.
- Ulloa, R.M., Raíces, M., MacIntosh, G.C., Maldonado, S., Téllez-Iñón, M.T.** (2002) Jasmonic acid affects plant morphology and calcium-dependent protein kinase expression and activity in *Solanum tuberosum*. *Physiol. Plant.* 115:417-27.
- Urao, T., Katagiri, T., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N., Shinozaki, K.** (1994) Two genes that encode Ca²⁺-dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Genet.* 244:331-40.
- van de Berg, J.H. y Ewing, E.E.** (1991) Jasmonates and their role in plant growth and development, with special reference to the control of potato tuberization: a review. *Ann. Potato J.* 68:781-94.
- van den Berg, J.H., Simko, I., Davies, P.J., Ewing, E.E., Halinska, A.** (1995) Morphology and (14C)gibberellin A12 aldehyde metabolism in wild-type and dwarf *Solanum tuberosum* ssp. andigena grown under long and short photoperiods. *J. Plant Physiol.* 146:467-73.
- van Noorden, G.E., Ross, J.J., Reid, J.B., Rolfe, B.G., Mathesius, U.** (2006) Defective Long Distance Auxin Transport Regulation in the *Medicago truncatula* sunn Mutant. *Plant Physiol* 140:1494-1506.
- Verhagen, B.W., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.S., van Loon, L.C., Pieterse, C.M.** (2004). The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17:895-908.
- Verhees, J., van der Krol, A.R., Vreugdenhil, D., van der Plas, L.H.** (2002) Characterization of gene expression during potato tuber development in individuals and populations using the luciferase reporter system. *Plant Mol Biol.* 50:653-65.
- Viola, R., Roberts, A.G., Haupt, S., Gazzani, S., Hancock, R.D., Marmioli, N., Machray, G.C. Oparka, K.J.** (2001) Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to simplastic phloem unloading. *Plant Cell* 13:385-98.
- Vision, T.J., Brown, D.G., Shmoys, D.B., Durret, R.T., Tanksley, S.D.** (2000) Selective mapping: a strategy for optimizing the construction of high-density linkage maps. *Genetics* 155:407-20.
- Wais, R.J., Galera, C., Oldroyd, G., Catoira, R., Penmetza, R.V., Cook, D., Gough, C., Denarie, J., Long, S.R.** (2000) Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:13407-12.
- Wais, R.J., Keating, D.H., and Long, S.R.** (2002). Structure-function analysis of nod factor-induced root hair calcium spiking in *Rhizobium-legume* symbiosis. *Plant Physiol.* 129:211-24.
- Walker JC.** (1994) Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 26:1599-609.

- Walton KM, Dixon JE.** (1993) Protein tyrosine phosphatases. *Annu Rev Biochem.* 62:101-20.
- Wang, Y., Liang, S., Xie, Q.G., Lu, Y.T.** (2004) Characterization of a calmodulin-regulated CDPK-related protein kinase, AtCRK1 from *Arabidopsis*. *Biochem. J.* 383:73-81.
- Ward, P., Equinet, L., Packer, J., Doerig, C.** (2004) Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics.* 5:79.
- Weaver, C.D., Roberts, D.M.** (1992) Determination of the site of phosphorylation of nodulin 26 by the calcium-dependent protein kinase from soybean nodules. *Biochemistry* 31:8954-59.
- Wikström, N., Savolainen, V., Chase, M.W.** (2001) Evolution of the angiosperms: calibrating the family tree. *Proceedings of the Royal Society of London B.* 268:2211-20.
- Wood, NT.** (2001) Nodulation by numbers: the role of ethylene in symbiotic nitrogen fixation. *Trends Plant Sci.* 6:501-2.
- Woodgett, JR.** (1991) A common denominator linking glycogen metabolism, nuclear oncogenes and development. *Trends Biochem. Sci.* 16:177-81.
- Wopereis, J., Pajuelo, E., Dazzo, F.B., Jiang, Q., Gresshoff, P.M., De Bruijn, F.J., Stougaard, J. and Szczyglowski, K.** (2000) Short root mutant of *Lotus japonicus* with a dramatically altered symbiotic phenotype. *Plant J.* 23:97-114.
- Xiao, C., Xin, H., Dong, A., Sun, C., Cao, K.** (1999) A novel calmodulin-like protein gene in rice which has an unusual prolonged C-terminal sequence carrying a putative prenylation site. *DNA Res.* 6:179-81.
- Xu, H., Heath, M.C.** (1998) Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. *Plant Cell* 10:585-98.
- Xu, X., van Lammeren, A.A., Vermeer, E., Vreugdenhil, D.** (1998) The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation in vitro. *Plant Physiol.* 117:575-84.
- Yang, G., Komatsu, S.** (2001) Involvement of calcium-dependent protein kinase in rice (*Oryza sativa* L.) lamina inclination caused by brassinolide. *Plant Cell Physiol.* 41:1243-50.
- Yanovsky, M.J., Izaguirre, M., Wagmaister, J.A., Gatz, C., Jackson, S.D., Thomas, B., Casal, J.J.** (2000) Phytochrome A resets the circadian clock and delays tuber formation under long days in potato. *Plant J.* 23:223-32.
- Yoon, G.M., Cho, H.S., Ha, H.J., Liu, J.R., Lee, H.P.** (1999) Characterization of NtCDPK1, a calcium-dependent protein kinase gene in *Nicotiana tabacum*, and the activity of its encoded protein. *Plant Mol. Biol.* 39:991-1001.
- Zhang, L., Lu, Y.T.** (2003) Calmodulin-binding protein kinases in plants. *Trends Plant Sci.* 8:123-7.
- Zhang, X-Q., Chollet, R.** (1997) Seryl-phosphorylation of soybean nodule sucrose synthase (nodulin 100) by a Ca²⁺-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* 410:126-30.
- Zhang, K., Letham, D.S., John, P.C.** (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. *Planta.* 200:2-12.
- Zhang, M., Liang, S., Lu, Y.T.** (2005) Cloning and functional characterization of NtCPK4, a new tobacco calcium-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta.* 1729:174-85.
- Zhao Y, Kapees B, Franklin RM.** (1993) Gene structure and expression of an unusual protein kinase from *Plasmodium falciparum* homologous at its carboxyl terminus with the EF hand calcium-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 268:4347-54.