

## Tesis Doctoral

# Estudio transcripcional y post-transcripcional de la quinasa de proteínas dependiente de calcio, StCDPK1 en *Solanum tuberosum* y análisis de sus potenciales blancos de acción

Santin, Franco

2015

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

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

#### Cita tipo APA:

Santin, Franco. (2015). Estudio transcripcional y post-transcripcional de la quinasa de proteínas dependiente de calcio, StCDPK1 en *Solanum tuberosum* y análisis de sus potenciales blancos de acción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n5755\\_Santin](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5755_Santin)

#### Cita tipo Chicago:

Santin, Franco. "Estudio transcripcional y post-transcripcional de la quinasa de proteínas dependiente de calcio, StCDPK1 en *Solanum tuberosum* y análisis de sus potenciales blancos de acción". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n5755\\_Santin](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5755_Santin)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**  
**Departamento de Química Biológica**

**“Estudio transcripcional y post-transcripcional de la  
quinasa de proteínas dependiente de calcio, StCDPK1 en  
*Solanum tuberosum* y análisis de sus potenciales blancos  
de acción”**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área: QUÍMICA BIOLÓGICA

Autor: Lic. Franco Santin  
Director de tesis: Dra. Rita María Ulloa  
Consejero de estudios: Dr. Juan Carlos Calvo

**Lugar de trabajo:** Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y  
Biología Molecular “Héctor N. Torres” (INGEBI - CONICET)

**Lugar y fecha:** Buenos Aires, 2015.

**Fecha de defensa:** 24 de abril de 2015.

*A mis abuelos Yita y Noni.*

# ÍNDICE

---

|                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| ÍNDICE.....                                                         | 2  |
| AGRADECIMIENTOS.....                                                | 4  |
| RESUMEN .....                                                       | 5  |
| ABSTRACT .....                                                      | 7  |
| INTRODUCCIÓN .....                                                  | 8  |
| TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES .....                                       | 8  |
| TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN PLANTAS .....                            | 8  |
| CALCIO COMO SEGUNDO MENSAJERO.....                                  | 9  |
| GENERACIÓN DE LAS SEÑALES DE CALCIO.....                            | 11 |
| EL INFLUJO DE CALCIO .....                                          | 11 |
| EL EFLUJO DE CALCIO .....                                           | 13 |
| PROTEÍNAS SENSORAS DE CALCIO .....                                  | 14 |
| QUINASAS DE PROTEÍNAS DEPENDIENTES DE CALCIO (CDPKs) .....          | 16 |
| MODO DE ACTIVACIÓN DE LAS CDPKS.....                                | 19 |
| FUNCIÓN FISIOLÓGICA DE LAS CDPKS .....                              | 19 |
| REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR MIARNs.....                   | 24 |
| MODELO DE ESTUDIO: <i>SOLANUM TUBEROSUM</i> .....                   | 26 |
| DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA .....                                       | 27 |
| GENOMA DE PAPA .....                                                | 29 |
| TUBERIZACIÓN .....                                                  | 30 |
| ANTECEDENTES DE CDPKS EN PAPA.....                                  | 34 |
| HIPÓTESIS.....                                                      | 37 |
| OBJETIVO GENERAL.....                                               | 37 |
| OBJETIVOS PARTICULARES .....                                        | 37 |
| RESULTADOS .....                                                    | 38 |
| CAPÍTULO 1 : CARACTERIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE StCDPK1 .....       | 38 |
| ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE LA SECUENCIA PROMOTORA DE StCDPK1..... | 38 |
| ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE StCDPK1 .....                              | 40 |

|                                                                                                           |         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| ANÁLISIS COMPARATIVO DE StCDPK1, 2 Y 3 .....                                                              | 44      |
| DISCUSIÓN.....                                                                                            | 49      |
| CAPÍTULO 2 : ESTUDIO POST-TRANSCRIPCIONAL DE StCDPK1 .....                                                | 53      |
| PREDICCIÓN Y VALIDACIÓN DE MICROARNS QUE TENGAN COMO BLANCO A StCDPK1 .....                               | 53      |
| DISCUSIÓN.....                                                                                            | 59      |
| CAPÍTULO 3 : CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE StCDPK1 Y ANÁLISIS DE SUS POSIBLES BLANCOS DE ACCIÓN.....      | 62      |
| PREDICCIÓN DE MOTIVOS CONSERVADOS Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE StCDPK1 RECOMBINANTE .....              | 62      |
| BÚSQUEDA DE POTENCIALES SUSTRATOS DE StCDPKs POR 2H .....                                                 | 67      |
| EVALUAR LA CAPACIDAD PARA FOSFORILAR SUSTRATOS DE CDPKS HETERÓLOGOS IDENTIFICADOS EN OTRAS ESPECIES. .... | 69      |
| ANÁLISIS DE POSIBLES SUSTRATOS DE StCDPK1 EN PAPA .....                                                   | 71      |
| <br>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....                                                              | <br>76  |
| <br>MATERIALES Y MÉTODOS.....                                                                             | <br>79  |
| <br>CEPAS BACTERIANAS.....                                                                                | <br>79  |
| <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....                                                                             | 79      |
| <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> .....                                                                    | 80      |
| MATERIAL VEGETAL.....                                                                                     | 81      |
| CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....                                                                             | 81      |
| CULTIVO EN INVERNADERO .....                                                                              | 81      |
| METODOLOGÍA DEL ADN RECOMBINANTE .....                                                                    | 82      |
| EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS .....                                                                             | 87      |
| TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> .....                                         | 88      |
| ENSAYOS DE AGROINFILTRACIÓN EN HOJAS DE <i>N. BENTHAMIANA</i> .....                                       | 89      |
| EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....                                                 | 90      |
| ENSAYO DE WESTERN BLOT .....                                                                              | 91      |
| METODOLOGÍA DEL ARN .....                                                                                 | 91      |
| ENSAYOS DE ACTIVIDAD CDPK.....                                                                            | 92      |
| ENSAYO DE TINCIÓN GUS (ACTIVIDAD B- <i>GLUCURONIDASA</i> ).....                                           | 94      |
| ELECTROFORESIS GELES 2D .....                                                                             | 94      |
| BIOINFORMÁTICA .....                                                                                      | 95      |
| <br>BIBLIOGRAFÍA.....                                                                                     | <br>97  |
| <br>ANEXO .....                                                                                           | <br>109 |

# AGRADECIMIENTOS

---

A todas estas personas que contribuyeron directa o indirectamente con la realización de esta tesis

|                          |                        |
|--------------------------|------------------------|
| Mamá                     | Naty Juiz              |
| Papá                     | Juan Carlos            |
| Carli                    | Fran Pisciotano        |
| Benja                    | Vivi Dalamón           |
| Abuela Herminia          | Claudia Gatto          |
| Abuela Yita              | Paula Buonfiglio       |
| Noni                     | Fernando Bravo         |
| Luli                     | Euge Segretín          |
| Tíos                     | Margarita Stritzler    |
| Primas                   | Ramiro Lorenzo         |
| Darío                    | Javi Gasulla           |
| Rita Ulloa               | Flor Wernert           |
| Kikita Fantino           | Alicia Quintela        |
| Normita Silva            | Irma Gelmi             |
| Rubén Álvarez            | Carolina Grandellis    |
| Mary Álvarez             | Ale Shoijet            |
| Gladys Muñoz             | Anjan Banerjee         |
| Mirtha Flawiá            | Sneha Bhogale          |
| María Teresa Téllez-Iñón | Juan Cruz Gómez-Poviña |
| Martha Garibaldi         | Noe Boccardo           |
| Ale Benatar              | Mauro Morgenfeld       |
| Lean Simonetti           | Fede Alfano            |
| Laurita Tasso            | Marina Fumagalli       |
| Karina Gómez             | Catalina Muro          |
| Silvia Longhi            | Mariana Potenza        |

Mi especial agradecimiento al CONICET por haberme otorgado la beca doctoral haciendo posible la realización de esta tesis y al MINCyT por financiar la estadía de investigación en el *Indian Institute of Science Education & Research* (Pune, Maharashtra, India).

## RESUMEN

---

La papa, *Solanum tuberosum* L., es el tercer cultivo alimenticio luego del arroz y del trigo (FAOSTAT, 2009). En el proceso de tuberización, un tallo subterráneo especializado, el estolón, se diferencia en un órgano de reserva, el tubérculo. Con el fin de comprender los mecanismos que subyacen a este proceso de desarrollo y para mejorar la calidad y el rendimiento del cultivo se han realizado numerosas investigaciones. Entre los diversos factores que regulan la tuberización, los cambios en los niveles intracelulares de calcio y en el estado de fosforilación de las proteínas son eventos primarios que coordinan en tiempo y forma la respuesta de la planta. El calcio es un segundo mensajero esencial en plantas y las quinasas de proteínas dependientes de calcio, CDPKs, son sensores/transductores del catión que se inducen/activan en respuesta a estímulos bióticos y abióticos (Boudsocq & Sheen 2013). Estas enzimas monoméricas poseen un dominio quinasa de proteínas (DK) unido a través de una región bisagra o dominio autoinhibitorio (DAI) a un dominio regulador homólogo a la calmodulina (CLD) con 4 sitios de unión al calcio (EF-hands). Componen familias multigénicas compuestas por aproximadamente 30 miembros que presentan gran homología de secuencia entre sí a excepción del dominio amino terminal variable (NTV) que regula la localización subcelular de la enzima. En *Solanum tuberosum*, nuestro grupo identificó tres isoformas de CDPK, StCDPK1, 2 y 3, que se expresan durante el proceso de tuberización (Gargantini et al. 2009; Giammaria et al. 2011; Grandellis et al. 2012; Raices et al. 2001; Raices et al. 2003a; Raices et al. 2003b; Raices et al. 2003c).

Con el fin de estudiar la regulación transcripcional de la isoforma StCDPK1 durante el ciclo de vida de la planta de papa, se clonó y analizó su secuencia promotora, se obtuvieron y caracterizaron plantas transgénicas de papa que expresan el gen reportero  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) bajo dicho promotor (plantas StCDPK1pro::GUS) y se realizaron ensayos de qRT-PCR en diferentes tejidos de la planta y estadios de tuberización. Se comparó la actividad GUS observada en las plantas StCDPK1pro::GUS con la observada en plantas CDPK3pro::GUS desarrolladas previamente (Grandellis et al. 2012) y con la de plantas CDPK2pro::GUS obtenidas también durante el transcurso de esta tesis. Los ensayos histoquímicos indican que la isoforma StCDPK1 está fuertemente asociada al sistema vascular de la planta y confirman que presenta una expresión espacio temporal definida durante el proceso de tuberización.

Asimismo se analizó si la expresión de StCDPK1 podía ser regulada post transcripcionalmente por microARNs. A través de los programas *online* psRNATarget y TargetAlign se identificó el miR390 que tendría como blanco el transcripto de StCDPK1 provocando el clivaje del ARNm o interrumpiendo su traducción. Los perfiles de expresión opuestos del miR390 y de StCDPK1 en estadios de tuberización indicaron que este miARN podría regular la expresión de StCDPK1. Posteriormente, en ensayos de co-agroinfiltración en *Nicotiana benthamiana* se determinó que los transcriptos de StCDPK1 son blanco de acción del miR390, demostrando, por primera vez, que una CDPK es regulada a este nivel (manuscrito enviado a Plant Mol. Biol).

Además se obtuvo la proteína recombinante StCDPK1 etiquetada con 6xHis para proceder a su caracterización bioquímica y determinar sus parámetros cinéticos. Se demostró que la proteína 6xHis-StCDPK1 es una quinasa activa dependiente de calcio, capaz de autofosforilarse en presencia del catión y que fosforila diversos sustratos, entre los cuales se encuentra AtDi19, un factor de transcripción involucrado en la respuesta a estrés salino y sequía en *Arabidopsis thaliana*.

Recientemente obtuvimos las proteínas recombinantes del homólogo de AtDi19 en papa y otras dos proteínas que han sido implicadas en la inducción de la tuberización, la proteína StSP6A, homólogo en papa de flowering locus T (FT) y StPIN4, un transportador de auxinas. Próximamente se ensayará la capacidad de la enzima de fosforilar *in vitro* a estos sustratos. Finalmente, se produjeron plantas que sobreexpresan la proteína StCDPK1 como una primera aproximación funcional para determinar si esta isoforma interviene en la respuesta de la planta a estreses abióticos.

Palabras clave: StCDPK1 – fosforilación dependiente de calcio – regulación transcripcional - regulación postranscripcional por microARNs - tuberización

# ABSTRACT

---

"Transcriptional and post-transcriptional study of calcium-dependent protein kinase, StCDPK1 in *Solanum tuberosum* and analysis of its potential targets"

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is the world's most important non-grain food crop. Tuber development (Tuberization) in potato has been extensively studied in order to understand the mechanism as well as to improve tuber yield and quality. Among the many factors that regulate tuberization, calcium signaling plays an important role. Calcium is the key second messenger in plants and Calcium Dependent Protein Kinases (CDPKs) transduce calcium signatures into specific responses including tuberization. These enzymes are encoded by multigene families, whose members share a unique structure consisting of an N-terminal variable domain (NTV), a serine/threonine kinase catalytic domain (KD) fused through a junction region or autoinhibitory domain to a carboxyterminal calmodulin-like domain (CLD) with four EF hands Ca<sup>2+</sup> binding sites. Previous reports from our group showed that CDPK activity increases at the onset of tuber formation and that StCDPK1 is strongly induced in swollen stolons (Gargantini et al. 2009; Giammaria et al. 2011; Grandellis et al. 2012; Raices et al. 2001; Raices et al. 2003a; Raices et al. 2003b; Raices et al. 2003c).

To elucidate the transcription pattern and post transcriptional regulation of StCDPK1, we analyzed its expression in different tissues and stages of potato life cycle and characterized potato plants harboring GUS under the control of StCDPK1 promoter (StCDPK1pro::GUS). Histochemical analysis indicates that StCDPK1 is strongly associated to the vascular system of stems, roots and during stolon to tuber transition correlating with the cis-acting elements present in its promoter sequence. qRT-PCR data demonstrated that StCDPK1 is ubiquitously expressed having high expression in stolons, swollen stolons, leaves, and stems. On the contrary, miR390 expression exhibited an inverse pattern in stolons, swollen stolons and tubers suggesting a possible regulation of StCDPK1 by miR390. This was further confirmed by *Agrobacterium* co-infiltration assays, demonstrating that StCDPK1 is targeted by miR390. Overall, our results indicate that StCDPK1 expression varied in tissue specific manner having significant expression in vasculature, and it could be modulated by miR390 during potato development.

The recombinant 6xHis-StCDPK1 protein was produced and biochemically characterized. StCDPK1 kinetic parameters differed from those exhibited by other isoforms, consistent with the fact that CDPKs are involved in various signal transduction pathways and are differentially expressed among tissues. In addition, the kinase was autophosphorylated in the presence of calcium and 2D analysis revealed multiple phosphorylation states as predicted by in silico analysis. This isoform was able to phosphorylate some targets in vitro, among which, AtDi19 was reported to be involved in salt and drought stress in *Arabidopsis thaliana*. Recently, we produced the recombinant proteins of the potato homolog of AtDi19 (StDi19) as well as two other proteins implicated in tuber induction, StSP6A and StPIN4. Shortly, the capability of StCDPK1 to phosphorylate these proteins will be assayed in vitro. Finally, 35S::StCDPK1 over-expressing plants were produced as a first functional approach to study the role of this isoform in the abiotic stress response.

Keywords: StCDPK1 – calcium dependent phosphorylation- transcriptional regulation- postranscriptional regulation by miRNAs – tuberization

# INTRODUCCIÓN

---

## Transducción de señales

Las células de los organismos multicelulares están expuestas a lo largo de su vida a una gran variedad de señales. Estas señales pueden provenir de su medioambiente así como de otras células. La capacidad de las células para percibir estas señales y generar una respuesta apropiada es esencial para su supervivencia. La percepción de la señal ocurre a través de un receptor específico que puede localizarse tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma. La unión de la molécula señal (el ligando) provoca un aumento de la concentración citosólica de moléculas conocidas como segundos mensajeros. A partir de este momento se desencadena una cascada de señalización en la cual el segundo mensajero activa una enzima, que a su vez activa una segunda enzima y así sucesivamente. De esta manera ocurre la amplificación de la señal. En última instancia, la señal es transmitida a moléculas efectoras específicas que generan la respuesta celular. En la mayoría de los casos, la respuesta implica la regulación de la actividad de determinadas proteínas, ya sea mediante la regulación transcripcional o la modificación post-transcripcional.

## Transducción de señales en plantas

A diferencia de los animales, las plantas no tienen la capacidad de desplazarse para escapar de las condiciones desfavorables impuestas por su entorno, por este motivo han tenido que desarrollar mecanismos de transducción de señales eficientes para percibir cambios en su medioambiente y rápidamente adaptar su fisiología para poder crecer y desarrollarse. La Figura I muestra diversos estímulos a los que están expuestas las plantas durante su ciclo de vida.

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 convierten los estímulos ambientales en respuestas 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. El calcio representa probablemente el ión más versátil en organismos eucariotas. Está involucrado en casi todos los aspectos del desarrollo de la planta; es un segundo mensajero ubicuo que posee un rol central en las vías de transducción de señales regulando varios procesos de adaptación y desarrollo.

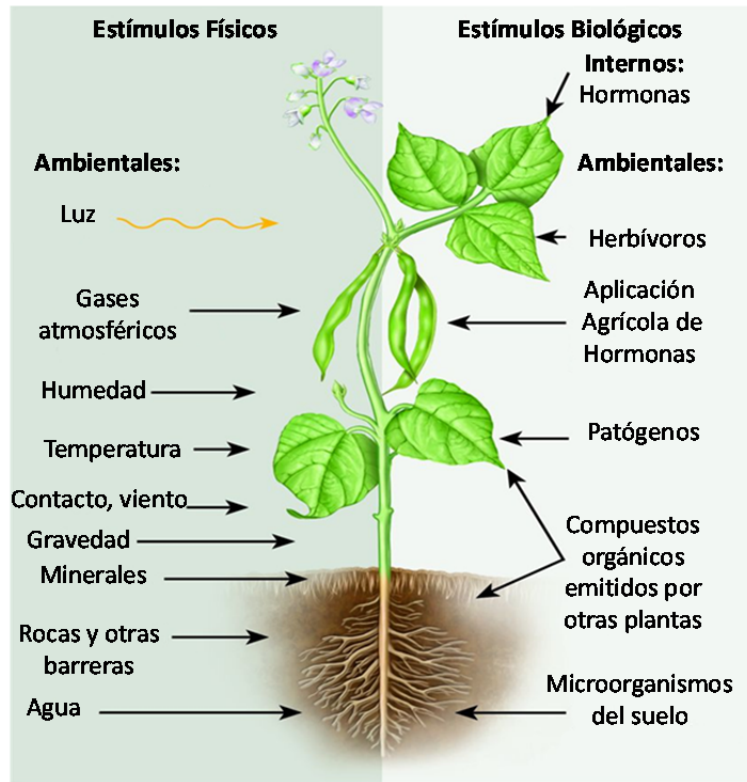
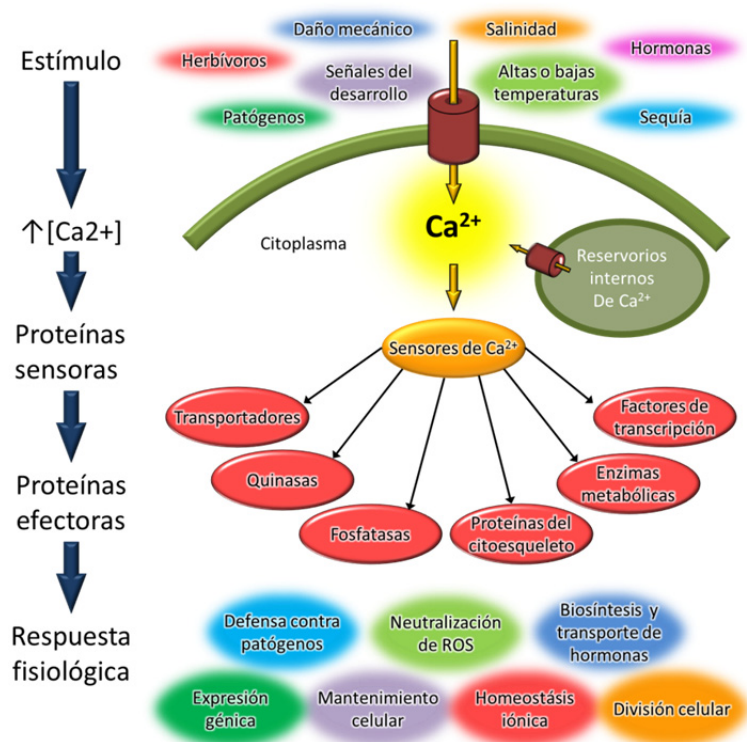


Figura I Estímulos físicos y biológicos que afectan a las plantas durante el desarrollo.

### Calcio como segundo mensajero

El calcio está involucrado en varias respuestas a estímulos abióticos y bióticos, incluyendo la luz, temperaturas altas o bajas, el contacto, la sal y la sequía, el estrés osmótico, las hormonas vegetales, los elicitores fúngicos, y los factores de nodulación (Knight & Knight 2001; Kudla et al. 2010; Sanders et al. 1999; Sanders et al. 2002; Scrase-Field & Knight 2003). Estos estímulos inducen un patrón espacio-temporal de cambios en la concentración de calcio citosólico libre que resultan de la acción concertada de canales, bombas y transportadores (Miedema et al. 2001; Tanaka et al. 2010). Estas señales de calcio son interpretadas a través de un conjunto de proteínas sensoras que transmiten y amplifican esta información río abajo a proteínas efectoras. Entre las moléculas efectoras se encuentran enzimas, proteínas del citoesqueleto, factores de transcripción y transportadores que conforman la maquinaria celular responsable de generar la respuesta fisiológica apropiada (Figura II).



**Figura II El paradigma del calcio.** Los estímulos ambientales y las señales de desarrollo son percibidos en la superficie celular o intracelularmente e inducen aumentos transitorios de calcio (firmas) que son decodificados por proteínas sensoras que transmiten la señal río abajo a través de proteínas efectoras desencadenando la respuesta. La figura fue adaptada de (DeFalco et al. 2010)

Debido a su flexibilidad al exhibir diferentes números de coordinación y geometrías complejas, el calcio puede fácilmente formar complejos con proteínas, membranas y ácidos orgánicos. Por otro lado, esta característica convierte al calcio en un compuesto tóxico a altas concentraciones ya que formaría complejos insolubles con el fosfato que son incompatibles con la viabilidad celular. Por este motivo la concentración intracelular de calcio está sujeta a un estricto control espacial y temporal lo cual contribuyó al surgimiento de las numerosas cascadas de señalización mediadas por este catión.

El aparente antagonismo entre las elevadas concentraciones de calcio (nivel mM) en el medio extracelular y en ciertas organelas y estructuras celulares y su baja concentración en el citoplasma (100-200 nM) atrajo la atención de numerosos investigadores. El primer trabajo que indicaba que el calcio actuaba como segundo mensajero en plantas se realizó en el alga verde *Chara* (Williamson & Ashley 1982). Desde entonces se han reportado elevaciones transitorias en la concentración de calcio citosólico en una multitud de procesos fisiológicos, incluidas las respuestas a estreses abióticos, hormonas y patógenos. Los avances en las técnicas de monitoreo del calcio han permitido un análisis detallado de la dinámica del calcio celular. Varios grupos reportaron que cambios definidos en la concentración de calcio citosólico son provocados por segundos mensajeros celulares, tales como NAADP, IP<sub>3</sub>, IP<sub>6</sub>, esfingosina-1-fosfato, y cADPR (Allen et al. 1995; Blatt et al. 1990; Drobak & Ferguson 1985; Gilroy et al. 1990; Lemtiri-Chlieh et al. 2003;

Navazio et al. 2000; Schumaker & Sze 1987), y se hizo evidente que la identidad y la intensidad de un estímulo específico provoca alteraciones estímulo-específicas y dinámicas de la concentración citosólica de calcio (Allen et al. 1995; McAinsh et al. 1995). Esta heterogeneidad de los aumentos en la concentración de calcio citosólico en términos de duración, amplitud, frecuencia y distribución espacial condujeron a AM Hetherington y colaboradores a plantear el concepto de "firmas de calcio" (Webb et al. 1996). Así, la información de la señal sería codificada por una firma de calcio específica definida espacial, temporal y magnitudinalmente.

Sistemas de una sola célula, tales como las células de guarda, tubos polínicos en crecimiento, o pelos radiculares, representan excelentes modelos para investigar las respuestas primarias y autónomas del calcio. Sin embargo, la respuesta final de la planta a los estímulos externos se manifiesta por la regulación de los procesos de crecimiento complejos en distintos tejidos y órganos. Paralelamente a la diversidad de las firmas de calcio estímulo-específicas a nivel de una sola célula, la diferenciación da lugar a otro orden de respuestas en los tejidos u órganos. Este nivel adicional de complejidad podría contribuir a una mayor diversidad en respuestas locales o sistémicas. Por lo tanto, la investigación sobre la señalización de calcio en plantas ha utilizado sistemas modelo de una sola célula y en paralelo avanza en la elucidación de la dinámica del calcio en el contexto del tejido y en todo el organismo.

## **Generación de las señales de calcio**

Una señal de calcio se define por la activación ordenada de canales de calcio en diferentes membranas celulares seguida por la sucesiva inactivación de canales y activación de los transportadores de eflujo para terminar el influjo de calcio y reequilibrar la homeostasis del calcio celular. Ambos procesos están estrictamente regulados y definen el resultado fisiológico de la señalización de calcio.

## **El influjo de calcio**

Distintos tipos de canales iónicos capaces de mediar flujos de calcio coexisten en diferentes tipos de células y tejidos. De acuerdo a su mecanismo de activación, estos canales se pueden clasificar como dependientes del voltaje, voltaje-independientes/dependientes de ligando, y canales de calcio activados por estiramiento (stretch-activated calcium channels)(Cosgrove & Hedrich 1991; Dutta & Robinson 2004; Nakagawa et al. 2007; White et al. 2002; White & Broadley 2003). Recientemente se identificó una nueva familia de canales de calcio mecanosensitivos inducidos por hiperosmolaridad denominados OSCAs (Hou et al. 2014; Yuan et al. 2014).

En función de sus propiedades de activación específicas, los canales de calcio pueden dar forma a los parámetros del influjo de calcio y a la firma de calcio resultante (Demidchik & Maathuis 2007; White et al. 2002). Esto permite a la planta traducir una amplia gama de señales en distintas firmas de calcio (Miedema et al. 2001). Por otra parte, la variabilidad en la abundancia específica de los diferentes tipos de canales probablemente refleja las necesidades especiales de un tipo de célula o tejido (Demidchik et al. 2002).

Aparentemente los clásicos canales de receptores IP3 y el sistema STIM/ORAI descritos en células animales están ausentes en plantas. Sin embargo, varios trabajos recientes sugieren que los canales catiónicos modulados por glutamato, (GLR, glutamate receptor like) y los canales regulados por nucleótidos cíclicos (CNGCs) desempeñan un papel preponderante en la formación de las firmas de calcio en plantas (Steinhorst & Kudla 2014). A continuación se mencionan brevemente los diferentes canales descritos en plantas:

➤ ***Canales dependientes de voltaje en la membrana plasmática***

Los canales permeables al calcio dependientes del voltaje han sido clasificados como canales permeables al calcio activados por despolarización (DACCs) y por hiperpolarización (HACCs) (White et al. 2002). Aunque las propiedades de DACCs y HACCs están bien estudiadas electrofisiológicamente (Grabov & Blatt 1998; Thion et al. 1998), la identidad molecular de estos canales es aún desconocida (White et al. 2002). En el genoma de *C. reinhardtii* se identificaron 9 VDCCs potenciales, estos canales están presentes en algas verdes y en carofitas sin embargo secuencias homólogas a VDCCs no se encontraron en embriofitas (Edel & Kudla 2015).

➤ ***Canales activados por ligando en la membrana plasmática***

Los CNGCs son activados mediante la unión de los nucleótidos cíclicos cAMP y cGMP y contienen un sitio de unión a calcio/calmodulina que se solapa con el dominio de unión de los nucleótidos. En consecuencia, la unión del complejo calcio/calmodulina resulta en la inactivación de los CNGCs a través del bloqueo del dominio de unión de los nucleótidos cíclicos (Hua et al. 2003). Se han identificado 20 GNGCs en el genoma de *Arabidopsis* y 16 en arroz (Edel & Kudla 2015).

➤ ***Receptores de glutamato***

Los receptores de glutamato (GLRs) son canales de cationes no selectivos activados por glutamato así como también por otros aminoácidos que median el influjo de calcio (Chiu et al. 2002).

➤ ***Canales dependientes de voltaje en otras membranas celulares***

La coexistencia de canales dependientes de voltaje y activados por ligando parece no estar restringida sólo a la membrana plasmática sino que también funcionan en la membrana vacuolar. TCP1 es un canal dependiente de voltaje presente en el tonoplasto que contribuye a la elevación del calcio citosólico a través del eflujo del calcio de la vacuola (Peiter et al. 2005).

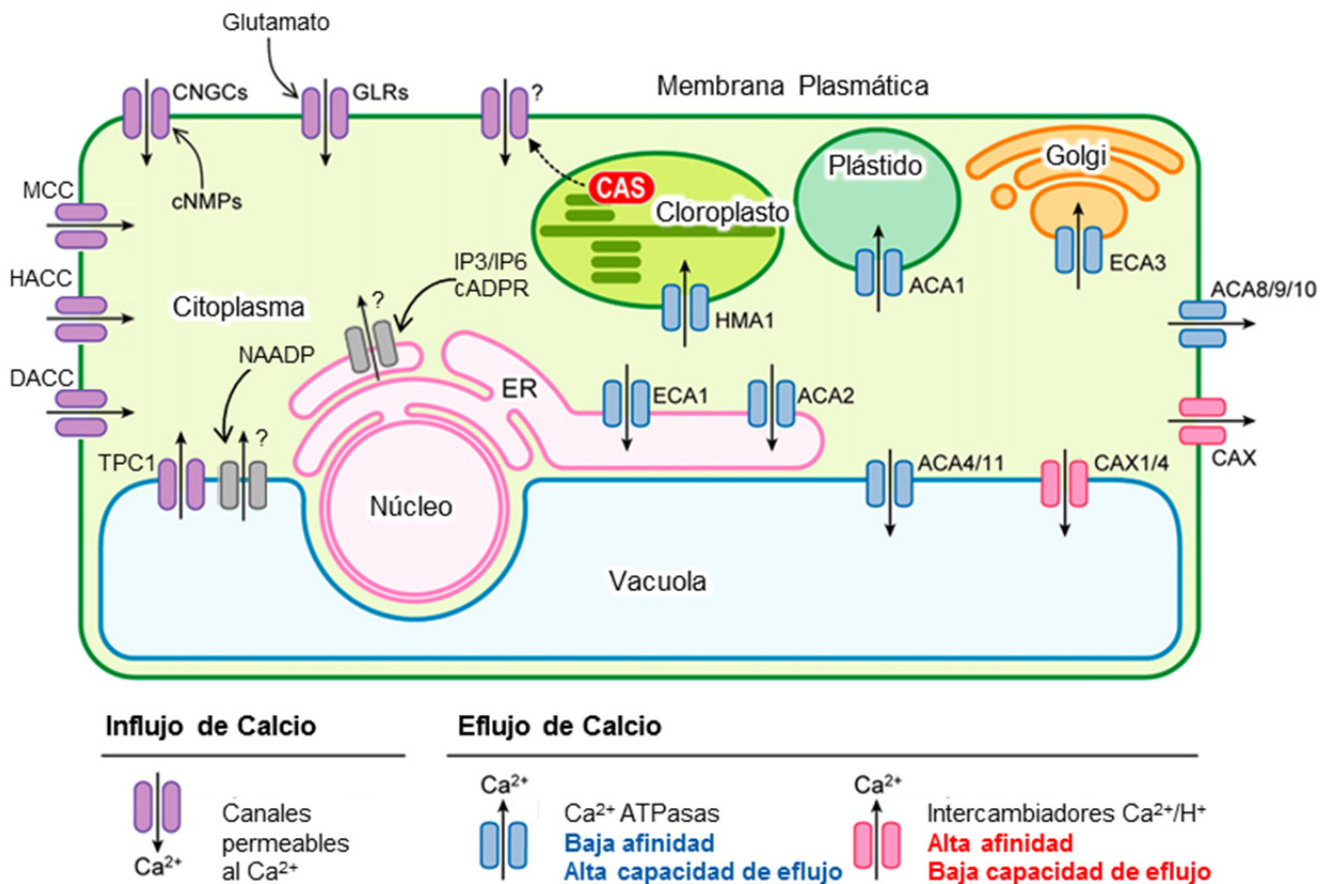
➤ ***Canales activados por ligando en las membranas vacuolares y del retículo endoplasmático***

A pesar de que estudios electrofisiológicos avalaron la existencia de canales activados por ligando en el tonoplasto y sugirieron que podrían estar regulados por IP3/IP6 y cADPR, la identidad molecular de los mismos aún se desconoce (Allen et al. 1995; Lemtiri-Chlieh et al. 2003; Martinec et al. 2000; Muir & Sanders 1996; Navazio et al. 2000; Schumaker & Sze 1987). No se han identificado en plantas secuencias similares a los receptores de IP3 de animales. Adicionalmente, existiría un canal activado por NAADP en la membrana del retículo endoplasmático aunque, al igual que los anteriores, se desconoce su identidad (Navazio et al. 2000).

## El eflujo de calcio

Gran parte de la investigación de la señalización por calcio se ha enfocado en la comprensión del aumento de los niveles de calcio mediado por canales de liberación de calcio. Sin embargo, para la creación de una señal específica, el eflujo de calcio es tan importante como su influjo. La extrusión del calcio desde el citosol se logra a través de las bombas  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas (ACA) y por los sistemas intercambiadores  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  (CAX). Ambos transportadores están distribuidos en las diferentes organelas subcelulares y en la membrana plasmática. Al igual que en animales, en plantas las bombas  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas son de tipo IIA y IIB. Las tipo IIB sensan el calcio a través de un dominio N-terminal de unión a calmodulina (Hwang et al. 2000a). En *Arabidopsis* se reportó que ACA 2 se expresa en el retículo endoplasmático, ACA 4 y 11 en el tonoplasto, y ACA 8–10 en la membrana plasmática (Boursiac & Harper 2007; Harper 2001; Kudla et al. 2010; Sze et al. 2000). Las ACAs median el eflujo de calcio con alta afinidad ( $K_m = 0,1\text{--}2\mu\text{M}$ ) pero baja capacidad, mientras que el sistema intercambiador es responsable del eflujo de baja afinidad ( $K_m = 10\text{--}15\mu\text{M}$ ) pero poseen alta capacidad (Bose et al. 2011). Recientemente, se ha caracterizado una  $\text{Ca}^{2+}$ ATPasa tipo IIB de arroz, la isoforma OsACA6, que promueve la tolerancia a salinidad (Huda et al. 2013).

Un resumen esquemático de los canales y transportadores se ilustra en la Figura III.



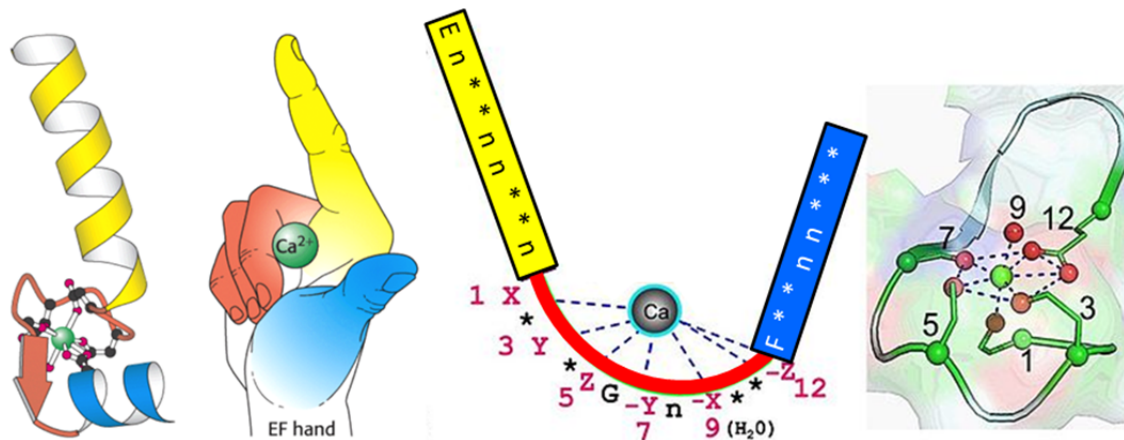
**Figura III Sistemas de transporte de calcio en una célula de *Arabidopsis*.** Se muestran las vías de influjo y eflujo de calcio que han sido identificadas a nivel molecular. CNGC, canal activado por nucleótidos cíclicos (cNMPs); GLR, receptor de glutamato; TPC1, canal de doble poro 1; CAS, receptor sensor de calcio; ACA, ATPasa autoinhibida por calcio; ECA, ATPasa de calcio del retículo endoplasmático; HMA1, ATPasa1 de metales pesados; CAX, intercambiador

de cationes. IP3, inositol trifosfato; IP6, inositol hexaquisfosfato; cADPR, ADP-ribosa cíclica; NAADP, ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato. Adaptada de (Kudla et al. 2010).

Aunque la forma y la distribución espacio-temporal de las elevaciones de calcio podrían ser de importancia crítica para el acoplamiento entre el estímulo y la respuesta (Allen & Schroeder 2001), un nivel adicional de regulación y especificidad se obtiene a través de las proteínas de unión a calcio que funcionan como proteínas sensoras de la señal (Batistic & Kudla 2004; Edel & Kudla 2015). Estas proteínas decodifican y transmiten la información de las firmas de calcio en interacciones específicas proteína-proteína, cascadas definidas de fosforilación o respuestas transcripcionales (Finkler et al. 2007; Luan et al. 2002; Sanders et al. 2002). En consecuencia, la interacción dinámica entre las firmas de calcio y las proteínas sensoras del catión contribuye a generar la especificidad de la señalización por calcio.

### Proteínas sensoras de calcio

Las plantas poseen una batería de proteínas sensoras que detectan las firmas de calcio, las decodifican y transmiten la información a componentes río abajo para generar una respuesta adecuada. La mayoría posee el motivo clásico EF-hand, que al coordinarse con el calcio provoca cambios conformacionales en la proteína. Este motivo, altamente conservado, consiste en 29 aminoácidos con una estructura hélice-giro-hélice. Se asemeja a una mano con el dedo índice y el pulgar extendido en ángulos rectos al resto de los dedos, enroscada hacia la palma formando la curvatura o *loop* (Figura IV). La curvatura (loop) consiste en 12 aminoácidos con residuos que coordinan al calcio. La unión de calcio genera cambios conformacionales que exponen bolsillos hidrofóbicos. A su vez estos sitios facilitan la interacción con otras proteínas. Estos motivos ocurren típicamente en pares y facilitan la unión a calcio con alta afinidad de forma cooperativa.



**Figura IV Estructura del motivo EF hand presente en los sensores de calcio.** Se muestra la estructura de hélice-loop-hélice y los aminoácidos que se coordinan con el calcio.

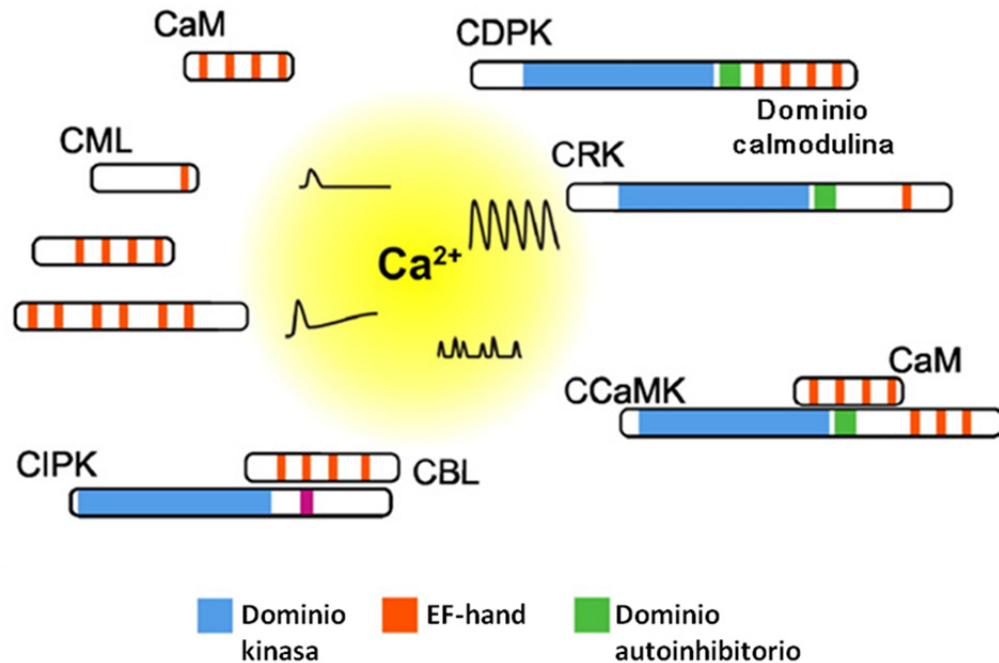
Los sensores de calcio pertenecen a las siguientes familias génicas:

- Calmodulinas (CaM)
- Proteínas similares a la calmodulina (CMLs)
- Quinasas dependientes de calcio/calcio-CaM (CCaMKs)

- Quinasas de proteínas dependientes de calcio (CDPKs)
- Quinasas relacionadas a CDPKs (CRKs)
- Proteínas similares a la calcineurina B (CBLs)
- Quinasas que interactúan con las CBLs (CIPKs)

Conceptualmente las proteínas sensoras de calcio se clasifican en sensoras y sensoras/transductoras. Las proteínas sensoras no poseen actividad enzimática *per se* sino que modifican la actividad de proteínas blanco a través de interacciones proteína-proteína. Entre estas proteínas se encuentran las CaMs, CMLs y CBLs (Figura V). En particular las CBLs interactúan específicamente con las CIPKs por lo tanto los complejos CBL-CIPKs se consideran sensores/transductores bimoleculares.

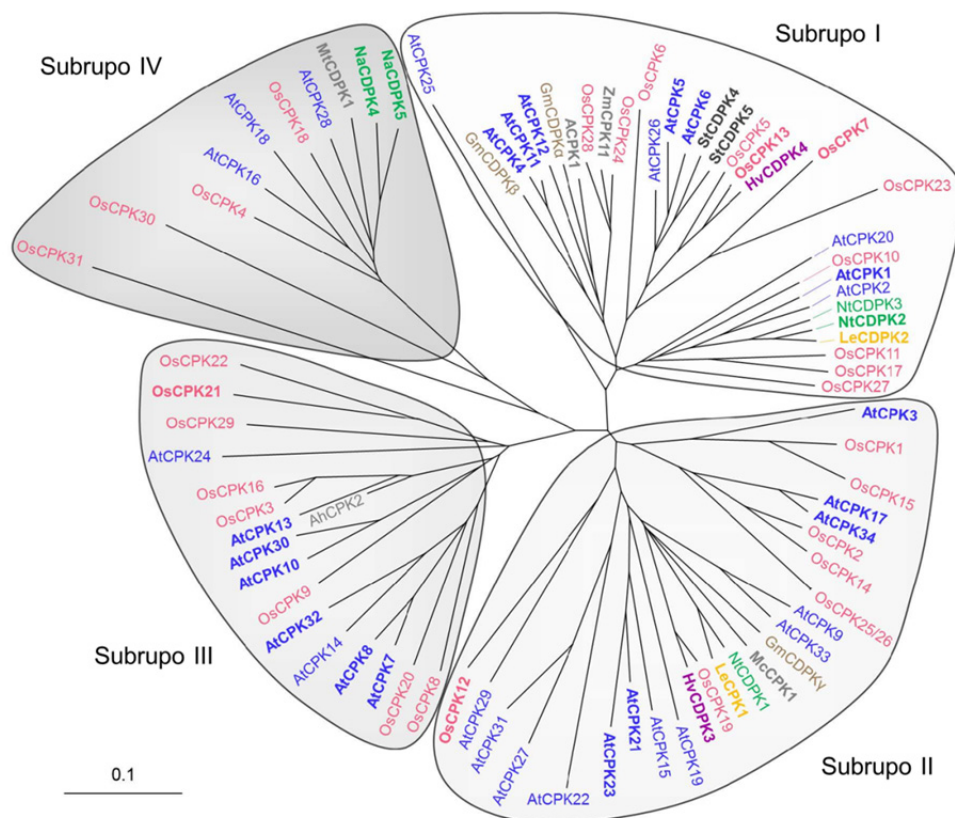
Por otro lado, las proteínas sensoras/transductoras son aquellas que tras unir calcio sufren un cambio conformacional que modifica directamente su actividad. Tal es el caso de las CDPKs, cuya estructura monomérica incluye un dominio quinasa de proteínas directamente unido al dominio CaM por lo que combinan la capacidad de unión al calcio y la capacidad efectora en una sola molécula. Las quinasas de proteínas catalizan la transferencia reversible del fosfato y 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. La red de quinasas de proteínas de serina/treonina 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. Las CDPKs traducen la información contenida en las firmas de calcio en eventos de fosforilación de proteínas blanco específicas. Las CRKs son similares a las CDPKs pero su dominio CaM está degenerado. A diferencia de las anteriores, las CCaMKs son quinasas reguladas de manera dual. Estas proteínas unen calcio a través de un dominio similar a visisina, mientras que el complejo calcio-calmodulina se une al dominio regulatorio potenciando su actividad.



**Figura V Proteínas sensoras de calcio en plantas.** CaMs, CMLs y CBLs contienen sitios EF hands (rojo) y regulan proteínas blanco. No contienen dominios adicionales. CBLs interactúan y modulan la actividad de las CIPKs. CDPKs, CRKs, CCaMK y CIPKs son quinasas de serina/treonina (dominio quinasa en azul). En verde se señala el dominio autoinhibitorio. Adaptado de (Batistic & Kudla 2012).

## Quinasas de proteínas dependientes de calcio (CDPKs)

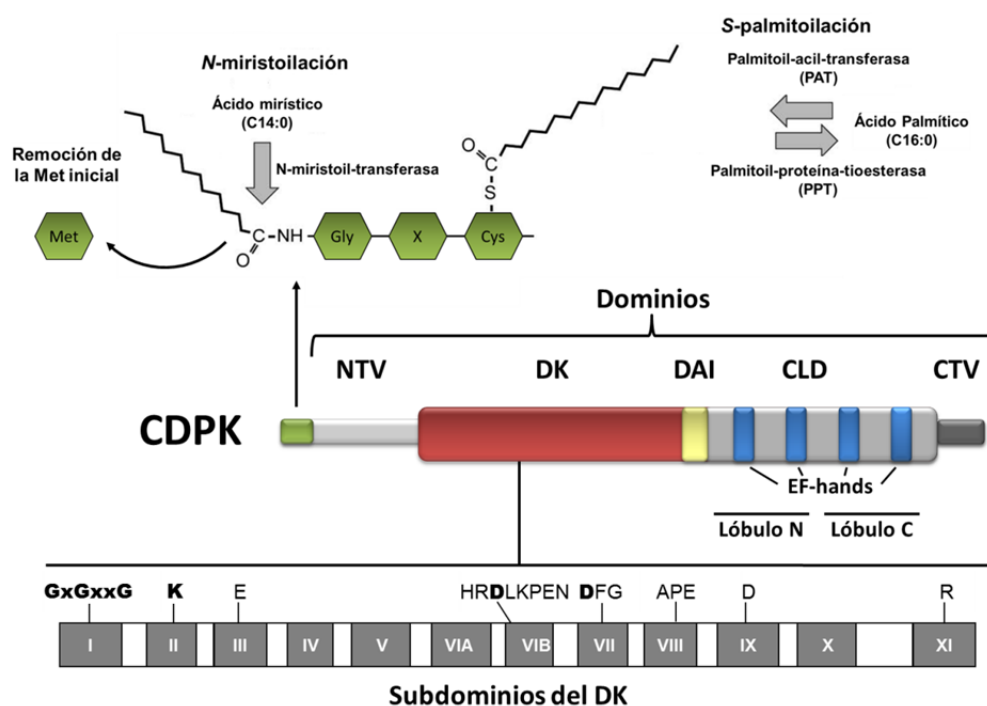
Las CDPKs son quinasas de proteínas de serina/treonina exclusivas de plantas y de algunos protistas ciliados del grupo Apicomplexa (Harper & Harmon 2005). La primera CDPK se describió en soja (*Glycine max*) hace aproximadamente 25 años (Harmon et al. 1987; Harper et al. 1991) y desde entonces se las ha encontrado en todas las especies del reino vegetal desde las algas verdes hasta las angiospermas. En angiospermas las CDPKs típicamente conforman familias multigénicas de alrededor de 30 miembros que se distribuyen en 4 subgrupos (Figura VI).



**Figura VI** Árbol filogenético de la familia CDPK construido con isoformas de CDPKs de diversas angiospermas. La longitud de las ramas es proporcional a la divergencia y la escala de 0,1 representa un cambio de 10%. Las CDPKs en negrita son aquellas cuya función biológica es conocida. Adaptada de Boudsocq & Sheen (2013)

La comparación de la familia CDPK de diversas angiospermas (*Arabidopsis*, arroz y *Populus trichocarpa*) con la de gimnospermas, pteridofitas y briofitas y con la de algas verdes sugiere que la arquitectura de la familia CDPK se modeló cuando las plantas colonizaron la tierra ya que los 4 subgrupos se conservan en briofitas y pteridofitas mientras que las CDPKs de algas verdes evolucionaron en forma independiente. Además esta comparación permite sugerir que la familia CDPK de angiospermas surgió de eventos de duplicación recientes de genes que son comunes a todas las embriofitas más que a la diversificación de candidatos linaje específicos (Valmonte et al. 2014). Las plantas terrestres han desarrollado la capacidad de sobrevivir en ambientes secos y han debido adaptarse tanto fisiológica como estructuralmente para tolerar los estreses asociados con la vida en la tierra. Estas adaptaciones incluyen mayor tolerancia a la desecación y adaptación a la radiación UV directa. Curiosamente, las funciones más frecuentemente atribuidas a isoformas de CDPKs en angiospermas se asocian con las respuestas a estreses abióticos.

El peso molecular de estas proteínas monoméricas oscila entre 40 y 90 kDa y tienden a ser ligeramente ácidas con puntos isoeléctricos (pI) entre 5 y 6. Presentan cinco dominios, un dominio amino terminal variable (NTV) cuya longitud oscila entre 21 y 185 aminoácidos, un dominio quinasa de serina/treonina muy conservado (DK), un dominio bisagra, autoinhibitorio o pseudosustrato (DAI) que interacciona con el sitio activo, un dominio regulatorio similar a calmodulina (CLD) y un dominio carboxilo terminal de longitud variable (Harmon 2003). Se postula que la estructura de la CDPK evolucionó a partir de un evento de recombinación ancestral que produjo la fusión de una quinasa de serina/treonina con una calmodulina (Zhang & Choi 2001).



**Figura I Estructura de la CDPKs.** NTV: dominio aminoterminal variable; DK: dominio quinasa de proteínas serina/treonina; DAI: dominio autoinhibitorio, CLD: dominio similar a calmodulina, CTV: dominio C-terminal variable. En la figura se detallan las enzimas que participan en las modificaciones lipídicas. Figura adaptada de (Hamel et al. 2014).

El dominio NTV de numerosas CDPKs presenta sitios de miristoilación y palmitoilación que regulan la localización subcelular de la proteína. Se ha demostrado que estas modificaciones lipídicas son necesarias para promover y estabilizar la asociación de CDPKs a membranas. La miristoilación en la glicina en posición 2 puede no ser suficiente para el anclaje a membrana y es necesaria una segunda modificación para aumentar la hidrofobicidad de la proteína. La adición de un ácido graso saturado de 16 carbonos (palmitato, C16:0) a través de un enlace tioéster a residuos cisteínas en la posición 3, 4 o 5 es una de las modificaciones lipídicas más ubíquas y está implicada en interacciones proteína-membrana, proteína-proteína, tráfico intracelular, etc. (Clark et al. 2004; Kalinina & Fricker 2003; Navarro-Lerida et al. 2004; Yang et al. 2004; Zhou et al. 2004). La miristoilación es una modificación co-traducciona e irreversible, en cambio la palmitoilación es post-traducciona y reversible, y depende de una miristoilación previa (Raices et al. 2003a; Thompson & Okuyama 2000). Las CDPKs están ampliamente distribuidas en diferentes compartimentos subcelulares, citosol, núcleo, membrana plasmática, peroxisomas, mitocondrias y RE así como asociadas a filamentos de actina (Chehab et al. 2004; Dammann et al. 2003; Sugiyama et al. 2000). Hay evidencias que la localización subcelular de las CDPKs es dinámica y responde a estímulos (Patharkar & Cushman 2006).

En el dominio quinasa, el subdominio I (motivo GXGXXG), la lisina (K) del subdominio II, y el aspártico (D) en el subdominio VII (motivo DFG), responsables del anclaje y orientación del ATP, están estrictamente conservados al igual que el aspártico del subdominio VIb (motivo DLK) involucrado en la reacción de fosfotransferencia.

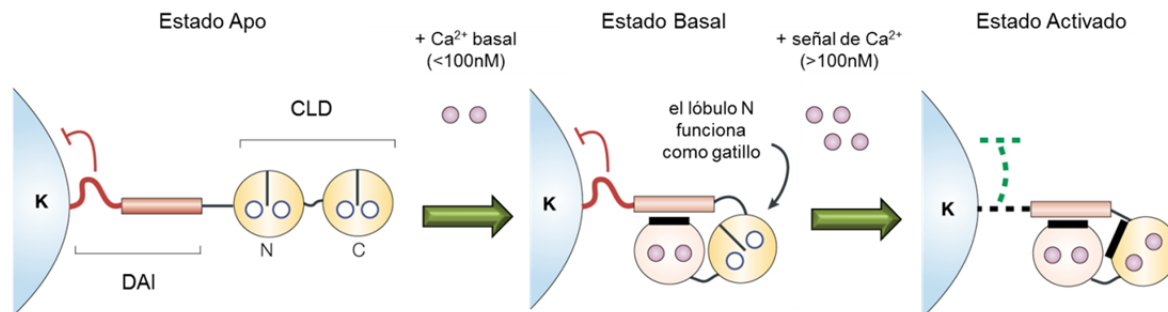
El dominio CLD contiene dos lóbulos (N y C terminales) cada uno conteniendo dos motivos EF-hand y es responsable de unir al calcio.

## Modo de activación de las CDPKs

Actualmente se postulan dos modelos de activación de las CDPKs (Harper & Harmon 2005):

1- El primer modelo propone que al unir el  $\text{Ca}^{2+}$ , el dominio CLD, se une al dominio bisagra desplazando el autoinhibidor y activando la quinasa.

2- El segundo modelo propone que el dominio CLD se encuentra unido al dominio bisagra cuando los niveles de calcio en la célula son basales. El lóbulo C-terminal del dominio regulatorio posee dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  unidos. Cuando el lóbulo N-terminal une otros dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  se produce la activación. Este modelo se encuentra respaldado por las evidencias más actuales (Figura VIII). El  $K_d$  propuesto para el lóbulo N-terminal es de  $1\ \mu\text{M}$ , consistente con este modelo. Se propone que la conformación del lóbulo N-terminal se modifica cuando une calcio e induce un cambio conformacional en la interacción del dominio autoinhibitorio con el dominio quinasa (Christodoulou et al. 2004).



**Figura VIII Modelo de activación por calcio.** Estado Apo se refiere a ausencia de calcio. Imagen adaptada de (Harper & Harmon 2005).

Asimismo se ha reportado que las CDPKs pueden ser activadas por fosfolípidos, proteínas 14-3-3 y fosforilación (Camoni et al. 1998; Harper et al. 1993; Romeis et al. 2000; Szczegieliński et al. 2005).

## Función fisiológica de las CDPKs

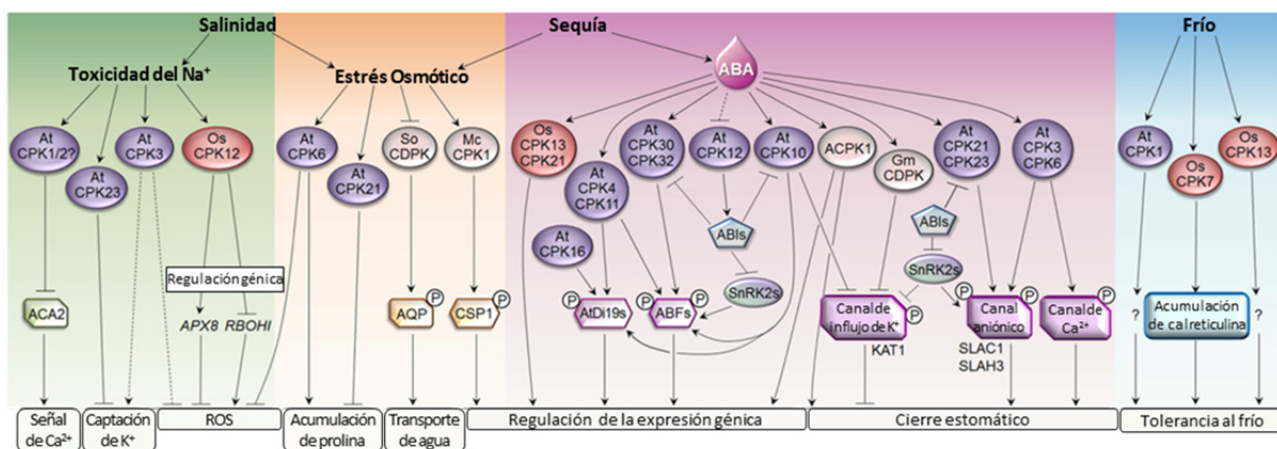
Los análisis de expresión de las CDPKs sugieren que éstas quinasas de proteínas intervienen en la respuesta a estreses abióticos y bióticos (Boudsocq & Sheen 2013), en procesos de desarrollo y en respuestas hormonales. A continuación se detallan resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación en:

### ➤ *Estreses abióticos y en respuesta a ABA*

En arroz, la expresión de numerosas CDPKs se induce por estímulos abióticos y en los promotores de 29 de las 31 isoformas identificadas se encontraron elementos de respuesta a estrés (Wan et al. 2007). Se ha reportado que la sobreexpresión de isoformas de CDPK en arroz, tabaco y *Arabidopsis* confiere resistencia a la salinidad y al frío (Campo et al. 2014; Kang et al. 2013; Saijo et al. 2000;

Zou et al. 2010). Las isoformas OsCPK7 y OsCPK13 de arroz intervienen en la respuesta a bajas temperaturas (Abbasi et al. 2004; Komatsu et al. 2007) y la isoforma AtCPK23 de *Arabidopsis* desempeña un papel importante en la tolerancia al estrés osmótico; las plantas cpk23 son más resistentes a la sequía mientras que las plantas que sobreexpresan dicha isoforma son más sensibles (Ma & Wu 2007). En ensayos de doble híbrido (2H) se determinó que AtCPK4 y AtCPK11 interaccionan con el factor de transcripción AtDi19 de respuesta a sequía (*drought induced*) y desde entonces se ha encontrado que varios miembros de la familia AtDi interactúan con diferentes isoformas de CDPK (Rodriguez Milla et al. 2006). En condiciones de estrés salino McCPK1 de *Mesembryanthemum crystallinum* se trasloca desde la membrana plasmática al núcleo donde fosforila al pseudo-regulador de respuesta McCSP1 (Chehab et al. 2007; Patharkar & Cushman 2000)

Varios trabajos vinculan las CDPKs con la señalización de ABA y la regulación de los estomas (Yu et al. 2007). En particular se reportó que la isoforma CPK2 de *Arabidopsis* fosforila al canal SLAH3 en células de la guarda regulando así el cierre de los estomas (Geiger et al. 2011) y diversas CDPKs regulan canales aniónicos en respuesta a ABA (Scherzer et al. 2012). ABA regula la expresión de CDPKs en tabaco (Yoon et al. 1999), arroz (Li & Komatsu 2000) Vicia faba (Liu et al. 2006) y uva (Yu et al. 2006). A su vez las isoformas AtCPK32, AtCPK10 y AtCPK30 fosforilan factores de transcripción ABF de respuesta a ABA *in vitro* y la sobreexpresión de AtCPK32 produce hipersensibilidad al ABA durante la germinación de la semilla (Choi et al. 2005). Un resumen esquemático de lo mencionado se muestra en la Figura IX.



**Figura IX Participación de las CDPKs en el estrés abiótico.** Se mencionan isoformas específicas y sus blancos de acción propuestos. Adaptado de (Boudsocq & Sheen 2013)

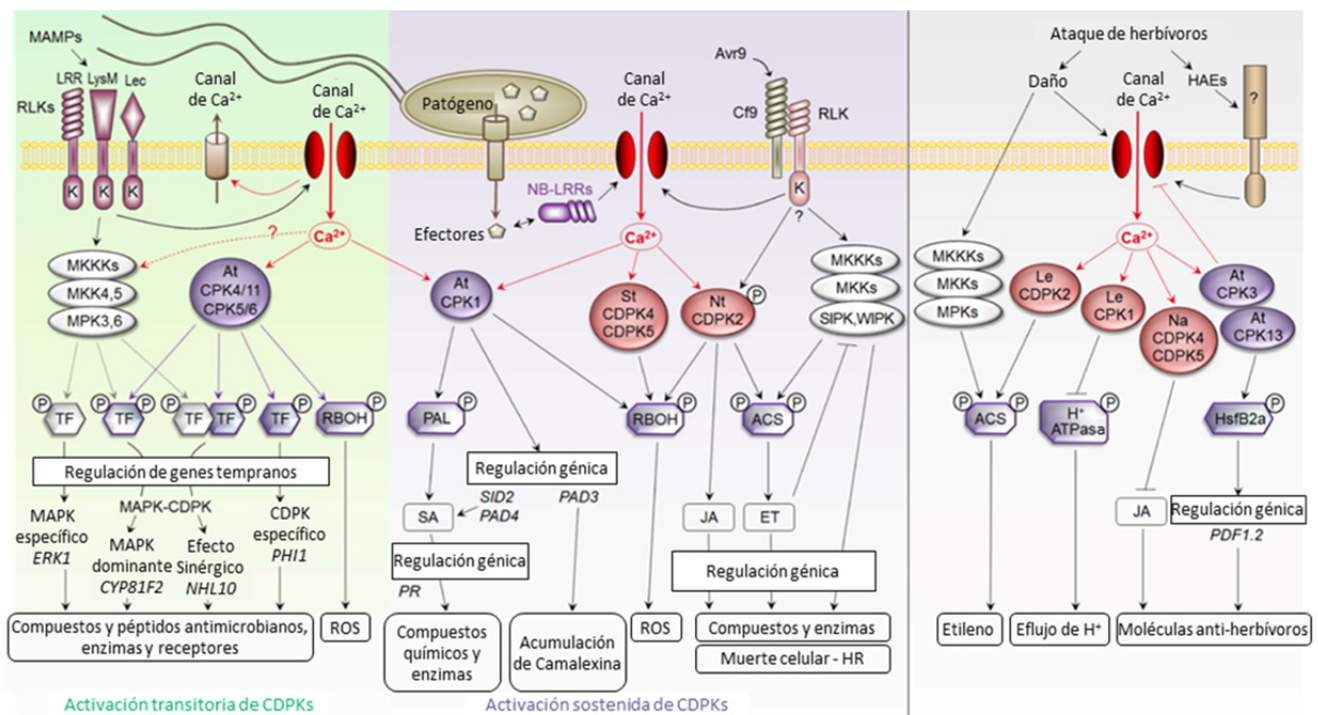
### ➤ En estreses bióticos

También se identificaron CDPKs que intervienen en respuestas defensivas contra patógenos y daño mecánico en plantas de tabaco y tomate (Chico et al. 2002; Ludwig et al. 2005; Romeis & Herde 2014; Romeis et al. 2000). Se demostró que las isoformas de tabaco NtCDPK2 y NtCDPK3 regulan la respuesta hipersensible (HR); plantas de *N. benthamiana* silenciadas en estas isoformas mostraron una respuesta HR demorada y reducida al ser tratadas con elicitores en los modelos gen a gen (Cf-4/Avr4 y Cf-9/Avr9) (Romeis et al. 2001) NtCDPK2 se activa *in vivo* por fosforilación

cuando plantas Cf9 de tabaco son tratadas con Avr9 (Romeis et al. 2000) y participa en la respuesta a patógenos mediada por etileno en una vía paralela a la señalización por MAPK (Ludwig et al. 2005). En tomate, la isoforma LeCDPK1 se induce frente a *C. fulvum* y en respuesta al daño mecánico (Chico et al., 2002) (Chico et al. 2002).

En *Arabidopsis* se demostró que seis isoformas del grupo I están involucradas en la inmunidad innata; CPK1/2 controlan el inicio de la HR y junto a CPK4/11 fosforilan NADPH oxidasas productoras de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Snedden & Fromm 2001). Tratamientos con elicitores activaron las CPK4/5/6/11 que actuaron como reguladores transcripcionales de receptores de reconocimiento de patrones moleculares de patógenos (PAMP-R) (Sugiyama et al. 2000). Se determinó que AtCPK1 fosforila a la fenilalanina amonio liasa (PAL) que es la enzima responsable de la producción de metabolitos secundarios que intervienen en respuestas defensivas (Cheng et al. 2001) y que AtCPKs 1 y 16 fosforilan la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa ACA8 de membrana plasmática (Giacometti et al. 2012). Las CDPKs desempeñan un papel importante en la producción de ROS; la sobreexpresión ectópica de AtCPK1 en protoplastos de tomate generó un estallido oxidativo aumentado debido a una mayor actividad de la RBOH (*respiratory burst oxidase homologues*) (Xing et al. 2001). Las RBOHs poseen motivos EF-hand en su extremo N-terminal, y se demostró que la AtRBOHD se activa en forma sinérgica por calcio y fosforilación (Ogasawara et al. 2008). Asimismo la  $\text{H}^{+}$ -ATPase PMA2 de *Nicotiana plumbaginifolia* es fosforilada *in vitro* por la CPK1 de tomate (Rutschmann et al. 2002). En papa se observó que una CDPK fosforila al co-activador transcripcional StMBF1 inducido en respuesta a elicitores (Zanetti et al. 2003) y que StCDPK4 y StCDPK5 fosforilan y activan la NADPH oxidasa RBOHs de papa (Kobayashi et al. 2007). La expresión constitutiva de StCDPK5 en plantas de papa confiere resistencia a *P. infestans* (Yoshioka et al. 2009) y la expresión de OsCPK13 (también nombrada CDPK7) de arroz en *Sorghum bicolor* induce muerte celular, acumulación de proteínas PR e inducción de genes defensivos (Mall et al. 2011).

En soja se demostró que la oleato desaturasa, FAD2, responsable de la producción de ácido linoleico es negativamente regulada por fosforilación y se sugiere que una actividad CDPK estaría involucrada en dicha inhibición (Tang et al. 2005). Las isoformas NaCDPK4 y 5 de *Nicotiana attenuata* regulan negativamente la producción de JA, posiblemente a través de la fosforilación de las enzimas biosintéticas del JA, alene oxidasa sintasa (AOS) y alene oxidasa ciclasa (AOC) (Hettenhausen et al. 2013) y en este caso la inducción de determinadas CDPKs sería perjudicial para la planta. También en cebada se observó que la expresión transitoria de la isoforma HvCDPK3 constitutivamente activa promueve la entrada de hongos mientras que la expresión transitoria de la isoforma HvCDPK4 induce la propagación de la HR desde el sitio de transformación indicando que diferentes isoformas desempeñan roles antagónicos en la respuesta a patógenos (Freymark et al. 2007). Un resumen esquemático del rol de las CDPKs en el estrés abiótico se muestra en la Figura X.



**Figura X CDPKs de diferentes especies que participan en procesos defensivos.** Se mencionan los sustratos identificados. Adaptado de (Boudsocq & Sheen 2013).

## ➤ Desarrollo

Asimismo se ha observado cambios en la expresión, acumulación y/o actividad de isoformas específicas de CDPKs en varios procesos de desarrollo, tales como la embriogénesis en sándalo (Anil et al. 2003) la elongación de la fibra de algodón (Huang et al. 2008), el crecimiento del tubo polínico (Gutermuth et al. 2013; Myers et al. 2009); la elongación del tallo en *Arabidopsis* (Matschi et al. 2013) y el llenado del grano de arroz (Manimaran et al. 2015). Nuestro grupo demostró que varias CDPKs se expresan durante la tuberización y la brotación del tubérculo (como fuera mencionado en el ítem “Antecedentes del laboratorio en el estudio de CDPKs”) y que la isoforma MtCPK3 interviene en el proceso de nodulación en *Medicago* sp. (Gargantini et al. 2006). Las líneas MtCPK3 ARNi tienen mayor número de nódulos en raíces en forma similar al mutante *sunn* (*supernumerary nodule*). A su vez el mutante *sunn* presenta una disminución en los niveles de expresión de MtCPK3 confirmando el rol de esta isoforma en la regulación del número de nódulos (Schnabel et al. 2005). Hay evidencias que las CDPKs podrían regular varias enzimas metabólicas, tal es el caso, de OsCPK23 que controlaría la biosíntesis del almidón via la sacarosa sintasa (SuSy) durante el desarrollo del endosperma de arroz (Asano et al. 2002; Nakai et al. 1998; Zhang & Chollet 1997). También la nitrato reductasa y la sacarosa fosfato sintetasa son reguladas por CDPKs (Douglas et al. 1998; McMichael et al. 1995)

La participación de las CDPKs en el desarrollo del tubo polínico se demostró en diversas especies; en maíz la inhibición de una CDPK específica de polen impidió la germinación del polen y el crecimiento del tubo (Estruch et al. 1994); en tabaco se sugirió que una isoforma específica regularía la auto-incompatibilidad (Kunz et al. 1996); en petunia se observó que la sobreexpresión de *PiCDPK1*, una isoforma asociada a membrana, afecta la polaridad del tubo e incrementa la

concentración de calcio en el ápice del tubo mientras que la sobreexpresión de *PiCDPK2* inhibe la elongación. Los autores proponen que *PiCDPK1* podría regular la  $[Ca^{2+}]$  al inhibir la bomba ACA1 tal como ocurre con ACA2 y AtCPK1 (Hwang et al. 2000b; Yoon et al. 2006). Mientras tanto en *Arabidopsis*, el polen de las plantas doble mutantes *cpk17/cpk34* tiene un desarrollo y una viabilidad muy reducida (Myers et al. 2009).

### ➤ **Respuestas hormonales**

La participación de CDPKs en la señalización de ABA se mencionó previamente. También las auxinas afectan la expresión de CDPKs en *Vigna radiata* (Botella et al. 1996), en alfalfa (*Medicago sativa*) (Davletova et al. 2001) y en pepino (Lanteri et al. 2006). A su vez las CDPKs pueden afectar la biosíntesis de hormonas; tal es el caso del factor de transcripción RSG (*repression of shoot growth*) de tabaco que regula la biosíntesis de giberelinas (GAs) y es fosforilado por NtCDPK1. Dicha fosforilación lo asocia a la proteína 14.3.3 que lo secuestra al citosol y no puede ejercer su acción inductora sobre los genes biosintéticos de GA (Ishida et al. 2008). En el caso del etileno, las CDPKs fosforilan la ACS [ACC (1-amino-ciclopropano-1-carboxilato) sintetasa] y la estabilizan. La ACS cataliza el paso limitante en la producción de etileno (Hernandez Sebastia et al. 2004). Recientemente se analizó el papel de CPK28 en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* al regular el balance entre el ácido jasmónico (AJ) y las GAs (Matschi et al. 2015). La LeACS2 de tomate, enzima limitante de la biosíntesis de etileno es fosforilada por una CDPK (Fig.X) y dicha modificación estabiliza a la proteína aumentando la biosíntesis de etileno (Tatsuki & Mori 2001).

## Regulación de la expresión génica por miARNs

Recientemente, los ARNs pequeños no codificantes se han convertido en reguladores clave de la expresión génica en plantas y animales (Axtell 2013; Chen 2009). En plantas, hay muchas clases de ARNs pequeños no codificantes y las dos clases principales que se han estudiado en profundidad son los miARNs y los siARNs (Axtell 2013; Chen 2009). Aunque ambos son funcionalmente similares, se diferencian en su biogénesis. Los siARNs, de 20 a 24 nucleótidos de longitud, se procesan a partir de un ARN de doble cadena perfectamente apareado. Están principalmente involucrados en la modificación de la heterocromatina, el mantenimiento de la integridad del genoma mediante el silenciamiento de transgenes y transposones, en la defensa contra los virus y en la regulación génica (Chen 2009). Los miARNs son ARNs endógenos pequeños de simple cadena de aproximadamente 21 nucleótidos de longitud que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional a través de la degradación del ARNm o la interrupción de la traducción, dependiendo del nivel de complementariedad entre el miARN y el ARNm (Axtell 2013; Chen 2009). Los miARNs son procesados a partir de ARNs de simple cadena transcritos por la ARN polimerasa II, que poseen en su extremo 5' con el capuchón de 7-metil-guanina y están poliadenilados en su extremo 3'. Estos precursores se pliegan generando estructuras tipo tallo-burbuja (*stem-loop*) (Lu & Fedoroff 2000). En *Arabidopsis*, el miARN primario (pri-miRNA) es escindido en el núcleo generándose un precursor más corto (pre-miRNA) (Figura XI).

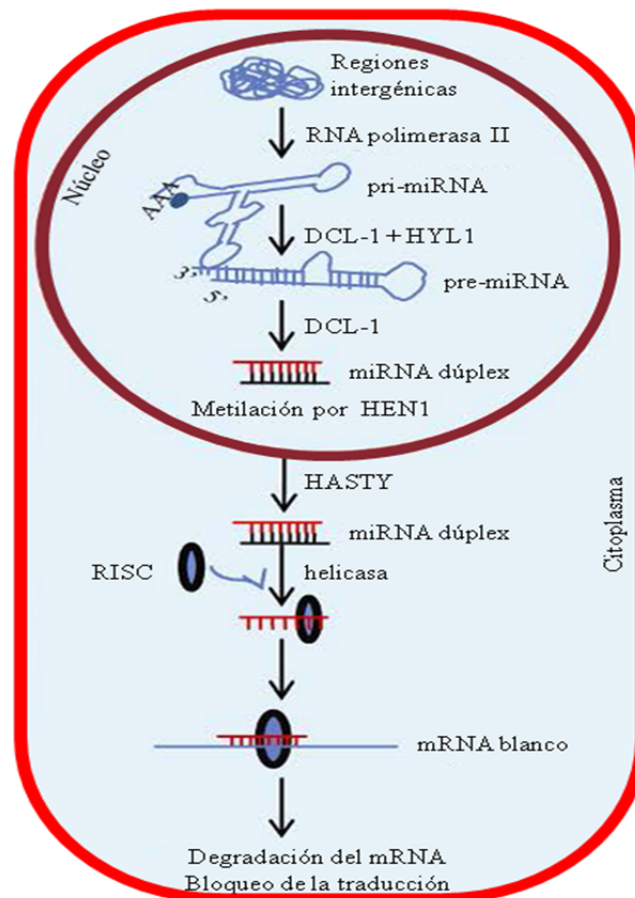


Figura XI Procesamiento y modo de acción de los miARNs en plantas. Adaptado de (Guleria et al. 2011)

La enzima responsable de este procesamiento es DCL1 con la ayuda de HYL1, una proteína de unión a ARN de doble hebra. El miARN maduro es luego liberado de la estructura tallo-burbuja del pre-miARN mediante un segundo corte producido nuevamente por la acción combinada de DCL1 y HYL1 (Vazquez et al. 2004). Los extremos 3' del miARN liberado son metilados por HEN1, una metiltransferasa específica de simple hebra. Se postula que esta metilación protegería a los ARNs de simple hebra de la poliuridilación y posterior degradación (Chen et al. 2002; Yu et al. 2005). El miARN dúplex es transportado al citoplasma junto con otros miARNs que dependen de la acción de la acción del HASTY (HST), ortólogo de la Exportina-5 de *Drosophila*, para su exportación nuclear. No obstante, el rol exacto de HST en la biogénesis de los miARNs aún no está claro ya que otras familias de miARNs parecen ser transportadas al citoplasma por un mecanismo independiente de HST (Park et al. 2002). En el citoplasma, una helicasa separa las hebras del dúplex y luego el miARN maduro de simple hebra se une a la proteína Argonauta AGO1, el centro catalítico del complejo RISC (RNA-induced silencing complex) que conduce la actividad endonucleasa de AGO1 para reprimir la expresión de ARNs complementarios. En plantas, la represión de la expresión génica mediada por miARNs es predominantemente mediada por escisión del transcripto. Esto difiere de lo que ocurre en animales e insectos, en los cuales el modo predominante es la represión traduccional mediada por la unión del miARN a su ARNm blanco en el cual las secuencias blanco se encuentran en la región 3'-UTR (Mallory & Vaucheret 2006).

La regulación génica mediante miARNs ocurre de tres modos diferentes: (1) degradación del ARNm blanco (2) represión de la traducción y (3) disminución del ARNm mediado por miARN (Zhang et al. 2007). Entre ellos, la degradación del ARNm blanco y la represión de la traducción, son las vías más comunes de la regulación génica. El grado de complementariedad entre el miARN y el ARNm blanco determina de qué manera ocurrirá el silenciamiento. Cuando la secuencia del miARN y la secuencia blanco hibridan perfectamente o casi perfectamente, el ARNm blanco es escindido, mientras que el apareamiento imperfecto entre el miARN y el ARNm blanco causa la interrupción de la traducción sin degradación del ARNm (Bartel 2004; Rhoades et al. 2002). Debido a que la complementariedad cumple un rol central en la degradación del ARNm, el número de bases apareadas entre miARN y el ARNm blanco determina el grado de inhibición de la traducción (Cuellar & McManus 2005). Cuantas más bases se apareen correctamente, más eficiente es la inhibición de la traducción (Kim 2005). Se ha reportado que los miARNs se unen a la 5'UTR, a la secuencia codificante y a la 3'UTR (Zeng et al. 2002). Se ha demostrado que durante la síntesis proteica, los miARNs detienen el movimiento de los ribosomas a lo largo del ARNm, y de este modo inhiben la traducción. Sin embargo, este no es el criterio universal, ya que ciertos miARNs que poseen una perfecta complementariedad con el ARNm inhiben la traducción pero no degradan el ARNm (Aukerman & Sakai 2003; Carrington & Ambros 2003; Chen 2004). Varios estudios mostraron evidencia de la existencia de una tercera vía de regulación mediada por miARNs. Cuando el miARN comparte similitud parcial o muy baja con el ARNm blanco, el miARN provoca la caída de los niveles del ARNm en vez de degradarlo o interrumpir la traducción (Bagga et al. 2005; Jing et al. 2005; Wu & Belasco 2005). El mecanismo de esta disminución consiste en que el miARN acelera la eliminación de la cola de poli-A del mensajero, volviéndolo inestable y provocando su caída (Wu et al. 2006). Este mecanismo solo se ha reportado en animales hasta ahora.

Muchas familias de miARNs están conservadas en numerosas especies de plantas, incluso algunas están conservadas entre grupos muy distanciados evolutivamente, tal es el caso de los musgos y las angiospermas (Cuperus et al. 2011). Los miARNs conservados tienen blancos homólogos en múltiples especies (Jones-Rhoades 2012), demostrando que las relaciones miARN/blanco han sido estables por largos períodos durante la evolución de las plantas. La mayoría de los miARNs conservados desempeñan roles regulatorios en procesos biológicos esenciales (Tabla I).

**Tabla I Ejemplos de miARNs y procesos de desarrollo en los que participan**

| <b>miARN</b>  | <b>Gen blanco</b>                   | <b>Función</b>                                                                                               |
|---------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>miR156</b> | Squamosa promoter-binding protein   | Desarrollo de la hoja, dominancia apical, transición y desarrollo floral                                     |
| <b>miR159</b> | GAMyb-like1                         | Desarrollo de anteras y tiempo de la floración en <i>Arabidopsis</i>                                         |
| <b>miR160</b> | Auxin response factor 16            | Varios aspectos del desarrollo en <i>Arabidopsis</i>                                                         |
| <b>miR164</b> | NAC domain-containing protein 21/22 | desarrollo floral, embrionario, de órganos vegetativos y raíces laterales                                    |
| <b>miR166</b> | PHAVOLUTA-like HD-ZIPIII protein    | Formación de meristemas, desarrollo vascular, polaridad de órganos laterales, desarrollo de raíces y nódulos |
| <b>miR171</b> | GRAS family transcription factor    | Varios aspectos del crecimiento y desarrollo                                                                 |
| <b>miR172</b> | Apetala 2                           | Tiempo de floración, cambio de fase vegetativa e identidad de órganos florales                               |

Sin embargo, no todos los miARNs están conservados. De hecho, la mayoría de los miARNs presentes en una dada especie parecen ser exclusivos y poseen tanto funciones conservadas como específicas de esa especie (Fahlgren et al. 2010).

### **Modelo de estudio: *Solanum tuberosum***

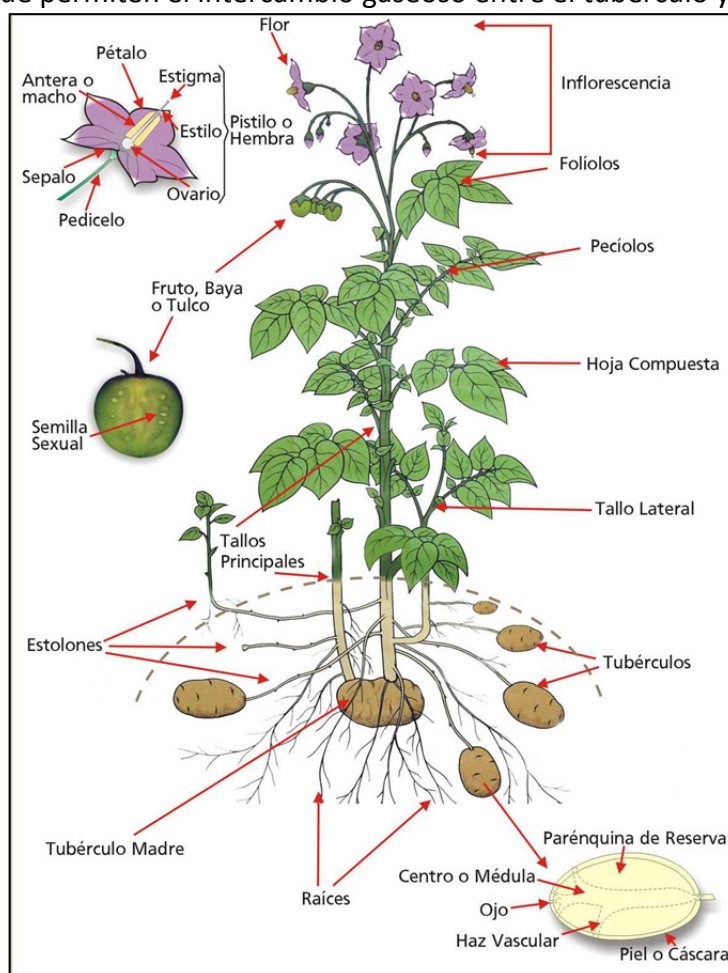
La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una dicotiledónea anual tetraploide ( $2n = 4x = 48$ ), perteneciente a la familia de las Solanáceas. Esta familia agrupa alrededor de 100 géneros y 2500 especies, incluyendo cultivos importantes a nivel mundial como el tomate, el tabaco, la berenjena y el pimiento. De las 2500 especies de solanáceas, aproximadamente 200 (*S. tuberosum* entre ellas) poseen la capacidad de tuberizar. *S. tuberosum* ha sido dividida tradicionalmente en dos subespecies: *S. tuberosum* ssp. andígena, cultivada principalmente en la región andina, y *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, cultivada en el resto del mundo. Los alrededores del lago Titicaca (Perú y Bolivia) concentran la mayor diversidad genética de papas cultivadas, por lo cual se considera a esta región como el centro de origen de esta especie y de su domesticación.

La papa es el tercer cultivo alimenticio luego del arroz y del trigo (FAOSTAT, 2009), es un alimento tradicional de la dieta de los argentinos y se consumen cerca de 60 kg/cápita/año. El tubérculo es una importante fuente de carbohidratos (almidón), proteínas de alta calidad, vitamina C y minerales. Los tubérculos cumplen una doble función para la planta como órgano de reserva y de

propagación vegetativa. Luego del período de dormición, las yemas axilares dormidas se reactivan y generan una planta idéntica a la planta madre, por lo que los tubérculos también sirven como órganos de perennidad para estas especies anuales.

## Descripción morfológica

La planta de papa es de naturaleza herbácea con un sistema aéreo (hojas compuestas, inflorescencia, tallos y frutos) y un sistema subterráneo (raíces, estolones y tubérculos) (Figura XII). Los tubérculos de papa son tallos modificados y tienen todas las características de un tejido caulinar. El extremo basal del tubérculo está unido al estolón que lo conecta con el resto de la planta durante el crecimiento. El extremo opuesto se denomina distal o apical y es el que concentra la mayor cantidad de “ojos”. Estos se distribuyen en forma espiralada en el tubérculo y están ubicados en las axilas de hojas escamosas llamadas “cejas”. Cada “ojo” contiene tres yemas y se corresponde al nudo del tallo. En un corte transversal del tubérculo se observan de afuera hacia adentro: piel o peridermis, corteza (tejido de almacenamiento), haz vascular, parénquima de reserva y médula. En la superficie del tubérculo se encuentran distribuidas pequeñas aberturas llamadas lenticelas que permiten el intercambio gaseoso entre el tubérculo y el ambiente.

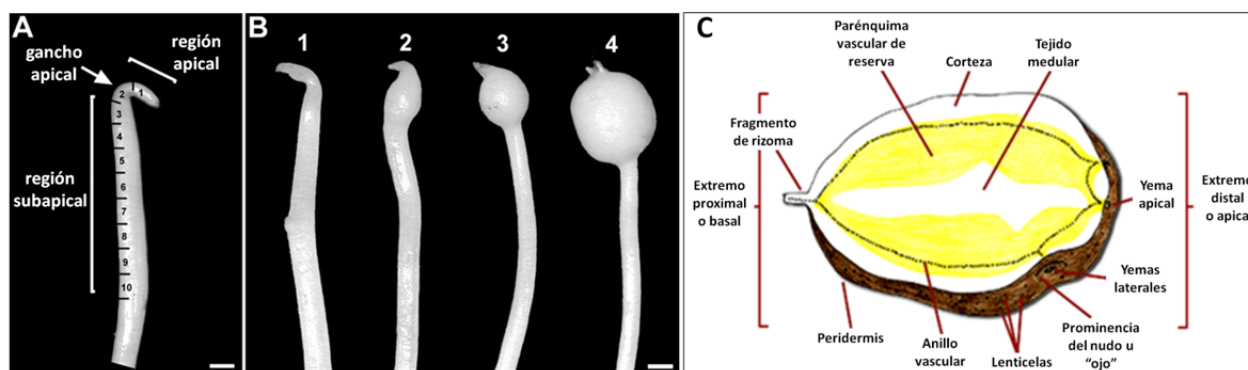


**Figura XII Descripción morfológica de la planta de papa.** Figura obtenida de (Huarte & Capezio 2013)

Cuando las yemas comienzan a crecer se denominan “brotes”, cuyo color, forma y pilosidad permiten diferenciar las variedades. En la oscuridad los brotes crecen ahilados, blancos y débiles; a la luz los brotes son cortos, verdes o coloreados y fuertes. Los brotes dan origen posteriormente a las hojas, raíces y tallos. Las hojas son compuestas con diverso grado de segmentación. El sistema radicular de la papa concentra el grueso de las raíces en los primeros 40 cm de profundidad, por ello el cultivo es sensible a sequía y requiere concentración elevada de nutrientes en la parte superior del suelo. Los tallos sobre el suelo son improductivos, mientras que los tallos bajo el suelo, sean principales o laterales, producen estolones y tubérculos (Huarte & Capezio 2013).

➤ **Estadios de crecimiento de la papa**

- I. **Crecimiento del brote.** Cuando los tubérculos están recién cosechados se dicen que están “dormidos”, es decir que no brotarán si se le dan las condiciones de temperatura adecuadas. Pueden pasar semanas o meses antes que el tubérculo brote, producto del control hormonal. La longitud del período de dormición varía según el cultivar, las condiciones de almacenamiento y las condiciones del cultivo previo. Una vez que los tubérculos rompen la dormición comienza el crecimiento de los brotes y en esta etapa es importante las reservas del tubérculo madre y las condiciones de temperatura del suelo (no menores de 15°C).
- II. **Crecimiento vegetativo.** Esta etapa comprende desde la emergencia de los brotes hasta el inicio de tuberización. Se inicia el crecimiento de los tallos, hojas, raíces y estolones, por lo cual comienza la fotosíntesis y la planta se torna independiente del tubérculo madre. La elongación del tallo es mayor a 20 °C y el crecimiento de las hojas es óptimo a 25°C. La fecha de plantación y la edad de los tubérculos “semilla” tienen gran influencia en esta etapa.
- III. **Inicio de tuberización.** En la región subapical de estolón se comienzan a formar los tubérculos por la acumulación de carbohidratos de reserva, producto de la fotosíntesis (Figura XIII A, B).



**Figura XIII Estadios de la tuberización.** (A) Regiones de un estolón tuberizante. Los números indican los segmentos de 1 mm. (B) Estadios de tuberización. Barra = 1mm. (C) Morfología del tubérculo. Figura adaptada de (Viola et al. 2001).

- IV. **El engrosamiento** está relacionado con la expansión celular y la división radial de las células ubicadas en la médula y en el córtex de la zona subapical del estolón (Figura XIII C). La subsiguiente división celular al azar y expansión de las células en la región perimedular contribuyen al engrosamiento del tubérculo (Xu et al. 1998). Estos cambios en la división celular están acompañados por un cambio en el programa de desarrollo de las células del meristema subapical. El crecimiento del meristema se

vuelve determinado y la división celular se detiene luego de algunas rondas. El mecanismo de descarga de sacarosa cambia de la vía apoplástica a la vía simplástica. Este cambio es acompañado por una disminución de la actividad invertasa en la pared celular y un incremento drástico de la actividad de la Sacarosa Sintetasa y Fructoquinasa (Appeldoorn et al. 2002). Numerosos factores regulan esta etapa, como las hormonas y los reguladores de crecimiento. El balance de éstos está influenciado por varios factores como fertilización nitrogenada, temperatura, agua y longitud del día.

- V. **Llenado de los tubérculos.** Los tubérculos acumulan grandes cantidades de almidón y de proteínas, mayormente patatina e inhibidores de proteinasas (Prat et al. 1990). Es el período crítico para la determinación del rendimiento y la calidad. Los factores que más influyen es esta etapa son: la temperatura, la fertilización, el riego, y el manejo de enfermedades.
- VI. **Maduración** ocurre a partir del comienzo del amarillamiento del follaje. Los tubérculos engrosan el peridermis y así pueden ser cosechados con pocos daños.

## Genoma de papa

La secuenciación del genoma de papa fue un esfuerzo mancomunado de un Consorcio Internacional, el Potato Genome Sequencing Consortium (PGSC), formado por grupos académicos y organizaciones industriales de 16 países. El genoma de papa se publicó en 2011 en la revista Nature (Potato Genome Sequencing et al. 2011) y luego se desarrolló Spud DB (<http://potato.plantbiology.msu.edu/>) que permite a la comunidad el acceso libre a la secuencia del genoma y a las anotaciones y set de datos asociados junto a los datos genotípicos y fenotípicos obtenidos de un panel diverso representado por 250 clones de papa.

El PGSC ensambló el genoma (726 MB) de la especie doble monoploide *S. tuberosum* Group Phureja DM1-3 (DM; AEWC00000000). El 86% del genoma ensamblado está anclado al mapa genético y contiene 39.031 genes anotados. Además se liberaron las secuencias de un segundo clon diploide heterocigota el *S. tuberosum* Group Tuberosum RH89-039-16 (RH; ERP000627). Spud DB contiene exploradores del genoma de papa (potato genome browsers) para las versiones PGSC v4.03 pseudomolecules y PGSC v2.1.11 pseudomolecule. Los exploradores contienen información de loci del PGSC, del International Tomato Annotation Group (ITAG), coincidencias con *Arabidopsis*, uva, álamo y tomate, y transcriptos ensamblados para otras 12 especies de solanáceas (PlantGDB). Además el genoma de papa contiene datos de 56 bibliotecas de RNA-Seq de DM (SRA030516) y RH (ERP000527) e información de SNP de SolCAP (Felcher et al. 2012; Hamilton et al. 2011). Para cada transcripto anotado por los grupos PGSC e ITAG hay disponible un informe sobre el transcripto, la proteína predicha, las coincidencias obtenidas de UniRef, InterPro, *Arabidopsis*, tomate y otras secuencias de papa e información de SSRs, SNPs y valores de expresión (FPKM) en 56 tejidos.

## Tuberización

La tuberización es un proceso de desarrollo exclusivo de la papa. La papa requiere fotoperiodos acortándose más allá de un umbral de horas diarias para tuberizar que depende de la especie y de las variedades. Los días cortos promueven la tuberización mientras que los días largos, altos niveles de nitrógeno y altas temperatura la inhiben o retrasan. Las variedades *tuberosum* pueden tuberizar con fotoperiodos más largos que las variedades andígena, por ello las primeras se cultivan en altas latitudes y las andígenas en los países andinos a menores latitudes. Las variedades andígenas no tuberizan en los veranos de días largos (16 horas de luz, DL) de los países más septentrionales y las variedades *tuberosum* se inducen rápidamente bajos los días cortos (8 horas de luz, DC) de los países tropicales disminuyendo su rendimiento. A bajas temperaturas o en días cortos, sin embargo, la elongación del estolón se detiene y la punta comienza a engrosarse para formar el tubérculo.

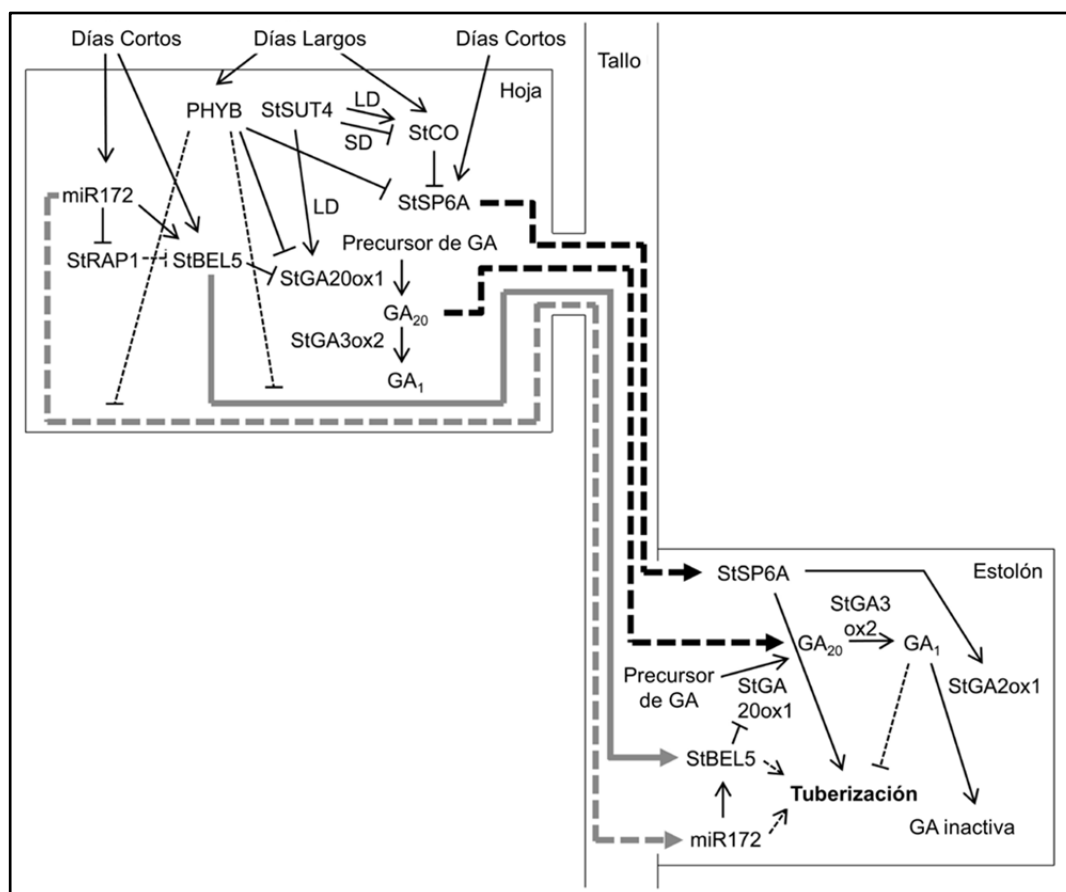
### ➤ *Control de la tuberización por señales móviles*

En el proceso de tuberización es importante distinguir entre la inducción del tubérculo y el crecimiento y desarrollo del mismo. Las especies antiguas de papa como *S. tuberosum* ssp. Andígena o *S. demissum* no producen tubérculos cuando son cultivadas en DL o en DC suplementados con un pulso de luz (15 min) en el período de oscuridad. Este efecto inhibitorio del pulso de luz en el medio de la noche demuestra que es el largo del período nocturno, más que la duración del período de luz, lo que induce la formación de tubérculos en estas plantas (Ewing & Struik 1992; Kumar & Wareing 1974).

Hace varias décadas, experimentos con injertos utilizando plantas andígena inducidas o no a tuberizar demostraron que las condiciones inductoras son sensadas en la hoja y compuestos transmisibles viajan a los estolones donde inducen el proceso (Chapman 1958; Gregory 1956). Luego de numerosas investigaciones son varias las señales móviles propuestas para cumplir esta función (Figura XIV). La intensa búsqueda de una señal móvil de floración a través del floema (florigeno) condujo a la identificación de una familia de genes denominada FLOWERING LOCUS T (FT) que codifican proteínas sintetizadas en las hojas y que viajan hasta el meristema apical caulinar donde inducen la floración (Tsuji et al. 2013; Turck et al. 2008). En *Arabidopsis thaliana*, la expresión de FT es activada en el floema de las hojas en respuesta a fotoperíodos inductores de la floración por CONSTANS (CO), un regulador transcripcional (An et al. 2004; Ayre & Turgeon 2004). Se ha demostrado que tanto la proteína como el ARNm de FT pueden moverse a través del floema para inducir la floración, siendo el segundo menos efectivo que el primero. En papa se identificó StSP6A, un gen FT capaz de inducir la tuberización. El efecto de StSP6A en la tuberización es transmitido a través de injertos (Navarro et al. 2011). Esto sugiere que StSP6A probablemente sea una señal móvil de tuberización. A diferencia de los genes FT de *Arabidopsis*, se encontró que StSP6A es regulado negativamente por StCO, y de este modo reprime la tuberización en días largos (Figura XIII)(Gonzalez-Schain et al. 2012; Navarro et al. 2011).

Al transformar plantas de andígena con una construcción antisentido del gen PHYB se encontró que este fitocromo juega un rol esencial en la percepción de la duración del día y en la regulación

de la vía de señalización para DC en la tuberización. Las plantas con expresión disminuida de PHYB son casi insensibles a la duración del día y tuberizan tempranamente tanto en DC como en DL. 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 (Jackson 1999).



**Figura XIV Esquema de las señales reguladoras de la tuberización.** Adaptado de Suárez-López (2013)

Las GAs regulan el inicio de formación del tubérculo, ya que se retrasa por el agregado de GA3, en cambio, al agregar inhibidores de la biosíntesis de la hormona aumenta la formación de tubérculos en segmentos de entrenudos y en plantas de invernadero. Los últimos pasos en la biosíntesis de las GAs activas son catalizados por la GA 20-oxidasa (GA20oxi1) y la GA 3-oxidasa (GA3ox) y la GA2-oxidasa cataliza la degradación de las formas bioactivas a catabolitos inactivos (Hedden & Thomas 2012). Estas enzimas están sujetas a un control por retroalimentación por el producto final, GA1, y están reguladas en respuesta a fotoperíodo o fitocromos. PHYB afecta la síntesis de GA o su señalización, ya que en las plantas silenciadas en PHYB el ARNm de StGA20ox1 está aumentado. Cambios en los niveles endógenos de GAs por sobreexpresión o inhibición del gen StGA20oxi1 resulta en un retraso o adelanto del inicio de la tuberización en condiciones de DCs, demostrando una correlación entre los niveles de GA endógenos y el inicio de la tuberización (Rodríguez-Falcon et al. 2006). Esta disminución parece necesaria para detener el crecimiento longitudinal del estolón y permitir el engrosamiento (Jackson 1999). StSP6A provocaría la caída de

los niveles de GAs mediante la estimulación la expresión de StGA2ox1 (Navarro et al. 2011). Un mutante enano denominado andígena *ga1* (bloqueado en un paso de la biosíntesis de la hormona), puede formar tubérculos en DL y la transferencia a condiciones de DCs induce la tuberización rápidamente en estas plantas enanas, indicando que aunque el requerimiento de DCs es menos severo que en plantas salvaje, la tuberización en estos mutantes se encuentra regulada por el fotoperiodo. Esto indica dos vías independientes de tuberización: una vía dependiente del fotoperiodo, y una vía dependiente de GAs. El balance entre el efecto inductor e inhibidor de estas vías determinan la formación del tubérculo.

Adicionalmente, se han propuesto dos ARNms como señales que regulan la tuberización a larga distancia. StBEL5 y POTH1 (POTATO HOMEODOMAIN 1) son factores de transcripción que interactúan entre sí y regulan la formación del tubérculo mediando los niveles de hormonas en el extremo del estolón (Chen et al. 2004; Hannapel 2010; Rosin et al. 2003). La sobreexpresión de POTH1 aumenta el número de tubérculos con respecto a plantas salvajes en ensayos *in vitro* (Rosin et al. 2003). Del mismo modo, la sobreexpresión de StBEL5 mejora la tuberización en días cortos y la estimula en días largos. El ARNm de StBEL5 se mueve desde injertos sobreexpresantes a los portainjertos salvajes aumentando la tuberización (Banerjee et al. 2006; Chen et al. 2003). Asimismo, se ha demostrado la transmisión del ARNm de POTH1 por floema (Mahajan et al. 2012).

También se ha reportado que los microARNs desempeñan un papel importante en la tuberización. El miR172, que regula la floración en varias especies también afecta la tuberización en papa (Martin et al. 2009; Zhu & Helliwell 2011). El efecto de miR172 en papa se observó en plantas sobreexpresantes que forman tubérculos en DL, tuberizan antes en DC y presentan niveles aumentados de StBEL5. Esta regulación de StBEL5 probablemente se deba a la inactivación de genes blanco del miR172, tal es el caso de StRAP1, que es un inhibidor de StBEL5. El efecto de la sobreexpresión de miR172 es transmisible a través de injertos, sugiriendo que este miARN regula señales a larga distancia que controlan la tuberización, o alternatively, que el miR172 sea la señal móvil. Más recientemente se reportó que miR156 es otro microARN que regula la tuberización, miR156 es capaz de moverse por floema y regula a miR172 a través de (Bhogale et al. 2014). Las plantas silenciadas en PHYB mostraron niveles aumentados del transcripto de StSP6A y niveles reducidos de StBEL5 y miR172 en hojas, mientras que en estolones los niveles de los tres genes estaban aumentados (Martin et al. 2009; Navarro et al. 2011), indicando que PHYB inhibe la expresión y/o el movimiento de moléculas inductoras. Posiblemente reguladores positivos y negativos de la tuberización respondan a señales de la luz a través de la acción de PHYB.

La sacarosa, además de ser un metabolito y una fuente energética, es una molécula señal que ha sido propuesta como un compuesto transmisible en la tuberización y la floración (Ruan 2012; Sheen et al. 1999; Suarez-Lopez 2005). Los transcriptos de transportadores de sacarosa se mueven a través del floema en varias especies, incluyendo la papa, lo que sugiere que podrían tener un papel en la señalización (Liesche et al. 2011). Un transportador de sacarosa de papa, StSUT4, está involucrado en el control de la floración y en la tuberización. La inhibición de StSUT4 induce la tuberización en días largos. La transmisión de este fenotipo mediante injertos, junto con un aumento en la exportación de sacarosa desde las hojas en plantas silenciadas en StSUT4, sugieren que el transportador estaría participando en la señalización a distancia a través del flujo de

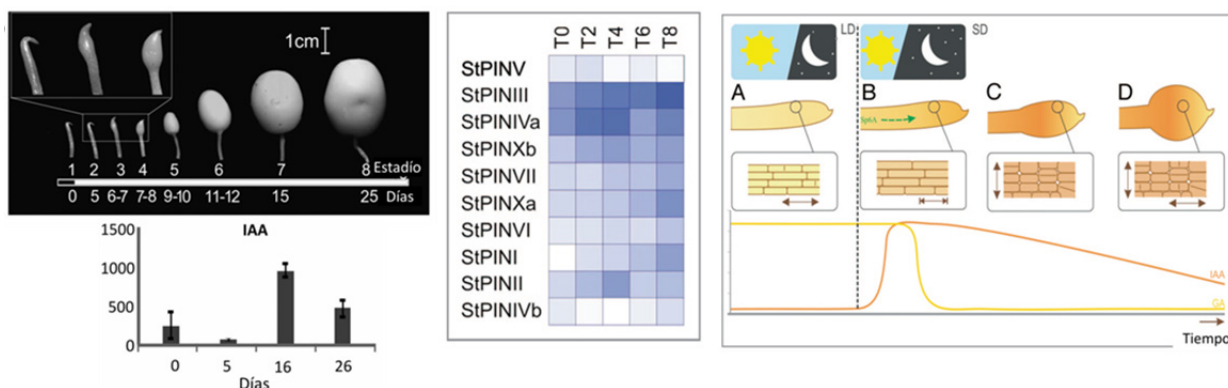
carbono de la fuente a la reserva (source to sink) (Chincinska et al. 2008). A su vez, StSUT4 regula la producción de señales de larga distancia, como StSP6A y probablemente GAs (Chincinska et al. 2013; Chincinska et al. 2008).

El agregado de ABA exógena indujo una mayor y más temprana producción de tubérculos. *In vitro*, la aplicación de alta sacarosa y ABA condujo a una tuberización más temprana. En medios con baja sacarosa o con GA, el ABA también estimula la formación de tubérculos, contrarrestando el efecto inhibitorio de las GAs. Sin embargo la tuberización no se asocia con un aumento de los niveles de ABA, ya que se observó una disminución en esos niveles en estolones inducidos durante el desarrollo. El mutante *droopy* (deficiente en ABA) de *S. phureja* tuberiza normalmente, indicando que no es necesaria la síntesis de ABA para la inducción de la tuberización. Se concluyó entonces que ABA no posee un papel esencial en la formación del tubérculo y que el efecto estimulante de esta hormona es debido al efecto antagónico del ABA y las GAs (Rodríguez-Falcon et al. 2006).

Recientemente se propuso que las auxinas y el patrón de distribución de auxinas desempeñan un papel importante en los eventos que ocurren luego del inicio de la tuberización (Roumeliotis et al. 2012a; Roumeliotis et al. 2012b). Las auxinas juegan un rol esencial en casi todos los procesos que requieren un cambio en la identidad meristemática. Luego de la inducción de la tuberización el meristema apical detiene su división celular y el plano de división en la región medular subapical cambia de transversal a longitudinal. El primer indicio de que las auxinas participarían en la tuberización surgió cuando se determinó que un factor de respuesta a auxinas mostró un pico justo luego del inicio de la tuberización. Experimentos de microarreglos revelaron un gran número de genes asociados a auxinas durante los eventos tempranos del desarrollo del tubérculo. Tal es el caso de dos genes similares a PIN, de *adr11-2* cuya disminución es regulada por auxinas y de *acrA-like*, un gen regulado por auxinas que contiene un sitio de unión a GTP (Kloosterman et al. 2005). Estos perfiles de expresión indican que los niveles de auxinas aumentarían en los estadios iniciales del desarrollo de tubérculo. El contenido de auxinas luego de la inducción de la tuberización aumenta en el ápice del estolón y en la región donde ocurre el engrosamiento. También aumenta la expresión de *StYUC-like1*, un gen de la biosíntesis de auxinas, durante las etapas tempranas de la tuberización y la expresión de genes PIN específicos (Roumeliotis et al. 2012b). A su vez se vio que IAA es transportada desde el meristema apical del estolón hacia la región proximal, reforzando la hipótesis de que el ápice del estolón es el sitio donde ocurre la biosíntesis de auxinas (Roumeliotis et al. 2012a; Roumeliotis et al. 2013). Recientemente se demostró que la localización polar de las proteínas PIN está controlada por la fosforilación del loop hidrofílico de estas proteínas (Huang et al. 2010; Sasayama et al. 2013). En *Arabidopsis* se demostró que la presencia de CRK5, una proteína relacionada a CDPKs, es requerida para la correcta localización de AtPIN2 en la zona de transición de raíces (Rigo et al. 2013).

Roumeliotis y colaboradores (2012b) proponen un modelo en el que GAs y auxinas regulan consecutivamente el inicio de la tuberización (Figura XIII). En condiciones no inductoras (DL) en estolones elongantes el contenido de GAs es elevado y el contenido de auxinas es bajo; cuando las condiciones cambian (DC) el contenido de GAs cae y el estolón deja de elongarse y las auxinas aumentan significativamente. El cambio en el plano de división que permite el engrosamiento del tubérculo se produce concomitantemente con el aumento de auxinas. El contenido de auxinas disminuye en estadios más avanzados y esto es importante ya que la aplicación continua de IAA en

estolones resulta inhibitoria mientras que un pulso de IAA estimula la tuberización. Las auxinas regularían el crecimiento del tubérculo al regular la identidad del meristema, la división celular y el plano de la división celular.



**Figura XV Papel de las auxinas en el desarrollo del tubérculo.** El contenido de auxinas aumenta cuando el tubérculo comienza a engrosarse. Varios genes StPIN aumentan su expresión durante el desarrollo del tubérculo. Modelo propuesto por (Roumeliotis et al. 2012b).

## Antecedentes de CDPKs en papa

Brevemente se comentan los resultados sobre CDPKs obtenidos en el sistema de estudio por nuestro grupo de trabajo. Ensayos con quelantes de calcio, antagonistas de calmodulina e inhibidores de quinasas de proteínas sugerían que el calcio y proteínas sensoras de calcio participan en el proceso de tuberización de la planta de papa (Balamani et al. 1986; Raices et al. 2003b). Se determinó una actividad de quinasa dependiente de calcio que aumenta al inicio del proceso de tuberización (MacIntosh et al. 1996; Ulloa et al. 1997) y se identificaron tres isoformas de CDPKs, StCDPK1, StCDPK2 y StCDPK3, que presentan una expresión espacio-temporal específica durante la transición estolón-tubérculo (Gargantini et al. 2009; Giammaria et al. 2011; Grandellis et al. 2012; Raices et al. 2003a; Raices et al. 2003b; Raices et al. 2003c).

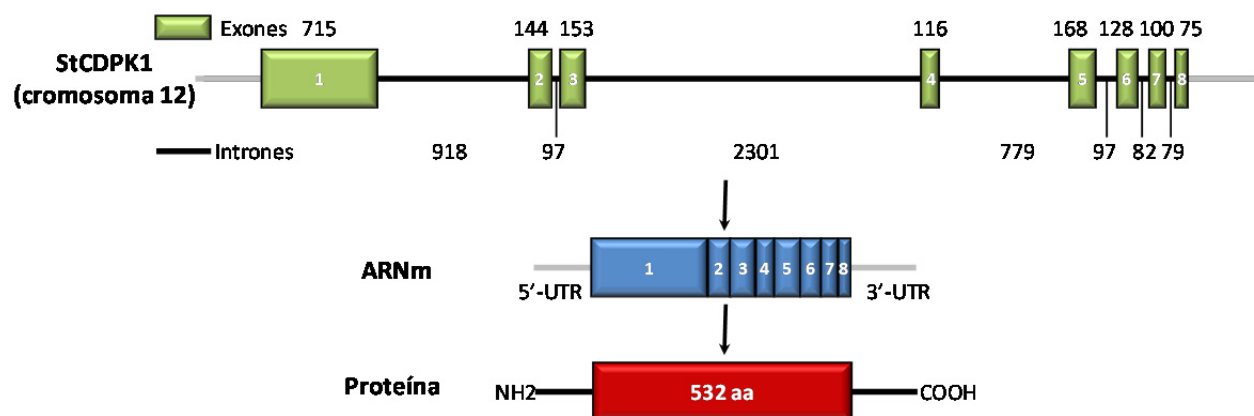
StCDPK3 se expresa en estolones tempranos y StCDPK1 en estolones engrosados (Raices et al. 2001; Raices et al. 2003a). Por hibridación *in situ* se observó que StCDPK1 se expresa en el ápice del estolón tuberizante y tanto la sacarosa como el manitol indujeron su expresión mientras que plantas tratadas con GA3, ABA o CK indicaron que StCDPK1 se induce en presencia de estas hormonas (Raices et al. 2003c). Plantas transgénicas con expresión disminuida de StCDPK1 en estolones tuberizaron más rápidamente, y en respuesta a la adición de GA3 la elongación de los estolones fue menor sugiriendo que la quinasa participa en múltiples cascadas de transducción y que podría mediar estímulos inhibidores y promotores de la tuberización (Gargantini et al. 2009). Ensayos de expresión transitoria en células de cebolla demostraron que fusiones StCDPK1::GFP se localizan en membrana plasmática mientras que versiones mutadas de la enzima en sus consensos de miristoilación y palmitoilación se dirigen al citoplasma (Raices et al., 2003a). Asimismo ensayos de inmunohistoquímica con anti-StCDPK1 revelaron la presencia de StCDPK1 en la membrana plasmática de estolones engrosados (Gargantini *et al.*, 2009).

La isoforma StCDPK2 es ubicua pero se expresa mayormente en hojas (Ulloa et al. 2002) y en brotes emergentes. Presenta alta identidad de secuencia (98%) con la isoforma LeCDPK1 de tomate inducida por daño mecánico e infección por hongos (Chico et al. 2002). Su expresión aumenta en respuesta a la luz (Giammaria et al. 2011). Por inmunohistoquímica y Western blot con anti-StCDPK2 se detectó la quinasa en el citoplasma de células del mesófilo de la hoja, y en extractos de hojas, tanto solubles como enriquecidos en membrana plasmática, demostrando la localización dual de la misma (Giammaria et al. 2011). La adición de JA (10-50 mM) al medio de plantas *in vitro* inhibió la actividad de CDPK en extractos solubles y se observó disminución del ARNm de StCDPK2 (Ulloa et al. 2002). La proteína recombinante StCDPK2-6xHis es una CDPK funcional que alcanza su máxima activación a 2μM calcio y que se autofosforila en presencia de calcio (Giammaria et al. 2011). En ensayos *in vitro* se demostró que fosforila un factor de transcripción tipo ABF de papa, capaz de unir elementos de respuesta a ABA en el ADN (Muniz Garcia et al. 2012).

No se detectaron transcritos de StCDPK1 y 2 en ARN obtenido de tubérculos en dormición sin embargo, cuando comienza la actividad celular asociada al proceso de brotación se observó que StCDPK1 se expresa en el brote incipiente no fotosintético y luego desaparece y cuando el brote emerge a la luz se induce StCDPK2 que continúa expresándose en las hojas de la planta (Giammaria et al. 2011). Se analizó el transcriptoma de brotes de papa crecidos en condiciones de luz u oscuridad continua usando los *microarrays* 10 K del Instituto de Genómica TIGR. Se observó que numerosas CDPKs se expresan en brotes siendo StCDPK2 la más abundante y su expresión ligeramente mayor (30%) en condiciones de luz, mientras que la expresión de StCDPK1 fue mayor en oscuridad.

Las secuencias genómicas de las isoformas StCDPK1, 2 y 3 comparten la estructura de 8 exones y 7 intrones (

Figura II) y están localizadas en los cromosomas 12, 7 y 3, respectivamente (Gargantini et al. 2009; Giammaria et al. 2011; Grandellis et al. 2012).



**Figura II Estructura genómica de StCDPK1.** Los números por encima y debajo de la estructura indican la longitud en pares de bases del exón e intrón respectivamente. Tras el corte y empalme, el ARNm maduro es traducido en una proteína de 532 aminoácidos.

Por *Genome Walker Universal Kit*, (Clontech) se obtuvieron las secuencias promotoras de las isoformas StCDPK1 y StCDPK3. StCDPK3 se induce en respuesta a ABA y su expresión aumenta en plantas tratadas con alta sal o frío. Se estudió su regulación transcripcional a través de plantas transgénicas portadoras del gen reportero GUS bajo el promotor de StCDPK3. Se demostró que StCDPK3 se expresa en ápices y puntos de ramificación de raíces, en el ápice de estolones tempranos y en ojos y brotes de tubérculos indicando que se expresa en los sitios de alta proliferación celular. Esta isoforma se activa a 20  $\mu$ M calcio pero se autofosforila aún en ausencia de calcio (Grandellis et al. 2012).

# HIPÓTESIS

---

Las evidencias aportadas por numerosos grupos de investigación son concluyentes y permiten proponer que las CDPKs son reguladores centrales en los procesos mediados por calcio que se desencadenan en respuesta a los desafíos ambientales y a los cambios internos. Diferentes isoformas de CDPK pueden desempeñar funciones específicas o compartir una misma vía de señalización. Un desafío actual es estudiar la función de cada isoforma ya que sólo unos pocos miembros se caracterizaron en profundidad. Una de las áreas más importantes en el estudio de los sensores de calcio es la identificación de las proteínas blanco/sustrato de fosforilación que tengan relevancia fisiológica. Nuestros resultados previos sugieren que StCDPK1 está involucrada en vías de transducción de señales que regulan la tuberización. Con el fin de estudiar su papel como sensor/transductor se proponen los siguientes objetivos.

## OBJETIVO GENERAL

---

Estudiar la regulación transcripcional y post-transcripcional de la quinasa de proteínas dependiente de calcio, StCDPK1 en *Solanum tuberosum* y analizar de sus potenciales blancos de acción. El objetivo final sería integrar los resultados bioquímicos y de expresión para comprender su función en la planta de papa.

## OBJETIVOS PARTICULARES

---

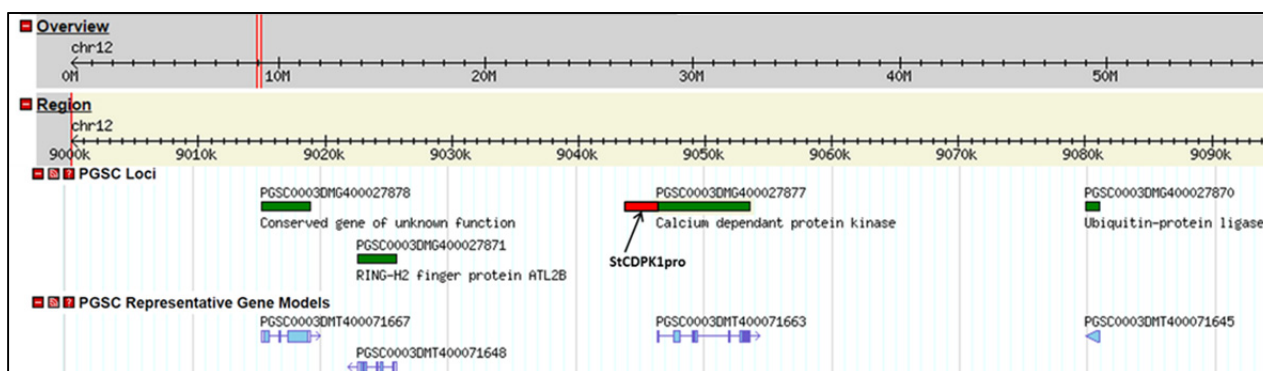
- Identificar elementos regulatorios presentes en la secuencia promotora de StCDPK1.
- Determinar el perfil de expresión de StCDPK1 mediante qRT-PCR en los distintos órganos y en los estadios de la tuberización.
- Examinar el patrón de expresión de StCDPK1 mediante el análisis histoquímico de líneas de papa transgénicas portadoras del gen reportero GUS fusionado al promotor de StCDPK1.
- Comparar el patrón de expresión observado mediante el análisis histoquímico con el de las isoformas StCDPK2 y 3.
- Estudiar la regulación post-transcripcional de StCDPK1 a través de miARNs.
- Caracterizar bioquímicamente a StCDPK1 a fin de compararla con otras isoformas vinculadas al desarrollo.
- Buscar posibles proteínas blanco de fosforilación de StCDPK1.
- Generar líneas sobreexpresantes de StCDPK1 y evaluar sus características fenotípicas.

# RESULTADOS

## CAPÍTULO 1: Caracterización transcripcional de StCDPK1

### Análisis *in silico* de la secuencia promotora de StCDPK1

Cuando aún no estaba disponible el genoma de papa se utilizó la estrategia de caminado cromosómico para amplificar la secuencia promotora de StCDPK1. Se obtuvo una secuencia de 2273 bp río arriba del ATG de inicio (tesis doctoral Carolina Grandellis) que contendría los elementos regulatorios basales y proximales del gen. Al publicarse el genoma de *S. tuberosum* grupo Phureja DM1-3 (<http://potato.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/gbrowse/potato/>) (Potato Genome Sequencing et al. 2011) (Potato Genome Sequencing et al. 2011), la secuencia promotora junto con la secuencia genómica completa de StCDPK1 (Número de acceso DQ507862.1) se alineó por BLAST contra la base de datos de superscaffolds de *S. phureja* DM1-3. El mejor alineamiento se obtuvo con el scaffold PGSC0003DMB000000589 (con una identidad del 98.05%), localizado de acuerdo al Spud DB Genome Browser en el cromosoma 12, posición 9046 kbp. Esto permitió confirmar la localización cromosómica del gen en el brazo distal del cromosoma 12 que se había obtenido por mapeo génico (Gargantini et al. 2009)



**Figura 1.1. Localización cromosómica del gen StCDPK1 en el cromosoma 12 de acuerdo al Spud DB Genome Browser.** Se muestran las 100kbp que rodean al gen. La imagen es una adaptación de la captura de pantalla. En rojo se indica la secuencia promotora.

Los promotores contienen dos regiones arbitrariamente definidas como proximales (aquellas localizadas dentro de las 100 pb río arriba de la TATA box) y distales (que abarcan desde -100 pb a -2kb). Se considera que estas regiones comprenden los elementos regulatorios de la transcripción más importantes (Ibraheem et al. 2010). Para verificar que la secuencia promotora no se solapase con las regiones regulatorias de otros genes vecinos se analizó el entorno genómico (100 kb) de StCDPK1 (Figura 1.1). Además del gen *StCDPK1* (PGSC0003DMG400027877) esta región contiene otros tres genes (Tabla 1.1, Figura 1.1). El gen más cercano río arriba codifica una proteína RING-H2 finger y se ubica a 20,4 kilobases, mientras que el más cercano río abajo codifica una

ubiquitina-proteína ligasa se encuentra a 26,2 kilobases. Esto indica que la secuencia promotora a analizar sólo regularía la expresión de StCDPK1.

**Tabla 1.1** Entorno genómico de StCDPK1 en el cromosoma 12, mostrando las posiciones de los genes y la orientación de la transcripción.

| Número de acceso<br>PGSC0003DMG | Nombre del gen                          | Orientación | Posición (bp) en el<br>cromosoma 12 |
|---------------------------------|-----------------------------------------|-------------|-------------------------------------|
| 400027878                       | Conserved gene of unknown function      | ⇒           | 9015432-9019255                     |
| 400027871                       | RING-H2 finger protein ATL4M            | ⇐           | 9022905-9025951                     |
| 400027877                       | <b>Calcium dependent protein kinase</b> | ⇒           | 9046407- 9053551                    |
| 400027870                       | Ubiquitin-protein ligase                | ⇐           | 9079836-9080918                     |

Se realizó el análisis *in silico* de los elementos *cis*-regulatorios presentes en la secuencia promotora de StCDPK1 usando las bases de datos PLACE (Higo et al. 1999) y PlantCare (Lescot et al. 2002). Los elementos encontrados se agruparon de acuerdo a su función (Figura 1.2, Tabla 1.2)

. Llamativamente, el promotor de StCDPK1 presenta un gran número de elementos relacionados con la expresión en raíces, elementos presentes en los promotores de proteínas de reserva y elementos de respuesta a citoquininas. Asimismo, se encontraron los elementos AC-I y AC-II que potencian la expresión de genes en el xilema (Hatton et al. 1995; Hauffe et al. 1993), el elemento as-2-box que participa en la expresión de genes específicos de brotes y elementos de respuesta a giberelinas. Los elementos AC-I y AC-II identificados por la base de datos PlantCare (con un score de 9 y 8.5 respectivamente) se encuentran en la misma posición (990 bp río arriba del codón de inicio ATG en la hebra codificante). Al usar la matriz unificadora para la identificación de elementos AC [C(C/T)CACC(T/A)ACC] del mismo modo que Raes et al (2003), se identificó un único elemento con dos bases desapareadas respecto de la secuencia consenso (CATACCTACC). Se encontraron además numerosos elementos de respuesta a luz (LREs), a estreses bióticos (elicitors fúngicos, metil-jasmonato y ácido salicílico) y abióticos (estrés osmótico, salino, por sequía y térmico).

**Tabla 1.2** Elementos *cis*-regulatorios encontrados en el promotor de StCDPK1 agrupados según su función o proceso en el que están involucrados.

| Asociado a              | Elemento                     | Secuencia                   | Número de<br>sitios | Base de datos |
|-------------------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------|---------------|
| Expresión en<br>raíces  | ROOTMOTIFTAPOX1              | ATATT                       | 31                  | PLACE         |
|                         | NODCON2GM/OSE2ROO<br>TNODULE | CTCTT                       | 14                  | PLACE         |
|                         | NODCON1GM/OSE1ROO<br>TNODULE | AAAGAT                      | 6                   | PLACE         |
|                         | RHERPATEXPA7                 | KCACGW                      | 1                   | PLACE         |
|                         | SP8BFIBSP8AIB                | ACTGTGTA                    | 1                   | PLACE         |
|                         | SP8BFIBSP8BIB                | TACTATT                     | 1                   | PLACE         |
| Proteínas de<br>Reserva | EBOXBNNAPA                   | CANNTG                      | 8                   | PLACE         |
|                         | SEF4MOTIFGM7S                | RTTTTTTR                    | 4                   | PLACE         |
|                         | SEF1MOTIF                    | ATATTTAAWW                  | 3                   | PLACE         |
|                         | 2SSEEDPROTBANAPA             | CAAACAC                     | 1                   | PLACE         |
|                         | Skn-1_motif                  | GTCAT                       | 3                   | PlantCare     |
| Expresión en            | AC-I                         | (T/C)C(T/C)(C/T)ACC(T/C)ACC | 1                   | PlantCare     |

|                                             |                    |                                                        |    |           |
|---------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------|----|-----------|
| xilema                                      | AC-II              | (C/T)T(T/C)(C/T)(A/C)(A/C)C(A/C)<br>A(A/C)C(C/A)(C/A)C | 1  | PlantCare |
| Expresión en brotes                         | as-2-box           | GATAatGATG                                             | 1  | PlantCare |
| Giberelinas                                 | GARE-motif         | TCTGTTG                                                | 1  | PlantCare |
|                                             | P-box              | CCTTTTG                                                | 1  | PlantCare |
| Citoquininas                                | ARR1AT             | NGATT                                                  | 41 | PLACE     |
|                                             | CPBCSPOR           | TATTAG                                                 | 4  | PLACE     |
| Estrés abiótico (osmótico, salino y sequía) | GT1GMSAM4          | GAAAAA                                                 | 8  | PLACE     |
|                                             | MYB1AT             | WAACCA                                                 | 8  | PLACE     |
|                                             | MYCCONSUSAT        | CANNTG                                                 | 8  | PLACE     |
|                                             | MYBCORE            | CNGTTR                                                 | 2  | PLACE     |
|                                             | ATHB6COREAT        | CAATTATTA                                              | 1  | PLACE     |
|                                             | CBFHV              | RYCGAC                                                 | 1  | PLACE     |
|                                             | DRE2COREZMRAB17    | ACCGAC                                                 | 1  | PLACE     |
|                                             | DRECRTCOREAT       | RCCGAC                                                 | 1  | PLACE     |
|                                             | MYB2CONSUSAT       | YAACKG                                                 | 1  | PLACE     |
|                                             | PROXBBNNAPA        | CAACACC                                                | 1  | PLACE     |
| Unión a MYBHv1                              | CCAAT-box          | CAACGG                                                 | 1  | PlantCare |
| Estrés térmico                              | HSE                | AGAAAATTCG                                             | 1  | PlantCare |
|                                             | LTR                | CCGAAA                                                 | 1  | PlantCare |
|                                             | LTRE1HVBLT49       | CCGAAA                                                 | 1  | PLACE     |
|                                             | LTRECOREATCOR15    | CCGAC                                                  | 1  | PLACE     |
| Luz                                         | 3-AF1 binding site | AAGAGATATTT                                            | 1  | PlantCare |
|                                             | ACE                | AAAACGTTTA                                             | 2  | PlantCare |
|                                             | ATC-motif          | AGTAATCT                                               | 1  | PlantCare |
|                                             | ATCT-motif         | AATCTAATCT                                             | 4  | PlantCare |
|                                             | Box 4              | ATTAAT                                                 | 4  | PlantCare |
|                                             | chs-Unit 1 m1      | ACCTACCACAC                                            | 1  | PlantCare |
|                                             | GAG-motif          | AGAGAGT                                                | 1  | PlantCare |
|                                             | GATA-motif         | AAGATAAGATT                                            | 2  | PlantCare |
|                                             | GT1-motif          | GGTTAA                                                 | 2  | PlantCare |
|                                             | I-box              | CTCTTATGCT                                             | 1  | PlantCare |
|                                             | MRE                | AACCTAA                                                | 1  | PlantCare |
|                                             | Sp1                | GGGCGG                                                 | 1  | PlantCare |
|                                             | circadian          | CAANNNNATC                                             | 4  | PlantCare |
| Defensa                                     | Box-W1             | TTGACC                                                 | 1  | PlantCare |
|                                             | TCA-element        | CCATCTTTTT                                             | 2  | PlantCare |
|                                             | TC-rich repeats    | ATTTTCTCCA                                             | 2  | PlantCare |
|                                             | CGTCA-motif        | CGTCA                                                  | 1  | PlantCare |
|                                             | TGACG-motif        | TGACG                                                  | 1  | PlantCare |

Para contrastar los resultados del análisis *in silico* con la actividad del promotor *in planta* se realizó un análisis transcripcional de StCDPK1.

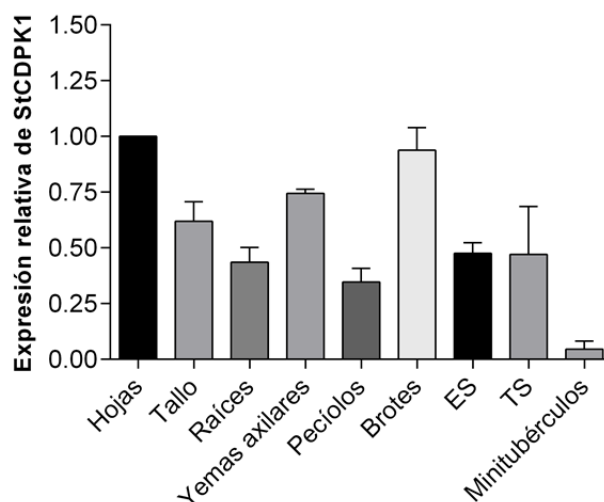
### Análisis de expresión de StCDPK1

Según los datos de RNA-Seq disponibles en el explorador del genoma de papa ([potato.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/gbrowse/potato#search](http://potato.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/gbrowse/potato#search)) el gen *StCDPK1*

(PGSC0003DMG400027877) se expresa fuertemente en callos, estolones, pecíolos y raíces, en menor medida en tallo y hojas, y en muy bajos niveles en sépalos y estambres sugiriendo que esta quinasa es bastante ubícu. Por otro lado, ensayos de Northern blot y de RT-PCR semicuantitativa mostraron que se expresaba fuertemente en estolones tuberizantes (Gargantini et al. 2009; Raices et al. 2001; Raices et al. 2003c) y el análisis por Western blot con un antisuero anti-CDPK1 confirmó la presencia de la proteína en estolones tuberizantes (Gargantini et al. 2009).

Primeramente se evaluó la expresión de StCDPK1 en distintos órganos obtenidos de plantas de invernadero. Se cosecharon hojas, tallos, raíces, yemas axilares, pecíolos, brotes, estolones tempranos sin signos de engrosamiento, con o sin gancho apical (ES), estolones tuberizantes en los que se evidenciaba engrosamiento subapical (TS) y minitubérculos. Se obtuvo el ARN correspondiente a cada tejido y luego del tratamiento con ADNasa se sintetizaron los ADNc por transcripción reversa con oligo-dT. En cada ADNc se evaluaron los niveles de transcritos de StCDPK1 y de Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) por qPCR usando oligonucleótidos específicos (ver Tabla 1 de M&M). Los valores obtenidos para cada órgano fueron normalizados con respecto a los niveles de GAPDH y los niveles del transcripto en todos los órganos se relativizaron a los valores de hojas. Aunque la mayor expresión se detectó en hojas y brotes, se detectó el transcripto en todos los órganos de la planta indicando una expresión ubícu. Asimismo se confirmó la expresión de esta isoforma en estolones tempranos y en estolones tuberizantes mientras que en tubérculos su expresión fue casi nula (Figura 1.2).

**Figura 1.2 Análisis de expresión de StCDPK1 por qRT-PCR en diferentes órganos.** Los valores obtenidos para cada órgano fueron normalizados con respecto a los niveles de GAPDH. Las barras de error indican ( $\pm$ ) SD de tres réplicas biológicas con dos réplicas técnicas cada una. ES, estolones tempranos; TS son estolones tuberizantes con diferente grado de engrosamiento.



A fin de llevar a cabo un análisis más detallado de la expresión de StCDPK1 durante el ciclo de vida de la papa, se generaron líneas portadoras del promotor de StCDPK1 fusionado al gen reportero  $\beta$ -glucuronidasa (GUS). Para ello, se clonaron las 2273 bases río arriba del codón de inicio en el vector pBI101 (Figura 1.3 a). El constructo se confirmó por secuenciación y posteriormente se introdujo en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404. A continuación, se transformaron entrenudos del cultivar Desirée y los eventos de transformación fueron seleccionados con kanamicina. Se obtuvieron 14 líneas independientes, designadas alfabéticamente de la A a la O, que fueron confirmadas por PCR (Figura 1.3 b) y se les determinó la actividad GUS mediante

fluorimetría (Figura 1.3 c). Se utilizaron como control negativo las plantas transformadas con el vector vacío) y plantas sin transformar.

Se seleccionaron las dos líneas que presentaron la mayor actividad GUS para el análisis histoquímico (líneas K y N). De aquí en más, nos referiremos a ellas como plantas StCDPK1pro::GUS. Tras la tinción histoquímica con X-Glu, las líneas StCDPK1pro::GUS mostraron actividad GUS mientras que plantas transformadas con el pBI101 sin promotor no presentaron coloración (Figura 1.3 d). Con distinta intensidad, las líneas K y N presentaron el mismo patrón de expresión, mostrando mayor actividad GUS en las raíces y en la porción superior del tallo donde ocurre la elongación (Figura 1.3 e).

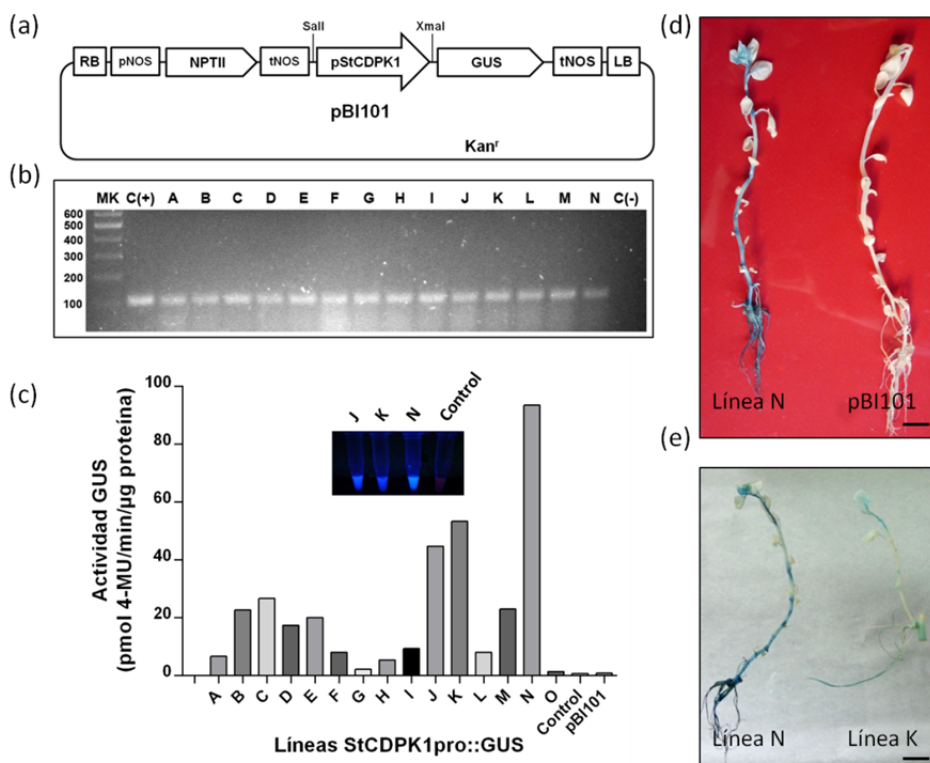
**Figura 1.3 Generación de líneas transgénicas StCDPK1pro::GUS.** (a)

Construito StCDPK1pro::GUS

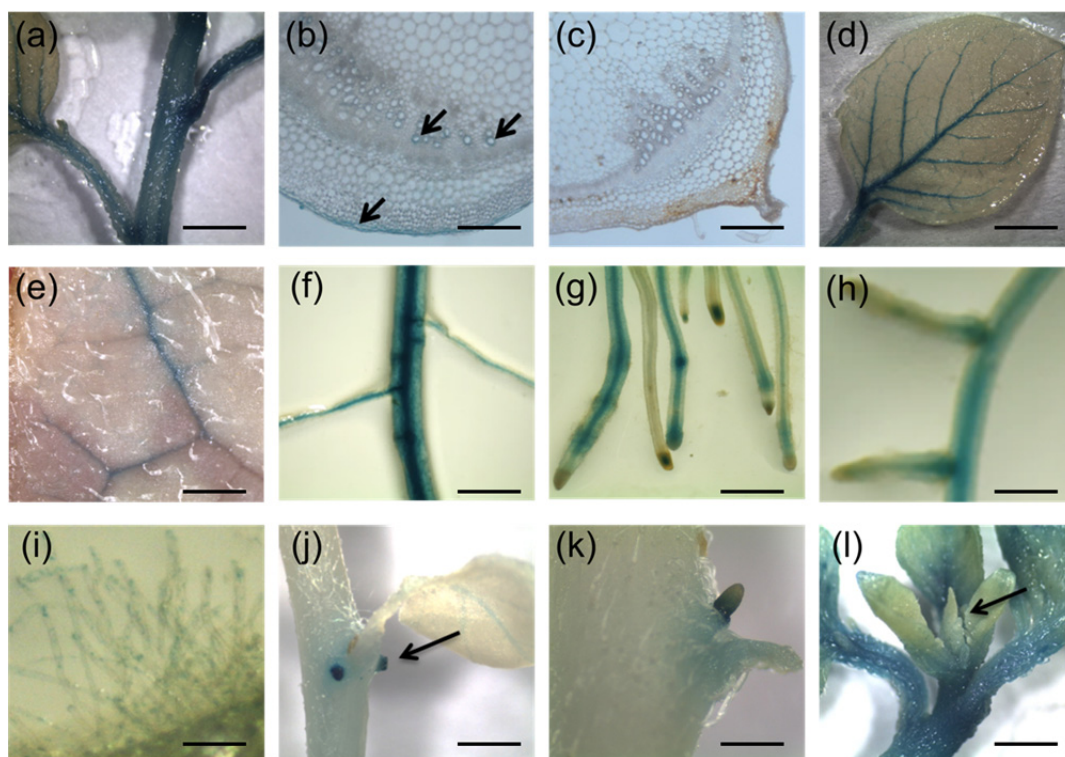
en el plásmido binario pBI101. (b) Confirmación de las líneas transgénicas mediante PCR. (c) Actividad

fluorométrica de GUS en extractos de proteínas las líneas transgénicas. (d) Tinción histoquímica de la línea N y de una línea control transformada con un

constructo sin promotor. Barra = 1 cm. (e) Tinción histoquímica de dos líneas transgénicas independientes (líneas K y N). Barra = 1,5 cm.



Las plantas StCDPK1pro::GUS se crecieron *in vitro* en condiciones de multiplicación y en tierra y se procedió a analizar en detalle el patrón de expresión en los diferentes órganos (Figura 1.4). Se observó actividad GUS en el tallo y los pecíolos (Figura 1.4 a). Secciones transversales del tallo mostraron que la actividad GUS se restringe a la epidermis y los haces vasculares (Figura 1.4 b), mientras que no se observó tinción en el tallo de plantas control (Figura 1.4 c). Las nervaduras principales y secundarias también exhibieron actividad GUS pero no se detectó coloración en la lámina foliar (Figura 1.4 e). En concordancia con los numerosos elementos de expresión en raíces encontrados en el promotor de StCDPK1 (Tabla 1.2), la actividad del promotor en el tejido vascular de las raíces primarias y secundarias fue muy intensa (Figura 1.4 f, g, h). Inclusive se detectó actividad GUS en pelos radiculares (Figura 1.4 i) al igual que en las raíces adventicias (Figura 1.4 j), no obstante, no se observó tinción en la caliptra. Se observó actividad GUS en las yemas axilares de tallos (Figura 1.4 k) pero no se observó actividad en el ápice caulinar (Figura 1.4 l).

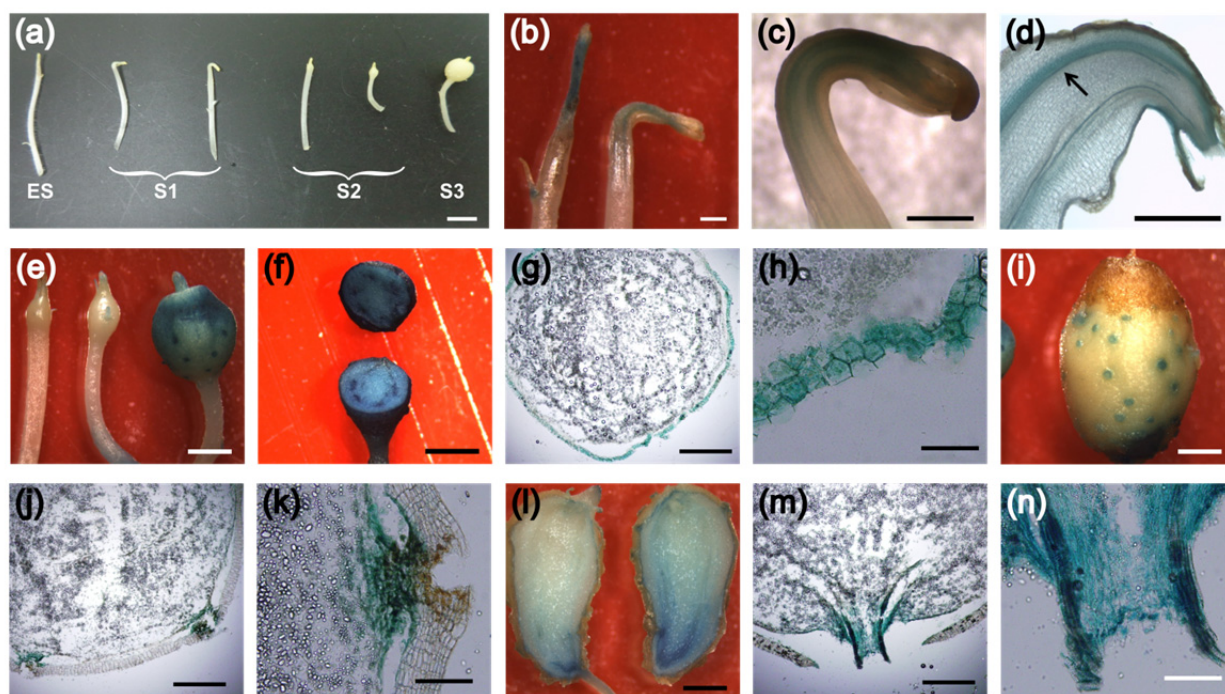


**Figura 1.4 Actividad GUS en diferentes órganos de las plantas CDPK1pro::GUS** (a) Tallo y pecíolos de plantas cultivadas *in vitro*. (b) Sección transversal del tallo de una planta de invernadero. Las flechas señalan la coloración en la epidermis y el tejido vascular. (c) Sección transversal del tallo de una planta control. (d) Hoja de una planta cultivada *in vitro*. (e) Detalle de hoja de una planta cultivada en tierra. (f) Raíz de una planta cultivada en tierra. (g) Raíces de una planta cultivada *in vitro*. (h) raíces secundarias (i) Pelos radiculares. (j) Raíces adventicias de una planta cultivada *in vitro*. (k) Yema axilar (l) Ápice caulinar. Barra = 2 mm en figuras a, d, g, h, j, l; 1 mm en figuras e, f; 500µm en figuras b, c; 100µm en figura i.

Con el fin de obtener los diferentes estadios de tuberización y analizar la expresión de StCDPK1 durante este proceso de desarrollo, se crecieron las plantas StCDPK1pro::GUS *in vitro* bajo condiciones inductoras (oscuridad continua y sacarosa 8%). Se definieron tres estadios según sus características morfológicas. Al tallo subterráneo sin signos aparentes de tuberización se llamó estolón temprano (ES). Se definió como estadio S1 al estolón con una marcada curvatura en el ápice en forma de gancho. El estadio S2 se caracteriza por un engrosamiento de la zona subapical debido a una intensa división y crecimiento celular. En el estadio S3 se acentúa el engrosamiento debido al crecimiento celular por llenado de almidón (Figura 1.5 a).

En ES y S1, la actividad GUS se localizó en la zona subapical (Figura 1.5 b, c). Secciones longitudinales de estolones S1 mostraron actividad en el tejido vascular que divide el parénquima cortical del medular (Figura 1.5 d). La actividad GUS disminuyó en los estolones S2 y volvió a aumentar en el estadio S3 (Figura 1.5 e). En los estolones S3, el anillo vascular (Figura 1.5 f) y la epidermis monoestratificada de células isodiamétricas (Figura 1.5 g, h) exhibieron tinción intensa. Sin embargo, en tubérculos maduros, en los cuales la epidermis es pluriestratificada, la actividad GUS quedó restringida a los ojos (Figura 1.5 i, j, k) y al sistema vascular (Figura 1.5 l). Asimismo se

observó una fuerte tinción en el extremo proximal del tubérculo maduro mientras que las células parenquimáticas que acumulan almidón no mostraron coloración.



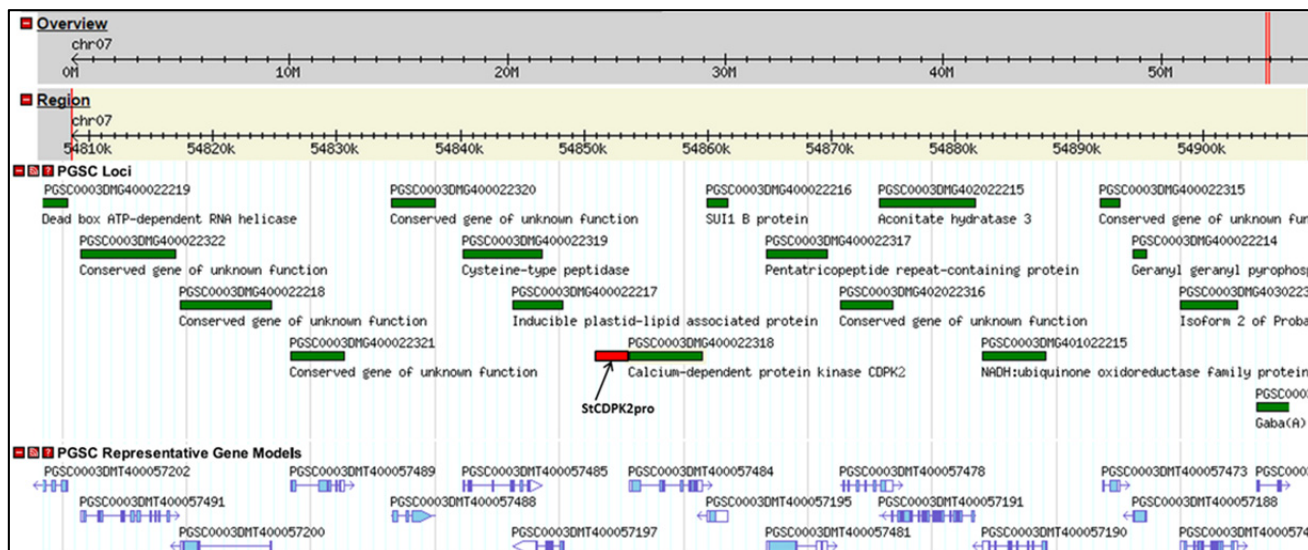
**Figura 1.5 Actividad GUS en las plantas CDPK1pro::GUS durante la tuberización** (a) Estadíos de la tuberización. (b) Estolón temprano (ES) (izquierda) y estolón S1 (derecha). (c) Punta de un estolón S1. (d) Sección longitudinal de la punta de un estolón S1. (e) Estolones S2 (izquierda) y S3 (derecha). (f) Corte transversal de un estolón S3. (g) Sección transversal de un estolón of S3. (h) Células epidérmicas de un estolón S3. (i) Tubérculo maduro. (j) Sección transversal de un tubérculo maduro. (k) Sección de un ojo de un tubérculo maduro. (l) Corte longitudinal de un tubérculo maduro. (m) Sección longitudinal de un tubérculo maduro. (n) Tejido vascular en el extremo proximal de un tubérculo maduro. Barra = 5 mm en figuras a, f, i y l; 2.5 mm en figura e; 1 mm en figuras b, c, g, j y m; 500  $\mu$ m en figuras d y k; 200  $\mu$ m en figura h.

### Análisis comparativo de StCDPK1, 2 y 3

Como fuera mencionado en los antecedentes de esta tesis, las isoformas StCDPK1, StCDPK2 y StCDPK3 pertenecen al subgrupo IIa de la familia CDPK e inicialmente fueron clonadas a partir de una biblioteca de expresión de estolones tuberizantes. Se decidió comparar la secuencia promotora de StCDPK1 con la de las otras isoformas para determinar si comparten elementos reguladores de la transcripción.

Anteriormente se había obtenido y caracterizado el promotor de StCDPK3 (Grandellis et al. 2012) sin embargo en ese momento no se logró amplificar el promotor de StCDPK2 usando la técnica de caminata cromosómica. Datos previos indicaban que el gen StCDPK2 se localizaba en el cromosoma 7 a 8 cM del RFLP TG499 (LOD score: 6,9) en el mapa BCT\_M y a 13.5 cM de RFLP TG20B en el mapa BCT\_H (Giammaria et al. 2011). El alineamiento de la secuencia genómica completa de StCDPK2 (Número de acceso GU182404) contra la base de datos de superscaffolds de

S. phureja DM1-3 confirmó que StCDPK2 (PGSC0003DMG400022318) está localizado en el cromosoma 7, entre las posiciones 54.855.670 y 54.861.491 pb.



**Figura 1.6 Localización cromosómica del gen StCDPK2 en el cromosoma 7 de acuerdo al Spud DB Genome Browser.** Se muestran las 100kpb que rodean al gen. La imagen es una adaptación de la captura de pantalla. En rojo se indica la secuencia promotora.

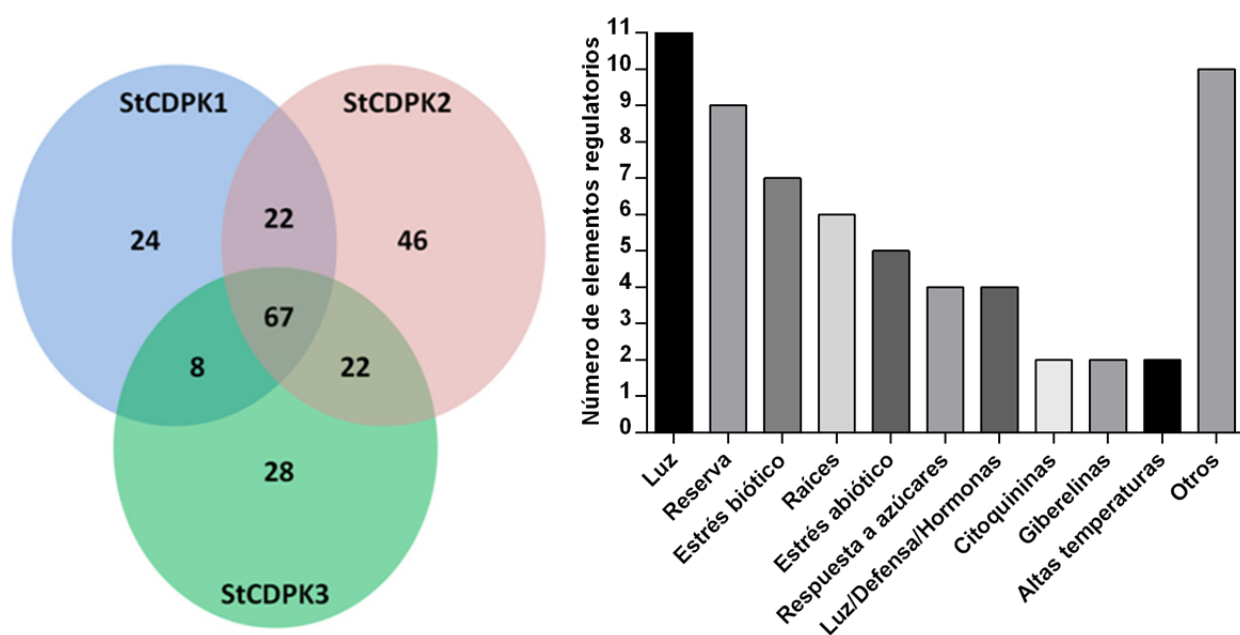
En las 100 kpb que rodean a StCDPK2 se encuentran 17 genes (Figura 1.6, Tabla 1.3); los dos genes más cercanos presentan una orientación opuesta a la quinasa. El gen más cercano río arriba de StCDPK2 es una proteína inducible de plástidos asociada a lípidos que se encuentra a 5372 pb en orientación cabeza-cabeza, mientras que 419 pb río abajo se encuentra la proteína SUI1 B en orientación cola-cola respecto a la quinasa. En base a esta información se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar la secuencia de 2,6 kb río arriba del gen y se analizaron los elementos regulatorios contenidos en la misma.

**Tabla 1.3 Entorno genómico de StCDPK2 en el cromosoma 7.** Se muestran las posiciones de los genes y la orientación de la transcripción.

| Número de acceso<br>PGSC0003DMG | Nombre del gen                              | Orientación | Posición (bp) en el<br>cromosoma 7 |
|---------------------------------|---------------------------------------------|-------------|------------------------------------|
| 400022219                       | Dead box ATP-dependent RNA helicase         | ⇐           | 54805582-54810425                  |
| 400022322                       | Conserved gene of unknown function          | ⇒           | 54811511-54819125                  |
| 400022218                       | Conserved gene of unknown function          | ⇐           | 54819500-54826858                  |
| 400022321                       | Conserved gene of unknown function          | ⇒           | 54828445-54832700                  |
| 400022320                       | Conserved gene of unknown function          | ⇒           | 54836502-54840067                  |
| 400022319                       | Cysteine-type peptidase                     | ⇒           | 54842238-54848640                  |
| 400022217                       | Inducible plastid-lipid associated protein  | ⇐           | 54846232-54850298                  |
| <b>400022318</b>                | <b>Calcium-dependent protein kinase 2</b>   | ⇒           | 54855670-54861491                  |
| 400022216                       | SUI1 B protein                              | ⇐           | 54861910-54863605                  |
| 400022317                       | Pentatricopeptide repeat-containing protein | ⇒           | 54866707-54871600                  |
| 402022316                       | Conserved gene of unknown function          | ⇒           | 54872656-54876874                  |
| 402022215                       | Aconitate hydratase 3                       | ⇐           | 54875742-54883452                  |

|           |                                                        |   |                   |
|-----------|--------------------------------------------------------|---|-------------------|
| 401022215 | NADH:ubiquinone oxidoreductase family protein          | ⇐ | 54884022-54889113 |
| 400022315 | Conserved gene of unknown function                     | ⇒ | 54893564-54895112 |
| 400022214 | Geranyl geranyl pyrophosphate synthase                 | ⇐ | 54896132-54897257 |
| 403022314 | Isoform 2 of Probable beta-1,3-galactosyltransferase 2 | ⇒ | 54899960-54904617 |
| 402022314 | Gaba(A) receptor-associated protein                    | ⇒ | 54906097-54909217 |

Se compararon los elementos presentes en las secuencias promotoras de las tres CDPKs usando las bases de datos PLACE y PlantCare. Como se observa en la Figura 1.7, las tres isoformas comparten 67 tipos de elementos entre los que se destacan numerosos elementos de respuesta a luz, a estrés biótico y abiótico (Tabla 1 del anexo). Además contienen motivos reportados en los promotores de numerosas proteínas de reserva (glutelina, hordeina, zeína, napina,  $\beta$ -conglucina) y de  $\alpha$ -amilasa, enzima con actividad hidrolítica localizada en el endosperma. Asimismo comparten elementos de expresión en raíces, de respuesta a GAs y de señalización por azúcares (panel derecho de la Figura 1.7). Esto sugiere que podrían presentar patrones de expresión solapados.



**Figura 1.7 Elementos cis-regulatorios presentes en las secuencias río-arriba de los genes StCDPK1, 2 y 3.** A la izquierda de la figura se muestra el diagrama de Venn que indica el número de elementos compartidos o no por cada isoforma. A la derecha se clasifican los elementos compartidos de acuerdo a su función hipotética

Por otro lado cada isoforma presenta elementos que no se encuentran en las otras lo que podría regular una expresión más específica. Tal es el caso del elemento AC en StCDPK1 que aumenta la expresión en xilema (Tabla 1.2). Curiosamente, StCDPK2 presenta 46 tipos de elementos en forma exclusiva. Entre ellos se destacan 7 elementos de respuesta a auxinas: ARFAT (1), AUXREPSIAA4 (3), AUXRETGA1GMGH3 (1) y GGTCCCATGMSAUR (2). Además presenta elementos de respuesta a ABA lo cual se correlaciona con el hecho de que *in vitro* StCDPK2 fosforila al factor de transcripción StABF4 de papa (Muniz Garcia et al. 2012) y elementos de respuesta a etileno (Tabla 1.4).

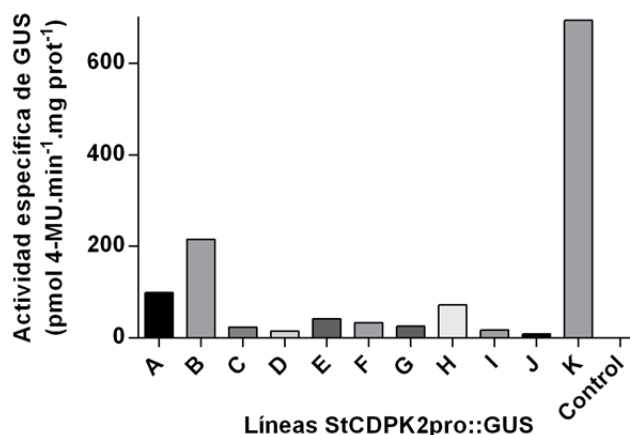
**Tabla 1.4 Elementos regulatorios asociados a hormonas presentes en el promotor de StCDPK2.**

| Asociado a: | Nombre              | Número de elementos | Secuencia  | Referencia              |
|-------------|---------------------|---------------------|------------|-------------------------|
| Auxinas     | ARFAT               | 1                   | TGTCTC     | (Nag et al. 2005)       |
|             | AUXREPSIAA4         | 3                   | KGTCCCAT   | (Ballas et al. 1993)    |
|             | AUXRETGA1GMGH3      | 1                   | TGACGTAA   | (Liu et al. 1997)       |
|             | GGTCCCATGMSAUR      | 2                   | GGTCCCAT   | (Li et al. 1994)        |
| ABA         | ABADESI1            | 1                   | RTACGTGGCR | (Mundy et al. 1990)     |
|             | ABRE3HVA22          | 1                   | GCCACGTACA | (Shen & Ho 1995)        |
|             | ABREATCONSENSUS     | 1                   | YACGTGGC   | (Choi et al. 2000)      |
|             | ABREATRD22          | 1                   | RYACGTGGYR | (Iwasaki et al. 1995)   |
|             | ACGTABREMOTIFA2OSEM | 1                   | ACGTGKC    | (Hattori et al. 2002)   |
| ETILENO     | EVENINGAT           | 1                   | AAAATATCT  | (Rawat et al. 2005)     |
|             | LECPLEACS2          | 5                   | TAAAATAT   | (Matarasso et al. 2005) |

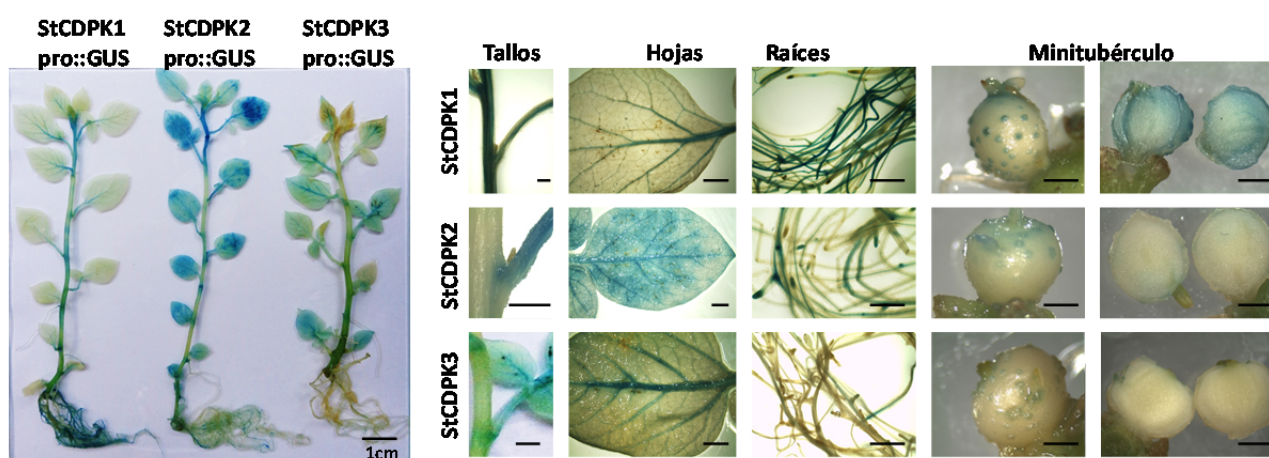
### ➤ Producción de plantas *StCDPK2pro::GUS*

A continuación se decidió comparar los perfiles de expresión de las tres CDPKs de papa (*StCDPK1*, 2 y 3) mediante el análisis histoquímico de líneas transgénicas portadoras de cada promotor fusionado a GUS. Para la comparación sólo restaba obtener las líneas de la isoforma *StCDPK2*, ya que se contaba en el laboratorio con las líneas *StCDPK3pro::GUS* (Grandellis et al. 2012). Usando como templado el ADN genómico obtenido a partir de plantas *S. tuberosum* cv Desirée y los oligonucleótidos específicos diseñados (*St2promfw* y *St2promrev*; Tabla 1 de Materiales y Métodos) se amplificó una secuencia de 2688 bp que contenía los primeros 15 codones del gen. Esta secuencia se subclonó en el vector binario pBI101 y fue corroborada por secuenciación. Seguidamente, se introdujo en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA-4404 y se transformaron entrenudos y hojas del cultivar Desirée. Se obtuvieron 11 líneas independientes que fueron confirmadas por fluorometría (Figura 1.8). De acuerdo a la actividad GUS presente en los extractos se seleccionaron las líneas B y K para los ensayos histoquímicos futuros. De aquí en más estas líneas se denominaron plantas *StCDPK2pro::GUS*.

**Figura 1.8 Confirmación de las líneas *StCDPK2pro::GUS* mediante la actividad fluorométrica de GUS.**

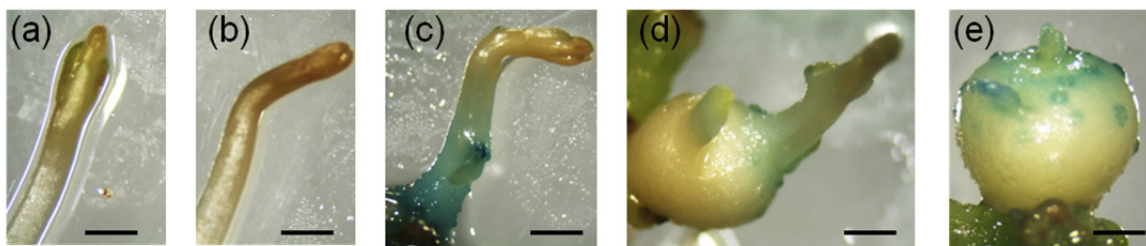


Las plantas StCDPK1pro::GUS, StCDPK2pro::GUS y StCDPK3pro::GUS se crecieron en condiciones de multiplicación durante 4 semanas y se analizó la actividad GUS por histoquímica. Como se observa en la Figura 1.9, las tres plantas presentan patrones de expresión solapados en nervaduras, pecíolos y yemas axilares. A su vez, las tres se expresan en raíces pero con una expresión espacial diferente en cada caso, siendo mucho más fuerte en el caso de StCDPK1. Por otro lado la actividad del promotor de la isoforma 2 es muy fuerte en hojas sobre todo en la lámina foliar lo cual coincide con la expresión predominante de esta isoforma en este órgano (Giammaria et al. 2011). La actividad del promotor de StCDPK3 se detectó mayormente en las nervaduras y se observó una leve tinción en el mesófilo mientras que en el caso del promotor de StCDPK1 la actividad se restringe exclusivamente a nervaduras. A su vez, la actividad del promotor de StCDPK1 y de StCDPK2 es fuerte en tallo sobre todo en la zona de elongación pero este patrón no se evidencia en las plantas StCDPK3pro::GUS.



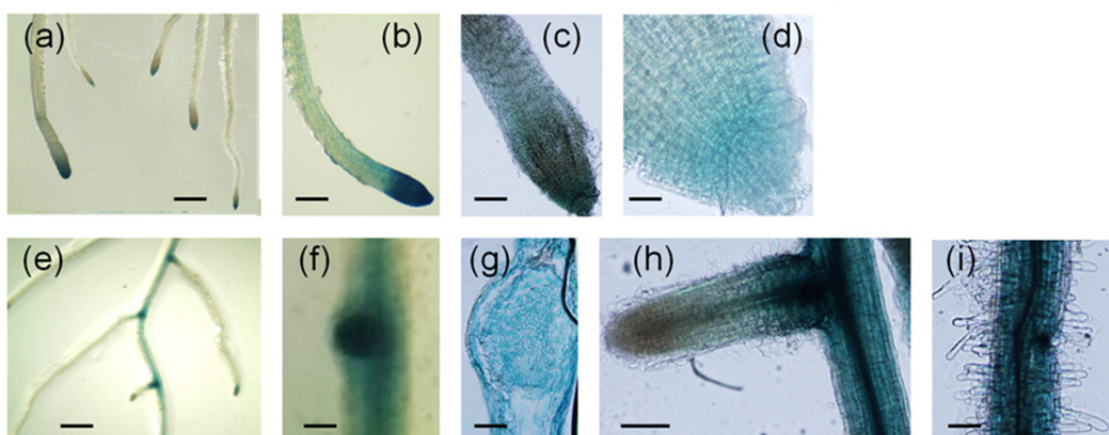
**Fig 1.9 Patrón de actividad GUS en plantas StCDPK1pro::GUS, StCDPK2pro::GUS y StCDPK3pro::GUS.** Las plantas fueron crecidas *in vitro* en condiciones de multiplicación o en condiciones de tuberización durante 4 semanas. Se muestra detalle de tallos, pecíolos, hojas, raíces y minitubérculos. En el panel de la derecha se muestra un corte longitudinal de los minitubérculos. Barra = 2mm.

Entrenudos de las plantas StCDPK1pro::GUS, StCDPK2pro::GUS y StCDPK3pro::GUS se crecieron en condiciones inductoras de la tuberización durante 4 semanas obteniéndose estolones tuberizantes en estadio minitubérculos. En los tres casos se detectó actividad de GUS en los ojos, siendo más intensa en StCDPK1pro::GUS. En un corte longitudinal se observó tinción fuerte en el haz vascular sólo en los minitubérculos de las plantas StCDPK1pro::GUS (Figura 1.9). Resultados previos mostraron actividad GUS en estolones tempranos de plantas StCDPK3pro::GUS crecidas en maceta (Grandellis et al., 2012). Al analizar el perfil de expresión del promotor StCDPK2 durante la transición estolón-tubérculo, no se observó actividad GUS en estolones tempranos, ES (Figura 1.10 a y b). Se detectó recién la actividad en estadios S1 avanzados en la zona donde ocurre el llenado del tubérculo; esta actividad persistió en el estadio S3 y en minitubérculos (Figura 1.10 c, d y e).



**Figura 1.10 Actividad GUS en estadios de tuberización de plantas StCDPK2pro::GUS.** (a) y (b) estolones tempranos (ES), (c) estolones tuberizantes S1, (d) estolones tuberizantes S3, (e) minitubérculos Barra= 2 mm

Por último se analizó el patrón de expresión en las raíces de las plantas StCDPK2pro::GUS. Siempre se encontró la actividad GUS concentrada en el ápice de la raíz (Figura 1.11, a-d). En raíces principales la tinción se extendía a lo largo y se concentraba en los puntos de nacimiento de las raíces secundarias (Figura 1.11, e-h). A diferencia de StCDPK1 no se detectó actividad en pelos radiculares (Figura 1.11, i).



**Figura 1.11 Actividad GUS en raíces de plantas StCDPK2pro::GUS.** (a-d) ápices; (e) raíces principal y laterales; (f-h): primordios de raíces laterales; (i) pelos radiculares. Barras= 5 mm en Figura e, 3mm en figura a, 1 mm en figura b, 500μm en figura c, f, h e i; 200 μm en figura g; 100 μm en figura d.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizó en profundidad el perfil de transcripción de StCDPK1 en diferentes órganos de la planta de papa y en estadios de la tuberización y se lo comparó con el de otras isoformas pertenecientes al subgrupo IIa. A pesar de no ser directamente comparables debido a diferencias en las muestras (genotipos, lapsos de tiempo y tipos de tejidos), los resultados de qPCR y los datos de RNASeq disponibles en la base de datos del genoma de papa indicaron que StCDPK1 se expresa de manera ubícua en todos los órganos de la planta. Sin embargo, las plantas StCDPK1pro::GUS mostraron que StCDPK1 está fuertemente asociada al tejido vascular como se observa en las secciones de tallo, estolones y tubérculos y en la intensa

actividad encontrada en nervaduras, pecíolos, y raíces. Se detectó una fuerte actividad del promotor de StCDPK1 en la parte superior del tallo donde ocurre la elongación y en la zona subapical de estolones tempranos elongantes.

Trabajos recientes indican un rol de CDPKs en procesos de desarrollo, como el crecimiento del tubo polínico (Gutermuth et al. 2013; Myers et al. 2009; Zhou et al. 2014), elongación del tallo (Matschi et al. 2013), elongación de las fibras en algodón (Huang et al. 2008) y en el llenado de las semillas de arroz (Manimaran et al. 2015). Llamativamente, las líneas StCDPK1::GUS mostraron un perfil de expresión muy similar a la CPK28, una isoforma de *Arabidopsis thaliana* reportada como un componente regulatorio que controla la elongación del tallo y el desarrollo vascular. En secciones transversales del tallo de la inflorescencia, la actividad del promotor de CPK28 se localizó exclusivamente en el xilema (Matschi et al. 2013). Los resultados de la actividad GUS junto con la presencia de un elemento AC en el promotor de StCDPK1 refuerzan la hipótesis de que StCDPK1 se expresaría en el xilema. Los elementos AC están presentes en los genes relacionados a la biosíntesis de lignina G (Raes et al. 2003), un polímero presente en los vasos del xilema (Donaldson 2001). El ácido giberélico (GA) está involucrado en la elongación de brotes y estolones promoviendo la elongación de fibras y la xilogénesis general (Eriksson et al. 2000; Israelsson et al. 2003; Mauriat & Moritz 2009). Acorde con los resultados, se sugiere que StCDPK1 participaría en la elongación del tallo. Esta hipótesis es respaldada por resultados previos en plantas transgénicas con expresión reducida de StCDPK1 en los estadios de tuberización, las cuales luego del tratamiento con GA, presentaron estolones significativamente más cortos que los de plantas control (Gargantini et al. 2009).

La actividad del promotor StCDPK1 durante la tuberización estuvo restringida a la zona subapical de estolones tempranos (ES y S1), se redujo drásticamente en estolones S2 y volvió a intensificarse en estolones engrosados S3 donde se observó en el anillo vascular y en la epidermis monoestratificada. Cuando la peridermis se engrosó por repetidas divisiones la actividad GUS quedó restringida a los ojos de los minitubérculos. Cabe señalar que la actividad GUS coincidió con los sitios de activa división celular que determinan la arquitectura del tubérculo (Xu et al. 1998), lo cual se correlaciona con la presencia de numerosos elementos de respuesta a citoquininas en el promotor. Las tres isoformas presentan un gran número de elementos regulatorios comunes en sus promotores, entre ellos numerosos elementos encontrados en proteínas de reserva, elementos de respuesta a azúcares, a citoquininas y a GAs lo que podría justificar patrones de expresión solapados. Cuando se comparó la actividad del promotor de StCDPK1 con la de las isoformas 2 y 3 se observó que las tres CDPKs se expresan en yemas axilares, en primordios de raíces laterales y en ojos de los minitubérculos sugiriendo que participan en procesos que requieren activa división celular y diferenciación.

Sin embargo es evidente que cada isoforma tiene un patrón de expresión particular durante la tuberización. StCDPK1 fue la única isoforma cuyo promotor exhibió actividad GUS en la vasculatura de minitubérculos; la actividad del promotor de la isoforma 2 se observó una vez que los estolones comenzaban a engrosarse mientras que plantas StCDPK3pro::GUS exhibieron actividad intensa en los ápices de estolones tempranos pero a medida que progresaba el crecimiento radial y la expansión celular y los estolones entraban en el estadio S3, la actividad GUS

disminuía (Grandellis et al., 2012). En consecuencia, los promotores de las tres isoformas parecen estar activos durante los diferentes estadios del desarrollo del tubérculo pero presentan patrones de expresión espacio-temporal diferentes, posiblemente debido a que cumplen roles distintos durante la tuberización.

La especificación del tejido vascular y la diferenciación del xilema son regulados mediante el efecto combinatorio de auxinas, citoquininas y brasinosteroides (Hussey et al. 2013). Al inicio de la tuberización, el contenido de auxinas aumenta localmente en el ápice del estolón, justo antes del engrosamiento y el principal movimiento de IAA ocurre desde el ápice del estolón hacia la parte basal (Roumeliotis et al. 2012b). En estolones y tubérculos, la actividad de GUS dirigida por el promotor de StCDPK1 se solapa con la alta concentración de auxinas reportada por Roumeliotis et al. (2012a). Además, el patrón de expresión de StCDPK1 en el tejido vascular de estolones y tubérculos es similar al reportado para los transportadores de auxinas, StPIN2 y StPIN4 (Roumeliotis et al. 2013). StCDPK1 y StPIN4 comparten la expresión en la región subapical donde ocurre el engrosamiento y en la parte basal de la médula cercana al extremo proximal. Se ha reportado que la localización de proteína PIN es controlada mediante la fosforilación del bucle hidrofílico (Huang et al. 2010; Sasayama et al. 2013). La coincidencia espacio-temporal de StCDPK1 durante la transición estolón-tubérculo con el contenido de auxinas y con los transportadores de eflujo de auxinas sugiere que esta quinasa podría participar en el control del flujo de auxinas regulando la diferenciación del tejido vascular. Se requieren estudios adicionales para corroborar esta hipótesis.

Las tres CDPKs presentan elementos de expresión en raíces sin embargo su localización es diferente. La actividad del promotor StCDPK1 fue muy intensa en las raíces principales, laterales y adventicias pero no se detectó actividad en el ápice radicular. El patrón de expresión de StCDPK1 es similar al observado para ARR5 en raíces de *Arabidopsis* (D'Agostino et al. 2000), un regulador de respuesta a citoquininas que participa en la respuesta gravitrópica de raíces. Contrariamente, StCDPK2 y 3 están presentes en el ápice radicular. Varias CDPKs de *Arabidopsis* regulan el crecimiento (Luo et al. 2014), la conductividad hidráulica (Li et al. 2014), y el gravitropismo en raíces (Huang et al. 2013); asimismo se reportó que el calcio y una actividad de CDPK intervienen en la formación de raíces adventicias en pepino (Lanteri et al. 2006). Las auxinas son hormonas clave que promueven la formación de raíces laterales (Fukaki et al. 2007); en *Arabidopsis* se ha propuesto que el balance entre factores ARF (auxin responsive factors) activadores y represores controla la iniciación de raíces adventicias (Gutierrez et al. 2009). La fuerte expresión de StCDPK2 en los primordios de raíces laterales junto a los elementos de respuesta a auxinas en su promotor sugiere que esta isoforma estaría implicada en el desarrollo de nuevas raíces. Sería interesante profundizar en el papel que podría desempeñar StCDPK2 en este proceso.

A su vez es muy destacable la alta expresión StCDPK2 en hojas, tanto en nervaduras como en la lámina foliar lo que confirma datos previos del laboratorio (Giammaria et al., 2011). Esta localización junto a la altísima homología que StCDPK2 presenta con LeCDPK1 de tomate (98%), isoforma vinculada con el daño mecánico y la respuesta frente a patógenos (Chico et al. 2002) podría sugerir que desempeña un papel en la respuesta defensiva de la planta. También es interesante mencionar que en el promotor de StCDPK2 se encuentran los elementos ABRE

encontrados en genes regulados por los factores de transcripción ABF. En *Arabidopsis*, la isoforma AtCPK32 interactúa con el factor AtABF4 regulando su actividad (Choi et al., 2005). StCDPK2 es capaz de interactuar y fosforilar a StABF4 de papa (Muniz Garcia et al. 2012) lo que sugiere una regulación recíproca entre el ABF y StCDPK2.

Los datos presentados en este capítulo demuestran que las isoformas StCDPK1 y StCDPK2 poseen perfiles de expresión tejido-específicos vinculados con procesos de desarrollo (raíces laterales y adventicias, elongación del tallo, tuberización) desencadenados en respuesta a hormonas y estímulos ambientales.

## CAPÍTULO 2: Estudio post-transcripcional de StCDPK1

Los resultados del capítulo 1 de esta Tesis y datos previos del laboratorio indican que la expresión de StCDPK1 está finamente regulada. Se quiere estudiar si la expresión de esta quinasa podría también estar regulada post-transcripcionalmente. Los ARNs pequeños no codificantes, microARNs (miARNs) son importantes reguladores post-transcripcionales que participan en numerosos procesos de desarrollo y vías de respuesta a estreses en plantas. Se ha reportado que los miR156 y miR172 desempeñan un papel importante en la regulación de la tuberización en la planta de papa; experimentos con injertos revelaron que miR156 es una señal transmisible que facilita la formación del tubérculo en condiciones de días cortos (Bhogale et al. 2014), mientras que miR172 es una señal inductora de la tuberización (Martin et al. 2009). Considerando que StCDPK1 participa en la tuberización se propuso analizar si podría ser un blanco de la acción de microARNs.

### Predicción y validación de microARNs que tengan como blanco a StCDPK1

En papa, se identificaron 89 miARNs que también están conservados en otras especies y 147 miARNs específicos de papa. Los blancos de los miARNs conservados resultaron ser en su mayoría genes involucrados en procesos biológicos esenciales mientras que los blancos de los miARNs específicos correspondieron tanto a transcriptos vinculados a procesos esenciales como específicos de la papa (Lakhotia et al. 2014).

Para estudiar si existen microARNs que tengan como blanco a StCDPK1, se llevó a cabo una búsqueda bioinformática mediante el programa psRNATarget utilizando como blanco la secuencia del transcripto de StCDPK1. Esta herramienta predice miARNs candidatos que podrían regular al gen de interés. El resultado de esta búsqueda predijo que el StmiR390 (21 bp) podría tener como blanco una secuencia del dominio quinasa de StCDPK1 provocando el arresto de la traducción (Tabla 2.1, Figura 2.1).

**Tabla 2.1** Resultado de la predicción del psRNATarget

| psRNATarget prediction results |                                                                                                             |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| miRNA Accession                | Stu-miR390                                                                                                  |
| Target Accession               | gi   10568115   gb   AF115406.2                                                                             |
| Expectation (E)                | 5.0                                                                                                         |
| Target Accessibility (UPE)     | 15.05                                                                                                       |
| Alignment                      | miRNA 21 CCACGAUAGGGAGGACUCGAA 1<br>: : : : : : : : : : : : : : : :<br>Target 607 GGUGUUAUGCAUCGUGAUCUU 627 |
| Target description             | <i>Solanum tuberosum</i> calcium-dependent protein kinase mRNA cds                                          |
| Inhibition                     | Translation                                                                                                 |
| Multiplicity                   | 1                                                                                                           |

Para reducir la probabilidad de falsos positivos, los resultados del psRNATarget fueron testeados con el programa TargetAlign (<http://www.leonxie.com/targetAlign>) (Xie & Zhang 2010) usando parámetros por defecto. El precursor de StmiR390 corresponde al EST731205 (835 pb) obtenido a partir de una biblioteca de ADNcs de callos (GenBank Acc. CK247568.1).

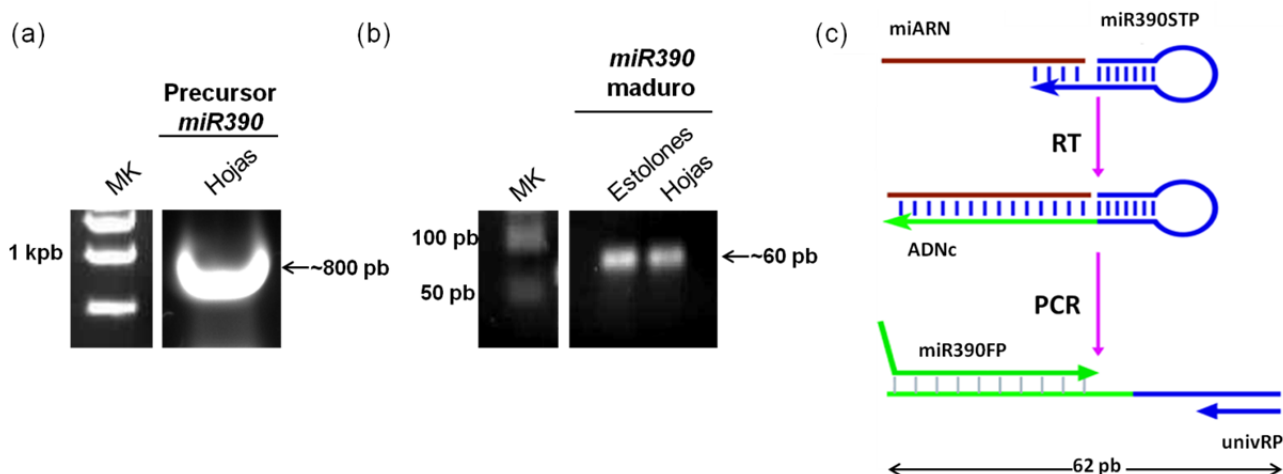
Se predijo la estructura secundaria del precursor de miR390 usando la herramienta bioinformática MFold (Zuker 2003). El precursor presenta la típica estructura tallo-burbuja (*hairpin loop*) con la secuencia del miR390 maduro en la región del tallo (Figura 2.1).



**Figura 2.1 Estructura secundaria del precursor miR390 de acuerdo a Mfold (Zuker 2003).** Se muestra la secuencia del miR390 maduro y se resalta en amarillo la secuencia blanco en StCDPK1.

Para confirmar la presencia del precursor se obtuvo ARN de hojas de plantas *Solanum tuberosum* ssp *tuberosum* cv. Desirée cultivadas en invernadero. El ADNc se sintetizó usando oligo-dT y se realizaron ensayos de PCR con los oligonucleótidos específicos miR390preFP y miR390preRP (Tabla M1 de materiales y métodos). El amplicón de 835 pb (Figura 2.2a) se clonó en pENTR2B y se secuenció. La presencia del miR390 maduro se confirmó en estolones y en plantas enteras de *Solanum tuberosum* ssp *tuberosum* cv. Desirée cultivadas *in vitro* con la técnica de stem-loop RT-PCR (Figura 2.2b y c). En este caso la reacción de transcripción reversa se realizó usando el ARN obtenido y el oligonucleótido miR390STP; a partir del ADNc se amplificó el miR390 utilizando los oligonucleótidos miR390FP y univRP (Tabla M1 de materiales y métodos). El amplicón se clonó en

pGEMT-easy y se confirmó por secuenciación. Los mismos ensayos se repitieron en plantas *Solanum tuberosum* ssp andígena confirmando la presencia del precursor y del miARN maduro.



**Figura 2.2 Validación de la presencia del miR390 en *S. tuberosum* cultivar Desirée.** (a) Precursor miR390 (835 bp) en hojas. (b) miR390 maduro (62 bp) en estolones y hojas. (c) Diagrama de la RT-PCR tallo-burbuja utilizada para la detección de miARNs. MK= Marcador de peso molecular.

Para identificar la posición del precursor en el genoma de papa se realizó una búsqueda por Blastn usando la secuencia del precursor contra diferentes bases de datos de PGSC *S. tuberosum* group Phureja DM1-3 o contra la base de datos de pseudomoléculas (v2.3) de *Solanum lycopersicum* (ITAG). Como se observa en la Tabla 2.2, la mejor coincidencia (Identidad y cobertura del 100%) se encuentra en el cromosoma 10 entre las posiciones 49608938 y 49609772 correspondiéndose con PGSC0003DMS0000001874 o con PGSC0003DMS000000664 en las bases de datos scaffold (v3) y superscaffold (v3) respectivamente. Las otras coincidencias encontradas en los cromosomas 11, 7, 6 y 9 sólo cubren una pequeña porción del transcripto. A su vez, en la base de datos de tomate la mejor coincidencia fue SL2.40ch10 (Cobertura: 27.19%; Identidad 92.21%); cabe mencionar que la región que contiene la secuencia de microARN maduro es 100% idéntica.

**Tabla 2.2** Resultados de la búsqueda Blastn usando la secuencia del precursor de miR390 contra la base de datos de PGSC *S. tuberosum* grupo Phureja DM1-3

| Número de acceso                                   | Número de acceso del scaffold | Número de acceso del superscaffold | Hit Score | E value | Num HSPs | Top Query Cov | Top Id |
|----------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|-----------|---------|----------|---------------|--------|
| chr10: 49608938-49609772                           | PGSC0003DMS00001874           | PGSC0003DMB000000446               | 835       | 0.0     | 1        | 100.0         | 100.0  |
| chr11: 9408342-9408370                             | PGSC0003DMS00002834           | PGSC0003DMB000000133               | 29        | 2e-06   | 1        | 3.47          | 100.0  |
| chr07: 53423630-53423658 y chr07:41770020-41770059 | PGSC0003DMS00001480           | PGSC0003DMB000000096               | 29        | 2e-06   | 2        | 3.47          | 100.0  |
| chr06: 5501021-                                    | PGSC0003DMS0                  | PGSC0003DMB000                     | 28        | 9e-06   | 1        | 3.35          | 100.0  |

|                      |                     |                      |    |       |   |      |       |
|----------------------|---------------------|----------------------|----|-------|---|------|-------|
| 5501048              | 00001371            | 000337               |    |       |   |      |       |
| chr09: 938656-938618 | PGSC0003DMS00002395 | PGSC0003DMB000000248 | 31 | 1e-07 | 1 | 4.67 | 94.87 |

Se analizó el entorno genómico del precursor de miR390 en el cromosoma 10 (Tabla 2.3). La región genómica de 100 kb contiene 10 genes; el gen río arriba más cercano, un gen de función desconocida, se encuentra a 2.6 kb en orientación cola-cola mientras que el gen más cercano río abajo, que codifica para una Brassinazole-resistant 2 protein, se encuentra a 19,6 kb en orientación cabeza-cabeza.

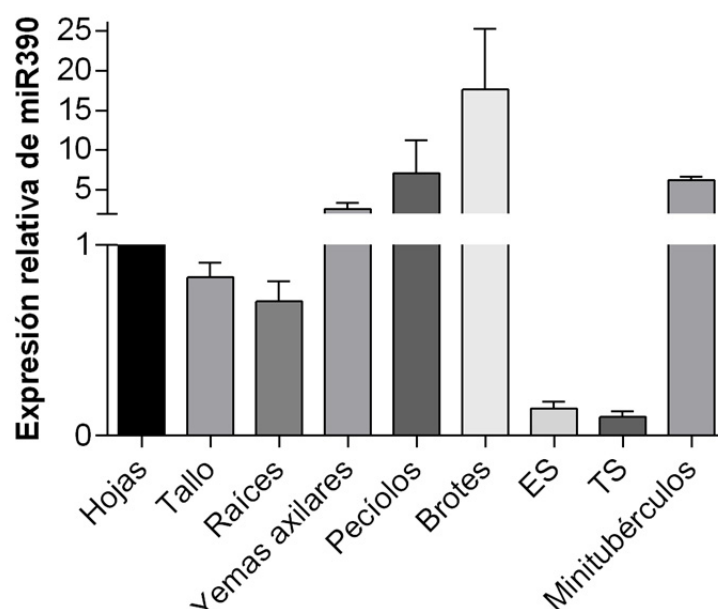
**Tabla 2.3** Entorno genómico del precursor de *miR390* en el cromosoma 10.

| Número de acceso     | Nombre del gen                                    | Orientación | Posición en cr. 10       |
|----------------------|---------------------------------------------------|-------------|--------------------------|
| PGSC0003DMG400015888 | Prenylated Rab acceptor protein                   | ⇒           | 49584142-49585206        |
| PGSC0003DMG400015895 | Crooked neck protein                              | ⇐           | 49586893-49588246        |
| PGSC0003DMG400015889 | AP2/ERF domain transcription factor               | ⇒           | 49592307-49593838        |
| PGSC0003DMG400015890 | DREB                                              | ⇒           | 49598328-49599724        |
| PGSC0003DMG401015891 | Dehydration responsive element binding protein 2E | ⇒           | 49605449-49605805        |
| PGSC0003DMG402015891 | Gene of unknown function                          | ⇒           | 49605883-49606278        |
| PGSC0003DMB000000446 | <b>miR390 precursor</b>                           | ⇐           | <b>49608938-49609772</b> |
| PGSC0003DMG400041163 | Protein Brassinazole-resistant 2                  | ⇒           | 49627275-49628323        |
| PGSC0003DMG400015896 | Conserved Gene of unknown function                | ⇐           | 49630126-49632168        |
| PGSC0003DMG400015897 | Abscicic acid receptor protein                    | ⇐           | 49647857-49648738        |
| PGSC0003DMG400015892 | Conserved Gene of unknown function                | ⇐           | 49656262-49659944        |

Con el fin de buscar elementos cis-regulatorios que pudieran modular la expresión del precursor y que también estuvieran presentes en el promotor de StCDPK1 se analizó la región de 2kb río arriba del precursor StmiR390 con las bases de datos PLACE y PlantCare. La región promotora del precursor contiene 27 elementos presentes en proteínas de reserva, aún más que el promotor de StCDPK1 (19). También presenta 29 elementos de expresión en raíces y 30 elementos de respuesta a citoquininas, un poco menos que el promotor de StCDPK1 (54 y 45 respectivamente). Por otro lado, no contiene elementos relacionados con la expresión en xilema o en brotes pero sí presenta elementos de expresión en mesófilo (29 elementos CACTFTPPCA1, YACT). Además la secuencia promotora del precursor miR390 comparte con el promotor de StCDPK1 la mayoría de los elementos de respuesta a estrés osmótico, salinidad, sequía y estrés térmico aunque presenta pocos elementos LRE de respuesta a bajas temperaturas. A diferencia de StCDPK1, el promotor del precursor contiene elementos de respuesta a auxinas (1 AUXRETGA1GMGH3, TGACGTAA y 1 AuxRR-core, GGTCCAT), etileno (1 ERE, ATTTCAAA) y ABA (4 ABRE, GACACGTACGT, 2 ABRELATERD1, ACGTG and 1 ABREMOTIFAOSOSEM, TACGTGTC).

A continuación se analizó el perfil de expresión del miR390 maduro en los diferentes órganos de la planta y en estadios de tuberización usando la técnica de Stem-loop qRT-PCR descrita anteriormente. Los datos se normalizaron respecto a la expresión de GAPDH y se relativizaron a

los valores de hoja. Como se observa en la figura 2.3, el microARN está presente en todos los órganos siendo muy alta su expresión en brotes, yemas axilares, pecíolos y minitubérculos, mientras que se encuentra en muy baja proporción en estolones tempranos y estolones tuberizantes.

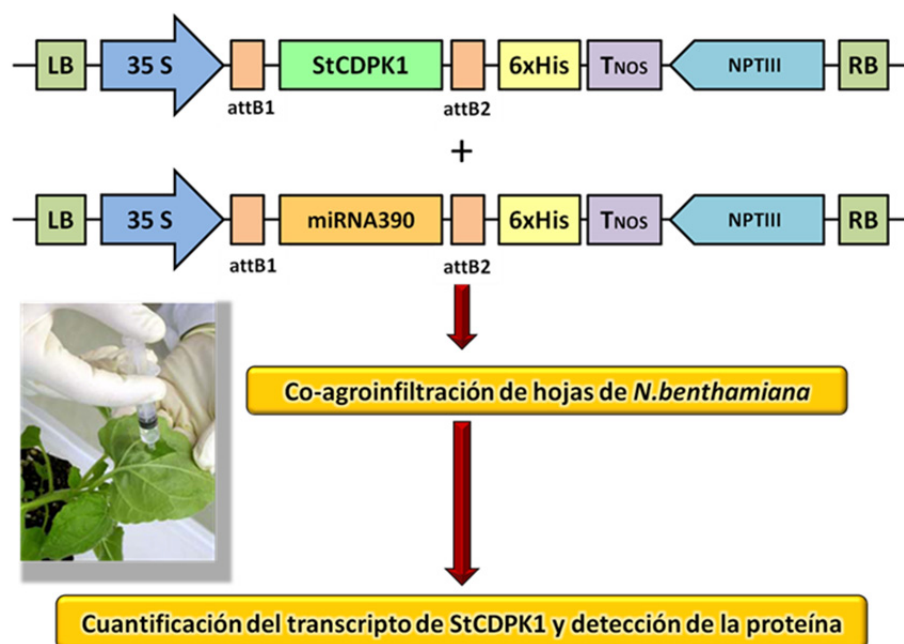


**Figura 2.3 Análisis de expresión de miR390 maduro por Stem-Loop qRT-PCR en diferentes órganos.** Los valores obtenidos para cada órgano fueron normalizados con respecto a los niveles de GAPDH. Las barras de error indican ( $\pm$ ) SD de tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una. ES, estolones tempranos; TS son estolones tuberizantes con diferente grado de engrosamiento.

Estos resultados se compararon con los datos de expresión de StCDPK1 presentados en la Figura 1.1 del capítulo 1. En ambos casos se utilizó el mismo ARN de partida (1 $\mu$ g) y se normalizó a los valores de GAPDH. Tanto el miR390 como StCDPK1 se expresan en los mismos tejidos, sin embargo sus patrones de expresión relativa son diferentes y el blanco (StCDPK1) exhibe una significativa correlación inversa con el miARN. Mientras que la expresión del miR390 maduro es alta en minitubérculos y pecíolos y muy baja en estolones tempranos y tuberizantes; la expresión de StCDPK1 es baja en pecíolos y minitubérculos y significativa en estolones tempranos y tuberizantes.

Estos resultados sugieren que el miR390 podría afectar la expresión de la quinasa post-transcripcionalmente. Para validar esta hipótesis se generaron los constructos 35S::StCDPK1-6xHis y 35S::precursor en el vector binario pGWB408 y se realizaron experimentos de co-expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Las agroinfiltraciones se realizaron con los constructos y con el vector vacío como control negativo; también se incluyó un control de hojas infiltradas con agua. Se confirmó la expresión de StCDPK1 y del miR390 maduro en las hojas agroinfiltradas por ensayos de qRT-PCR. Para detectar la proteína StCDPK1-6xHis. Asimismo se

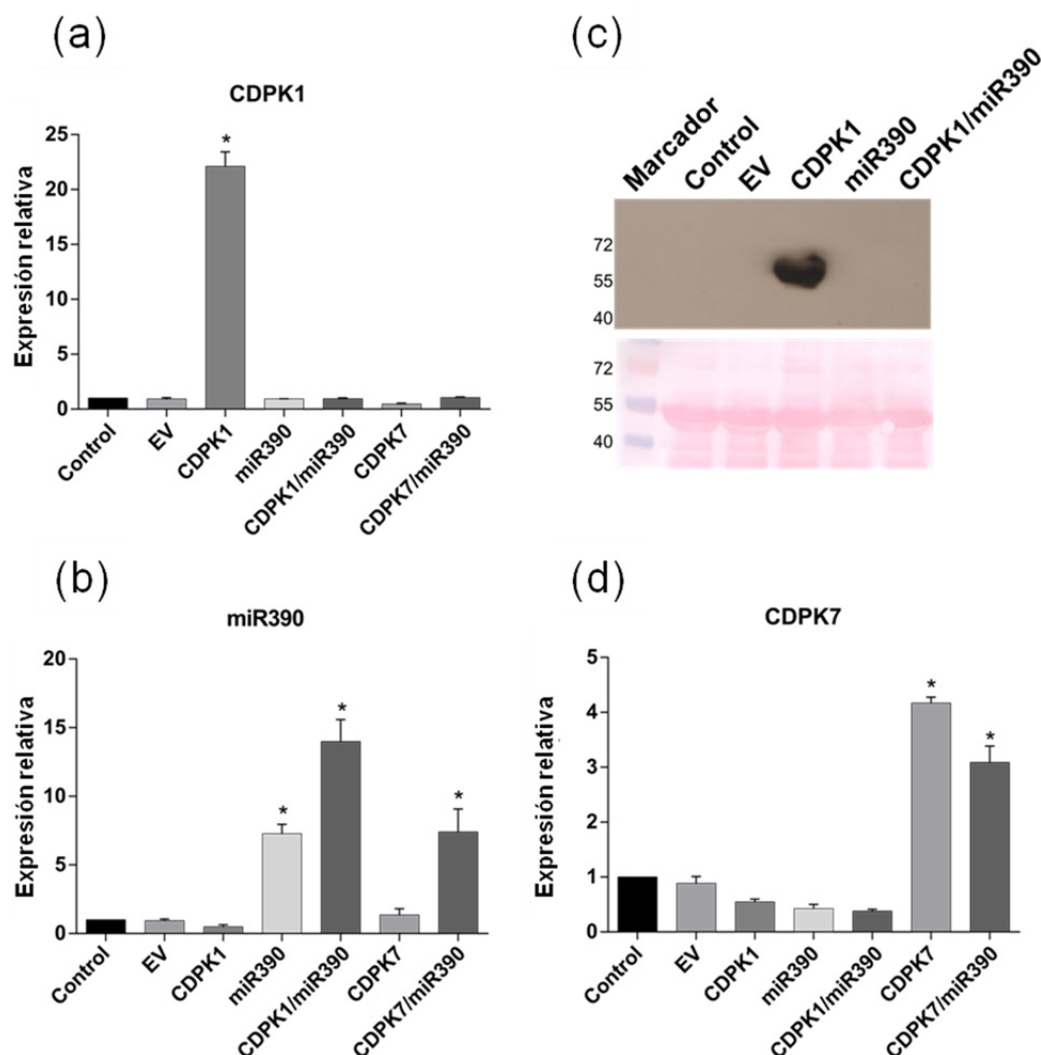
obtuvieron los extractos de las hojas y se realizaron ensayos de Western blot con un anticuerpo anti-polihistidina (Figura 2.4).



**Figura 2.4 Estrategia para validar la interacción miR390-StCDPK1.** Los constructos se generaron en el vector binario pGWB408 a través del clonado GATEWAY.

Como se observa en la Figura 2.5 (a y b), los niveles de transcriptos de StCDPK1 y miR390 en las hojas agroinfiltradas con cada constructo por separado fueron significativamente diferentes que los de los controles con agua o con vector vacío (EV). Cuando se agroinfiltraron los constructos de StCDPK1 y del precursor en forma conjunta, el nivel de los transcriptos de StCDPK1 disminuyó abruptamente respecto del nivel de la agroinfiltración sin el microARN (Figura 2.5a); mientras que los niveles del miR390 maduro no se vieron afectados (Figura 2.5b). El análisis por Western blot confirmó la presencia de una banda específica correspondiente a la proteína StCDPK1-6xHis en la agroinfiltración individual (calle CDPK1 en la Figura 2.5c) indicando que el ARNm se tradujo. Sin embargo no se detectó esta banda en la agroinfiltración conjunta, ni en los controles negativos lo cual correlaciona con los bajos niveles de transcriptos de StCDPK1 detectados.

Para determinar que la interacción entre StCDPK1 y el miR390 es específica se utilizó como control otra isoforma de CDPK. La isoforma StCDPK7 pertenece al subgrupo I y no surgió como un blanco candidato en el análisis *in silico*. Los ensayos de expresión transitoria con esta isoforma no mostraron diferencias significativas en los niveles de transcriptos de StCDPK7 en presencia o ausencia del microARN (Figura 2.5d). Estos resultados demuestran que el miR390 tiene como blanco los transcriptos de StCDPK1 de manera específica.



**Figura 2.5 miR390 regula post-transcriptionalmente a StCDPK1.** Análisis de expresión por qRT-PCR de (a) StCDPK1, (b) miR390 maduro y (d) StCDPK7 en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltrada y en controles (infiltradas con agua). EV=vector pGWB408; CDPK1=35S::CDPK1; miR390= 35S::miR390precursor; CDPK7= 35S::CDPK7; CDPK1/miR390 = 35S::CDPK1 + 35S::miR390precursor; CDPK7/miR390= 35S::CDPK7 + mi35S::miR390precursor. Se usó GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) para normalizar. Se graficaron la medias  $\pm$  SD de 3 réplicas biológicas cada una con 3 réplicas técnicas. Los datos se analizaron con One-way ANOVA y el test de múltiples comparaciones de Tukey ( $p < 0.05$ ). (c) El análisis de Western blot de extractos proteicos (50 $\mu$ g) de hojas agroinfiltradas se realizó con el anticuerpo anti-poliHis (1:7000). Se muestra el control de carga en la membrana teñida con Rojo Ponceau.

## DISCUSIÓN

Varias moléculas co-existen en el sistema vascular de las plantas; entre ellos se encuentran los miARNs que representan un nivel adicional en la regulación de la expresión génica que afecta diversos procesos de desarrollo. Por ejemplo, ATHB15 parece afectar negativamente el desarrollo del xilema, mientras que la degradación del transcripto de ATHB15 mediada por miR166 promueve la diferenciación del xilema (Kim et al. 2005). Aún no se conoce si los miARNs podrían desempeñar un papel en la regulación post-transcriptional de las CDPKs. En esta tesis, se muestra por primera vez que StCDPK1 está regulada por miR390 en papa.

A través del análisis *in silico* y la secuenciación masiva de bibliotecas de ARN pequeños preparadas a partir de tejidos de hoja, raíz, tallo y cuatro estadíos de desarrollo del tubérculo, se identificaron familias de miARNs conservados y miARNs específicos de papa (Lakhotia et al. 2014; Zhang et al. 2013). Si bien la mayoría de los genes blanco de los miARNs de papa resultaron ser factores de transcripción, se predijo que miR390 podría tener como blancos tanto a una proteína fosfatasa como a una quinasa (Lakhotia et al. 2014). La búsqueda *in silico* usando la secuencia del transcripto de StCDPK1 a través de dos herramientas bioinformáticas diferentes, predijo que StCDPK1 sería blanco de miR390, y debido a la extensión de la complementariedad entre ellos se predijo que la regulación era a nivel de la traducción. Llamativamente, la secuencia blanco del miR390 corresponde al dominio quinasa en una región altamente conservada entre las CDPKs sugiriendo que podría ser un modo general de regulación. Sin embargo, no se encontraron resultados positivos cuando la búsqueda se realizó con las secuencias de los transcriptos de las isoformas StCDPK2 (AF418563.3), StCDPK3 (AF518003) y StCDPK7 (KJ830932). Esto sugiere que StCDPK1 sería el único transcripto blanco de miR390.

Una búsqueda *in silico* indicó que la secuencia del precursor de miR390 se localiza en el cromosoma 10 en una región rica en genes. Análisis de la secuencia del promotor reveló la presencia de numerosos elementos cis-regulatorios relacionados con la expresión en raíces y de proteínas de almacenamiento, así como elementos de respuesta a citoquininas, los cuales también están presentes en el promotor de StCDPK1. Además, comparte muchos elementos de respuesta de estrés con el promotor StCDPK1. Las similitudes entre ambos promotores sugieren que, bajo ciertas condiciones, StCDPK1 y el precursor de miR390 se transcribirían de forma simultánea.

Aunque Lakhotia et al (2014) analizó la expresión de 15 miARNs conservados y 6 específicos de papa en diferentes tejidos y en etapas tempranas tuberización, el miR390 no estaba entre ellos. La presencia tanto de la forma madura como del precursor del miR390 se confirmó en tejidos de plantas enteras y en estolones. Además, el análisis de PCR cuantitativa reveló que miR390 se expresa en todos los tejidos examinados pero su expresión fue predominante en los pecíolos, yemas axilares y tubérculos maduros, pero muy baja en los estolones tempranos y estolones engrosados.

Es destacable que los transcriptos de StCDPK1 y miR390 exhiben perfiles de expresión opuestos durante la transición estolón-tubérculo, lo que sugiere que en los tubérculos maduros, el miR390 reduciría la expresión de StCDPK1. En órganos en estado de desarrollo secundario (brotes, raíces y tubérculos) la epidermis se sustituye por una peridermis suberificada (Reeve et al. 1969). El felema es un tejido protector compuesto por células muertas con paredes suberizadas formadas por el felógeno. La peridermis se inicia por divisiones de células tanto epidérmicas como subepidérmicas, primero en el extremo basal del tubérculo y más tarde en la región apical (Artschwager 1924; Reeve et al. 1969). Durante la fase inicial de desarrollo en la peridermis de estolones engrosados, cuando el felógeno está en activa división, fue evidente la expresión de StCDPK1; sin embargo, su expresión disminuyó fuertemente en la peridermis pluriestratificada, permaneciendo sólo en los ojos del tubérculo. Curiosamente, la expresión StCDPK1 se intensifica en los tejidos jóvenes en desarrollo; por lo tanto, se podría sugerir que miR390 podría estar involucrado en el control de su expresión en tubérculos maduros.

Los experimentos de co-agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana*, seguidos por análisis de PCR cuantitativa y PAGE de extractos de proteínas, se llevaron a cabo para validar si miR390 podría controlar la expresión de StCDPK1. Se observó una disminución drástica en los niveles del

transcripto y proteína de StCDPK1 luego de la co-agroinfiltración con el miR390, lo que demuestra que miR390 regula post-transcripcionalmente la expresión de la quinasa. Aunque, el análisis *in silico* predijo que el modo de acción de miR390 sería a través de la inhibición de la traducción, se demostró que miR390 podría degradar el transcripto de StCDPK1. Este hallazgo concuerda con el hecho de que la regulación génica mediada por miARNs podría ocurrir tanto a través de la degradación de transcriptos como del bloqueo de la traducción (Brodersen et al. 2008; Liu et al. 2013a). Los niveles indetectables de la proteína StCDPK1 en el ensayo de agro-coinfiltración podría deberse al nivel reducido del transcripto y/o a la inhibición de la traducción por miR390. En papa, se postuló que el miR172 funcionaría como una señal móvil de larga distancia para la tuberización (Martin et al. 2009). Más recientemente, se demostró que el miR156 es una señal móvil del floema que regula el desarrollo del tubérculo mediante la modulación del miR172 a través de su blanco StSPL9 (Bhogale et al. 2014). En este capítulo, mostramos que miR390 tiene como blanco a StCDPK1. Experimentos adicionales contribuirán a dilucidar el papel de miR390 en la tuberización de la papa. El hecho de que las CDPKs podrían controlarse post-transcripcionalmente agrega un nuevo punto de control a estas versátiles quinasas.

## CAPÍTULO 3: Caracterización bioquímica de StCDPK1 y análisis de sus posibles blancos de acción

### Predicción de motivos conservados y caracterización bioquímica de StCDPK1 recombinante

El análisis bioinformático de la secuencia de StCDPK1 usando los programas SMART, Pfam, PROSITE y los sitios predictores de miristoilación (Plant-Specific Myristoylation Predictor) y palmitoilación (CSS-Palm y NBA-Palm) indican que el dominio NTV de la proteína presenta una estructura desordenada (aminoácidos 9 a 65) y contiene los consensos de miristoilación y palmitoilación (MGVCLSKSK) seguidos de un dominio de baja complejidad comprendido entre los aminoácidos 17 y 39. El dominio quinasa de proteínas serina/treonina abarca los aminoácidos 84 a 342 y en la región C-terminal de la proteína se encuentran los cuatro sitios EF-hand de unión al calcio (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Predicción de motivos conservados en la secuencia de StCDPK1



| <i>SMART/Pfam/PROSITE</i> |        |     |                      |
|---------------------------|--------|-----|----------------------|
| Nombre                    | Inicio | Fin | E-value              |
| baja complejidad          | 17     | 39  | N/A                  |
| S_TKc                     | 84     | 342 | 1.29E <sup>-99</sup> |
| EFh                       | 389    | 417 | 4.56E <sup>-05</sup> |
| EFh                       | 425    | 453 | 0.0218               |
| EFh                       | 461    | 489 | 0.152                |
| EFh                       | 496    | 524 | 2.70E <sup>-07</sup> |

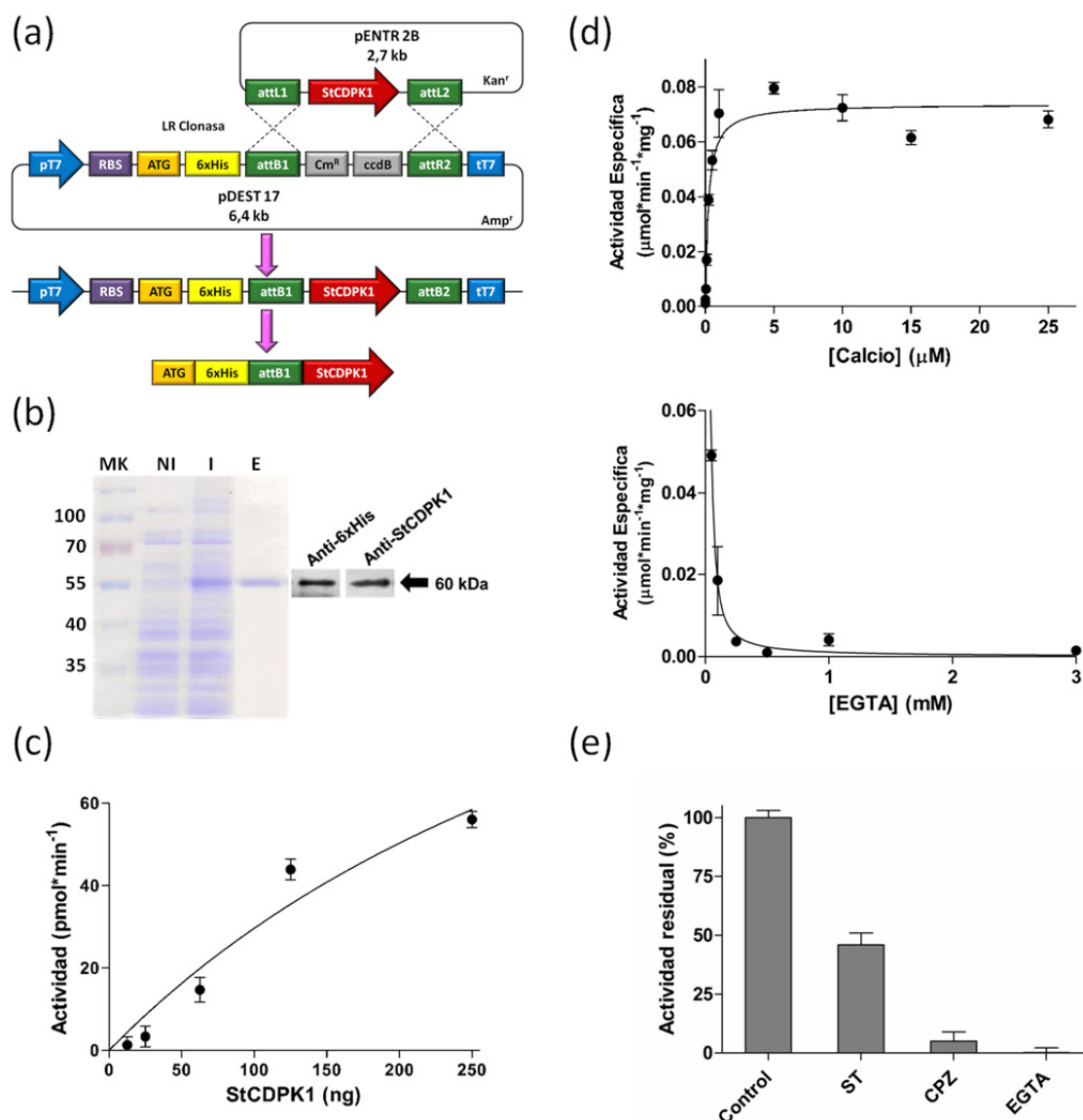
| <i>Plant-Specific Myristoylation Predictor (Podell &amp; Gribskov 2004)</i> |                          |        |     |       |         |            |
|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------|-----|-------|---------|------------|
| ID                                                                          | Matched sequence         | Inicio | Fin | Score | Valor P | Predicción |
| <b>StCDPK1</b>                                                              | MGVCLSKSKPAESKSDGHYRSGGS | 1      | 25  | 14.3  | -3.2    | Positiva   |

| <i>CSS-Palm/NBA-Palm (Xue et al. 2006; Zhou et al. 2006)</i> |          |              |        |
|--------------------------------------------------------------|----------|--------------|--------|
| Péptido                                                      | Posición | Probabilidad | CutOff |
| <b>MGVCLSKSKP</b>                                            | 4        | 0.990        | 0.8    |

Las predicciones concuerdan con experimentos de traducción *in vitro* realizados con el sistema de germen de trigo que demostraron que StCDPK1 codifica una proteína de 60 kDa con actividad de quinasa de proteínas dependiente de calcio que es capaz de miristoilarse (Raíces et al. 2001). En ensayos de expresión transitoria en cebolla se demostró que el consenso de miristoilación y palmitoilación es funcional y que la quinasa se localiza en la membrana plasmática (Raíces et al., 2003) y luego en ensayos histoquímicos con anticuerpos anti-StCDPK1 se comprobó su presencia en la membrana plasmática de brotes de papa (Gargantini et al. 2009). Sin embargo, hasta el momento no se había logrado obtener la proteína recombinante activa para poder determinar los parámetros cinéticos de la quinasa y caracterizarla en profundidad.

En primer lugar, se procedió a la obtención de la StCDPK1 recombinante en bacterias (Figura 3.1). Para esto, se clonó la secuencia codificante completa de StCDPK1 en el vector de entrada pENTR 2B utilizando las enzimas de restricción BamHI y NotI. A continuación, la secuencia se introdujo en el vector de destino pDEST17 mediante recombinación catalizada por la enzima LR clonasa del sistema Gateway. El vector pDEST17 está diseñado para obtener la proteína etiquetada con seis histidinas en el extremo amino terminal lo que permite su rápida purificación por cromatografía de afinidad en una columna de níquel-agarosa (Figura 3.1a). El constructo se confirmó por secuenciación. Tras ello, se transformaron bacterias *E. coli* BL21 Codon Plus con el plásmido recombinante, se indujo la expresión de la proteína con 1 mM IPTG y posteriormente se purificó mediante una columna de níquel-agarosa. El eluido de la columna se analizó por SDS-PAGE y Western Blot con anticuerpos anti-polihistidina y anti-StCDPK1 que reconoce el NTV y parte del dominio quinasa de la proteína (Figura 3.1b). Una vez confirmada su presencia, la proteína fue dializada en buffer Tris-HCl 25 mM pH 7.5, NaCl 100 mM y glicerol 10 %, este paso es esencial para obtener la enzima activa.

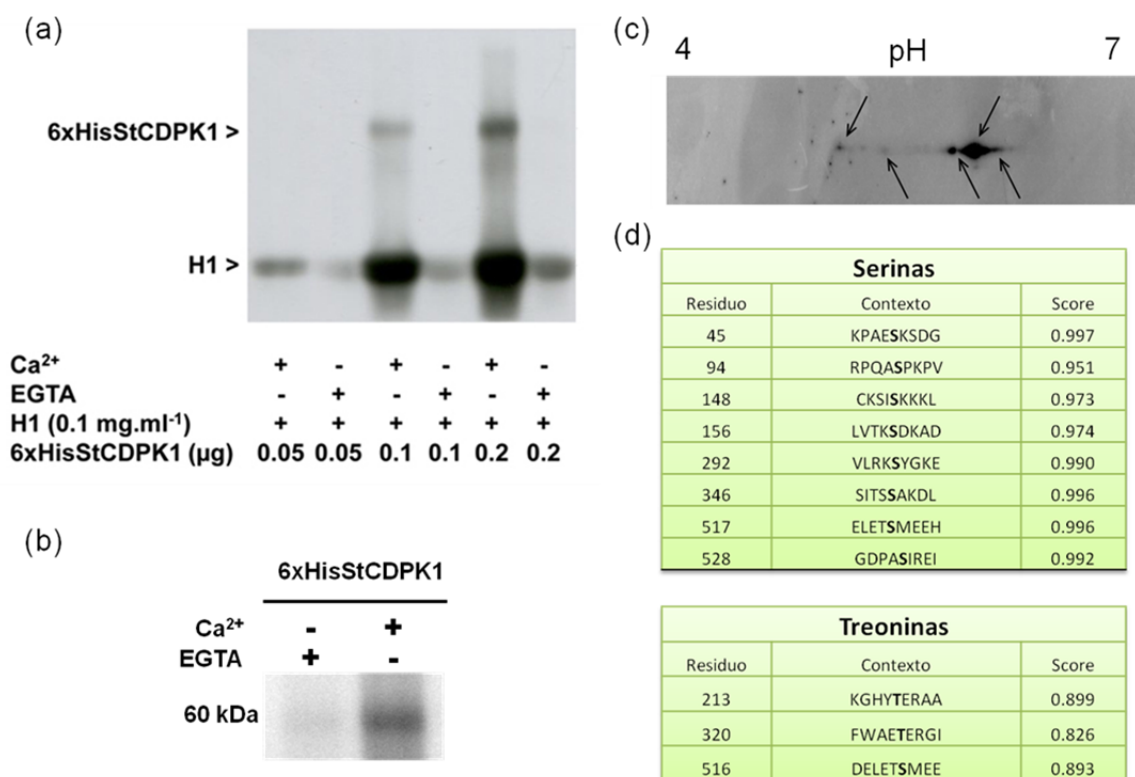
Se realizó un ensayo de actividad quinasa en presencia de 25  $\mu$ M calcio usando syntide-2 (50  $\mu$ M) como sustrato aceptor y concentraciones crecientes de la enzima purificada (Figura 3.1c). En los ensayos con inhibidores (Figura 3.1 d) y en las curvas de calcio y EGTA (Figura 3.1 e) se usaron 2ng/ $\mu$ l de 6xHisStCDPK1 (correspondiente a condiciones de velocidad inicial). La proteína recombinante se inhibe casi completamente en presencia del antagonista de calmodulina, clorpromazina (CPZ) y de 1 mM EGTA confirmando el requerimiento de calcio. En presencia de 1  $\mu$ M estaurosporina (ST), alcaloide que compite con el ATP por el sitio de unión en la quinasa, la actividad se redujo al 40%. El ensayo de actividad quinasa realizado en presencia de diferentes concentraciones de EGTA y calcio mostró que la enzima requiere muy bajas concentraciones de calcio (2,5  $\mu$ M) para alcanzar su completa activación.



**Figura 3.1 Obtención de la proteína recombinante 6xHisStCDPK1 y determinación de su actividad dependiente de calcio.** (a) estrategia de clonado (b) Geles SDS-PAGE teñido con Coomassie-Blue mostrando los lisados del cultivo no inducido (NI) e inducido (I); y la fracción eluida de la columna de níquel-agarosa; Western Blots con anticuerpos anti-polihistidina (1:5000) y anti-StCDPK1 (1:300). (c) Curva de concentración de StCDPK1, concentraciones crecientes de la enzima se incubaron durante 10 min con 25 μM syntide y 50 μM ATP frío y 10<sup>6</sup> cpm de ATP [γP<sup>32</sup>] en presencia de 25 μM calcio. (d) Curvas de calcio y EGTA; StCDPK1 (2 ng/μl) se incubó con concentraciones crecientes de calcio (panel derecho) o EGTA (panel izquierdo). (e) Actividad en presencia de inhibidores. ST: Estaurosporina; CPZ: Clorpromazina.

Se realizaron ensayos de actividad quinasa con Histona H1 como sustrato aceptor y ensayos de autofosforilación en geles SDS-PAGE (Figura 3.2 a y b). Como puede observarse, tanto la actividad quinasa como la autofosforilación de StCDPK1 dependen de la presencia de calcio y la enzima fosforilada es activa. El análisis de la proteína autofosforilada en geles bidimensionales y posterior revelado con el anticuerpo anti-poliHistidina (Figura 3.2c) mostró el “collar de perlas” característico de las proteínas fosforiladas en múltiples sitios. Coincidente con este resultado, el programa NetPhos 2.0 (Blom et al. 1999) predijo varios sitios de fosforilación en residuos serina o

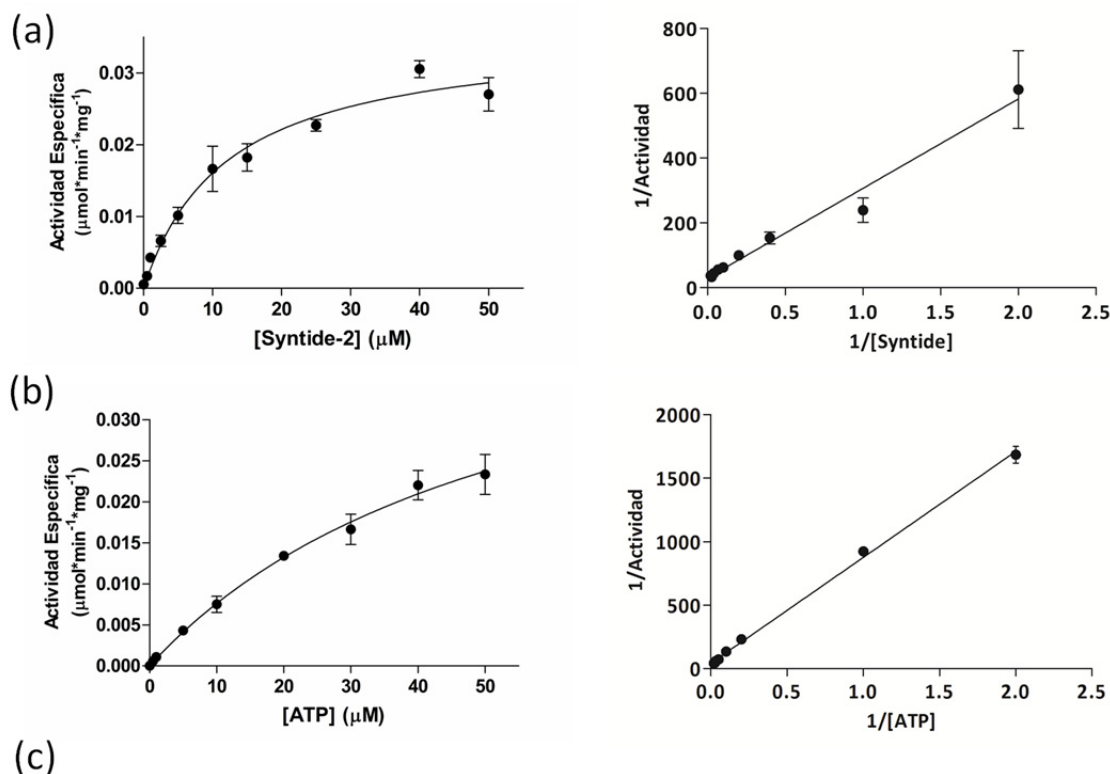
treonina con alto *score* (Figura 3.2d). El *spot* más básico coincide con el punto isoelectrico teórico (6,49) de la proteína predicho por Expasy. Las versiones fosforiladas de la proteína se electroenfocaron a pHs más ácidos.



**Figura 3.1 Ensayos de actividad quinasa y autofosforilación de la proteína recombinante 6xHisStCDPK1.** (a) Fosforilación de Histona H1 por 6xHisStCDPK1. La concentración de enzima e Histona se indican en la figura. (b) Autofosforilación de 6xHisStCDPK1 (2µg). En ambos casos las muestras se incubaron durante 5 min con 5µM ATP frío y  $3 \cdot 10^6$  cpm de ATP [ $\gamma P^{32}$ ] en presencia de 25µM calcio o 1 mM EGTA y se analizaron por SDS-PAGE 10% y posterior revelado por autorradiografía (c) Electroforesis bidimensional de 6xHisStCDPK1 (50µg) fosforilada con ATP frío en presencia de 25µM calcio. Luego de la corrida el gel se transfirió a nitrocelulosa y se reveló con anticuerpo anti-poli-histidina (1:5000). (d) Predicción de potenciales sitios de fosforilación en residuos serina o treonina presentes en StCDPK1 de acuerdo a NetPhos 2.0 (Blom et al. 1999)

Se determinaron los parámetros cinéticos,  $K_m$  y  $V_{máx}$ , de StCDPK1 recombinante para los sustratos aceptor (Syntide-2) y donador (ATP). La quinasa (2 ng/µl) se incubó con concentraciones crecientes de Syntide-2 (0-50 µM) y de ATP (0-50 µM) y se graficaron los valores de velocidad (actividad específica en  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) vs. concentración (Figura 3.3). Las curvas obtenidas se ajustan a una cinética de Michaelis-Menten. La velocidad aumenta a medida que se incrementa la concentración del sustrato. Esto ocurre hasta que se saturan todos los sitios activos. A partir de este momento se alcanza la velocidad máxima ( $V_{máx}$ ) que puede calcularse mediante el gráfico del doble recíprocos de Lineweaver-Burke ( $1/[\text{Sustrato}]$  vs  $1/\text{Actividad}$ ). A su vez, este gráfico permite el cálculo de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) que es la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la  $V_{máx}$ . La  $K_m$  da una idea de la afinidad de la enzima por el sustrato. Esta constante es inversamente proporcional a la afinidad. Es decir, a

menor  $K_m$ , mayor afinidad. La pendiente de la regresión lineal es igual a  $K_m/V_{m\acute{a}x}$ , la intersección con el eje Y corresponde al valor  $1/V_{m\acute{a}x}$  y la intersección con el eje X corresponde al valor de  $-1/K_m$ .

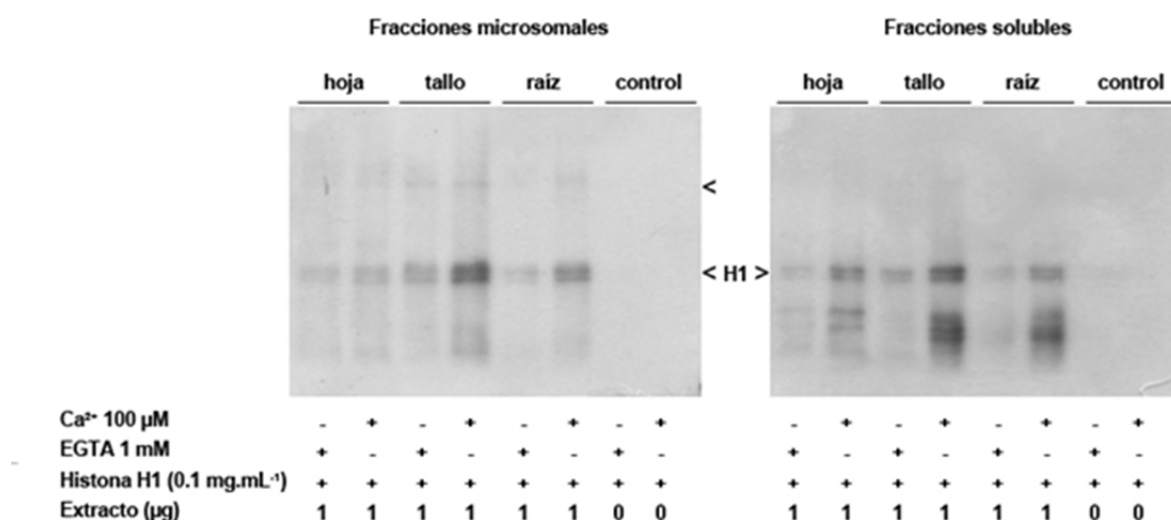


**Figura 3.2 Determinación de los parámetros cinéticos de 6xHisStCDPK1** (a). Curva de concentración de Syntide-2 ( $\mu M$ ) vs. actividad específica ( $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ ) (izquierda) y representación gráfica de la doble recíproca (derecha). (b). Gráfico de concentración de sustrato ATP ( $\mu M$ ) vs. actividad específica ( $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ ) (izquierda) y representación gráfica de la doble recíproca (derecha). (c) Tabla indicando los valores de  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_m$  para ATP y Syntide-2 determinados a partir de la cinética de Michaelis-Menten. Los valores de StCDPK2 y StCDPK3 se obtuvieron de Giammaria et al. (2011) y Grandellis et al. (2012). Los ensayo de actividad se realizaron por triplicado.

Los resultados indican que el  $K_m$  para ATP y Syntide-2 fueron  $19,7 \pm 0,03 \mu M$  y  $7,74 \pm 0,04 \mu M$  respectivamente (Figura 3.3). En la tabla inserta en la figura 3.3 se comparan estos valores con los obtenidos para las isoformas StCDPK2 y 3 (Giammaria et al., 2011; Grandellis et al., 2012). Es evidente que StCDPK3 presenta la mayor afinidad por ATP ( $3,3 \mu M$ ) mientras que los valores obtenidos para StCDPK1 y StCDPK2 son similares; a su vez, StCDPK2 presenta la mayor afinidad para el sustrato aceptor Syntide-2 ( $1,75 \mu M$ ). Los datos de  $V_{m\acute{a}x}$  de StCDPK1 y StCDPK3 son

similares, sin embargo StCDPK3 requiere una concentración 10 veces mayor de calcio para lograr la máxima activación.

Se decidió determinar la actividad CDPK en extractos proteicos solubles y particulados de hojas, tallos y raíces usando histona H1 como sustrato aceptor (Figura 3.4). En las condiciones del ensayo (100  $\mu$ M calcio, 25 $\mu$ M ATP) se podría detectar la actividad de cualquiera de las tres isoformas. Se observa actividad CDPK en las fracciones solubles de los tres órganos (panel derecho de la Figura 3.4). La fosforilación de histona H1 dependiente de calcio fue mayor en la fracción microsomal de tallos y raíces; no siendo significativa en hojas. Además en tallos y raíces se observa una banda fosforilada con un PM aparente de ~60 kDa que podría corresponder a una isoforma de CDPK autofosforilada (panel izquierdo de la Figura 3.4). Estos datos de actividad coinciden con la localización propuesta para la proteína StCDPK1 (Gargantini et al. 2009; Raices et al. 2003a) y con el hecho de que la actividad del promotor de StCDPK1 fue muy alta en tallos y raíces.



**Figura 3.3 Actividad CDPK en fracciones microsomales y solubles de hojas tallos y raíces.** Las concentraciones de calcio, EGTA, histona y extractos se indican en la figura. Las muestras se incubaron durante 5 min con 25 $\mu$ M ATP frío y 10<sup>7</sup> cpm de ATP [ $\gamma$ P32] y se analizaron por SDS-PAGE 10% y posterior revelado por autorradiografía

Las tres isoformas poseen diferentes parámetros cinéticos y varían los requerimientos de calcio para su actividad por lo que podrían encontrarse activas en la célula frente a diferentes señales de calcio. Esto concuerda con el concepto de que cada isoforma cumple una función celular específica y posee sustratos definidos.

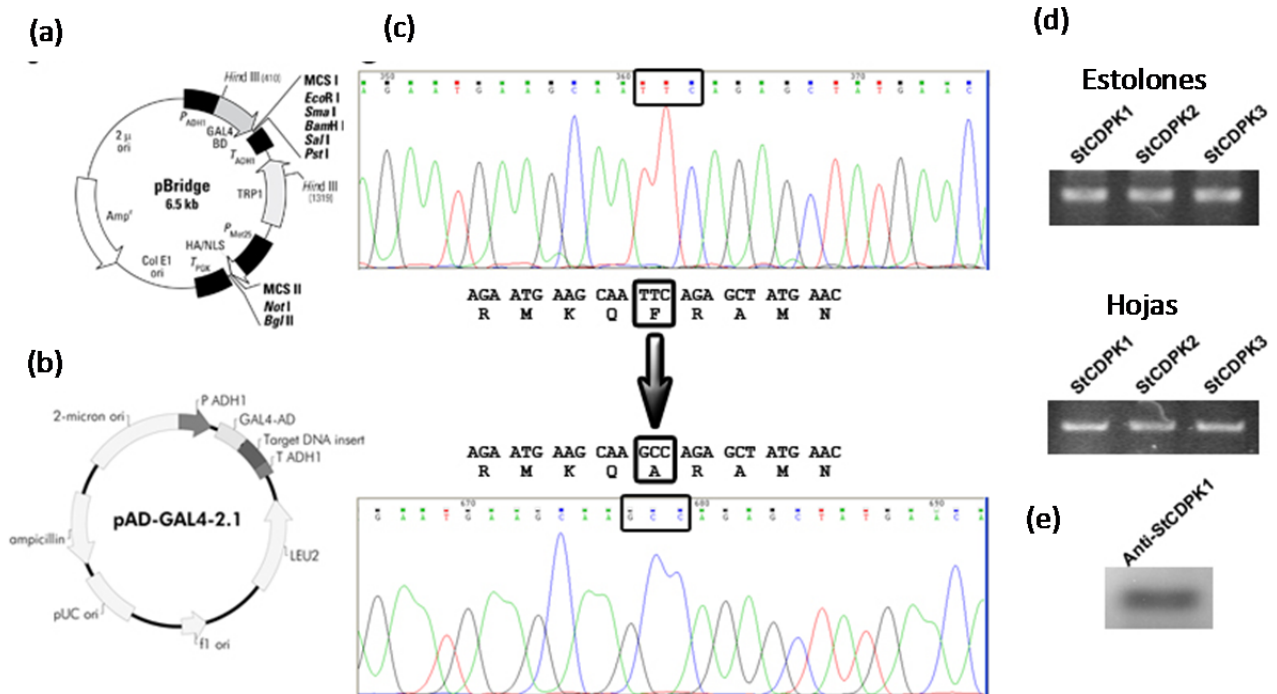
## Búsqueda de potenciales sustratos de StCDPKs por 2H

Sólo se podrá comprender la función de cada isoforma luego de aislar y caracterizar las proteínas que éstas regulan, para poder integrar los resultados bioquímicos y moleculares en un proceso fisiológico. Una de las áreas más importantes en el estudio de los sensores de calcio es identificar los blancos fisiológicos de estas proteínas. Se han empleado varias estrategias para aislar proteínas que interaccionen con CDPKs río arriba o río abajo; una de las más populares es la técnica de doble

híbrido (2H) en levaduras. El hallazgo de sustratos de CDPKs a través de esta técnica ha sido reportado previamente en diversas especies (Chehab et al. 2007; Patharkar & Cushman 2000; Rodríguez Milla et al. 2006; Uno et al. 2009; Zou et al. 2010). Se reportó que si se usaban como carnadas versiones mutantes de CPKs de *Arabidopsis* que eran constitutivamente activas (su actividad quinasa no dependía de la presencia de calcio) aumentaba significativamente el número de interacciones positivas (Uno et al. 2009).

Se decidió utilizar la técnica de 2H dado que en el laboratorio se contaba con bibliotecas de expresión de papa cedidas por la Dra. Salomé Prat (CNB, Madrid) que contenían los genes que se expresan en hojas y estolones clonados en el vector pADGAL4-2.1 en marco con el dominio activador de la transcripción de GAL4 (GAL4-AD). Este vector, contiene el gen LEU2 que revierte en levaduras la auxotrofia a la Leucina. Se verificó la presencia de las tres isoformas en ambas bibliotecas por PCR (Figura 3.5). Se realizó una mutagénesis dirigida en las tres isoformas StCDPK1, StCDPK2 y StCDPK3 para obtener las versiones constitutivamente activas. Para ello se sustituyó una fenilalanina conservada en el dominio autoinhibitorio por una alanina, un aminoácido de poco volumen y poco reactivo. Se confirmó la mutagénesis por secuenciación y las versiones mutadas se clonaron en el vector pBridge en marco con el dominio de unión a DNA del gen GAL4 (GAL4-BD). Este vector, tiene además, el gen TRP1, que revierte la auxotrofia al triptófano en levaduras. Se transformaron las levaduras con las carnadas y en los extractos se confirmó la producción de la proteína de fusión StCDPK1-GAL4BD por Western blot (Figura 3.5).

Tras ello, se realizó la transformación con las bibliotecas de hojas y estolones para cada isoforma y se plaquearon en el medio selectivo correspondiente. Aunque las eficiencias de transformación fueron adecuadas ( $\sim 10^8$  cfu/ $\mu$ g ADN) no se encontraron interacciones positivas. Este resultado pudo deberse a que, aun siendo constitutivamente activas, la interacción de estas isoformas con sus sustratos no es lo suficientemente estable como para posibilitar su detección a través de esta técnica.



**Figura 3.4 Estrategia de 2H.** Se muestran los vectores de clonado (a y b) y la mutagénesis dirigida (c). Se verificó la presencia de las StCDPKs 1, 2 y 3 por PCR en las bibliotecas de expresión de estolones y hojas (d). Se verificó la proteína de fusión StCDPK1 en las levaduras transformadas con la carnada (e).

### Evaluar la capacidad para fosforilar sustratos de CDPKs heterólogos identificados en otras especies.

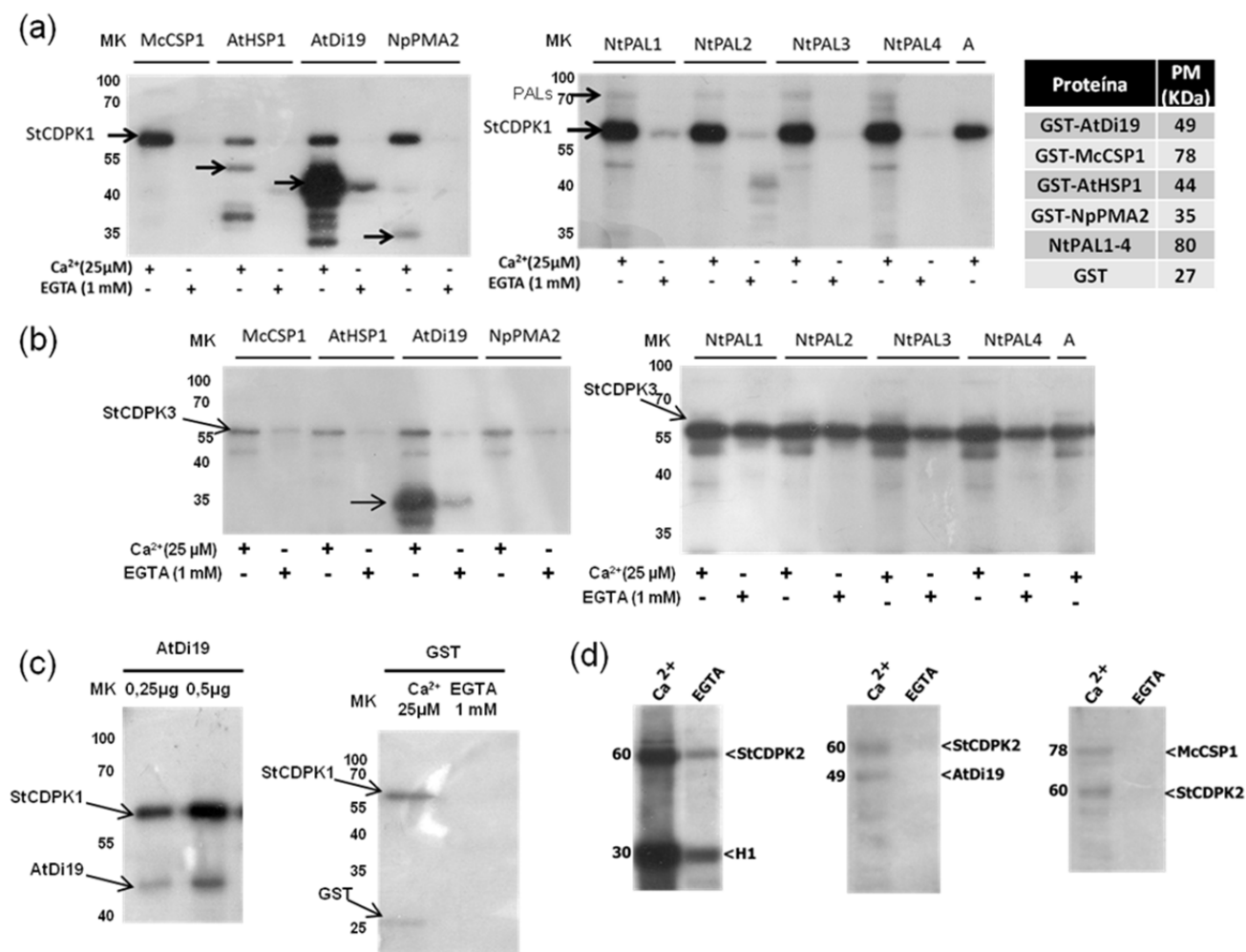
Para intentar alcanzar el objetivo propuesto se decidió emplear otra estrategia. Se ha sugerido en varios reportes que el dominio NTV de las CDPKs, sería el responsable del reconocimiento y la interacción con el sustrato, acercando el mismo al sitio activo para permitir la fosforilación (Curran et al. 2011; Ito et al. 2010). Esto es lógico ya que el resto de la secuencia de las CDPKs está altamente conservado como para conferirle a las CDPKs la especificidad por sus sustratos. Alineamientos de secuencia de las StCDPKs en estudio con CDPKs de otras especies han revelado altos porcentajes de identidad en las secuencias N-terminales por lo que posiblemente posean sustratos similares y cumplan funciones semejantes. Por esto, como nueva estrategia se decidió ensayar la capacidad de las isoformas recombinantes de papa para fosforilar *in vitro* sustratos de CDPKs conocidos de otras especies y proceder posteriormente al clonado y fosforilación de los genes homólogos de papa. Esta estrategia fue empleada con éxito para identificar al factor de transcripción RSG como sustrato de StCDPK3 (Tesis doctoral de C. Grandellis, 2011). Se contactaron diversos grupos de investigación que gentilmente nos enviaron los plásmidos para expresar las siguientes proteínas recombinantes que se reportó podían ser sustrato de CDPKs (Tabla 3.2):

**Tabla 3.2 Proteínas recombinantes solicitadas a diferentes grupos de investigación**

| Sustrato      | Etiqueta | CDPK        | Función                                                                          | Especie                   | Referencia                    |
|---------------|----------|-------------|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| McCSP1        | GST      | McCDPK1     | Factor de transcripción pseudo-regulador de respuesta en alta salinidad y sequía | <i>M. crystallinum</i>    | (Patharkar & Cushman 2000)    |
| AtDi19        | GST      | AtCPK4 y 11 | Factor de transcripción tipo zinc-finger que se induce por sequía                | <i>A. thaliana</i>        | (Rodríguez Milla et al. 2006) |
| AtHSP1        | GST      | AtCPK10     | Proteína de <i>shock</i> térmico                                                 | <i>A. thaliana</i>        | (Zou et al. 2010)             |
| NpPMA2 C-term | GST      | OsCDPK      | H <sup>+</sup> -ATPasa                                                           | <i>N. plumbaginifolia</i> | (Jelich-Ottmann et al. 2001)  |
| NtPAL1-4      | 6xHis    | AtCPK1      | Fenilalanina-amonio liasa                                                        | <i>N. tabacum</i>         | (Reichert et al. 2009)        |

Se indica el sustrato, la etiqueta, la función y la especie a la que pertenece. La cita corresponde al grupo que nos envió la proteína recombinante. Se menciona la isoforma de CDPK para la que se demostró la fosforilación. En arroz, una CDPK de 55 kDa fosforila el dominio C-terminal de la H<sup>+</sup>-ATPase PMA2 (Ookura et al. 2005) que es similar a la PMA2 de *N. plumbaginifolia* (Ottmann et al. 2002). Además nos enviaron los plásmidos de varias proteínas fenilalanina-amonio liasa (PAL) de *N. tabacum* (Reichert et al. 2009) dado se reportó que AtCPK1 fosforilaba estas proteínas en protoplastos de maíz (Cheng et al. 2001).

Se realizó un primer paneo de sustratos usando la StCDPK1 recombinante como fuente de enzima. Se transformaron bacterias *E. coli* BL21 Rosetta 2 con los plásmidos enviados y se indujo la expresión de las proteínas con 1 mM IPTG; las proteínas que estaban etiquetadas con GST se purificaron empleando columnas de Glutathione Sepharose® 4B mientras que las proteínas PAL etiquetadas con 6xHis se purificaron con columnas de níquel-agarosa. En todos los casos se confirmó la purificación de los sustratos en ensayos de Western blot con anticuerpos anti-GST o anti-polihistidina (dato no mostrado). El ensayo de fosforilación se hizo en presencia de 25  $\mu$ M calcio o 1 mM EGTA usando 4  $\mu$ g de cada sustrato purificado y 125 ng de enzima; las muestras se analizaron por SDS-PAGE 12% y posterior revelado por autorradiografía. Como puede observarse en la figura 3.6a, la fosforilación de AtDi19 por StCDPK1 fue la más intensa; además pudo fosforilar a AtHSP1 y NpPMA2 pero no a McCSP1. A su vez fosforiló muy pobremente a las proteínas PAL. En todos los casos se observa que tanto la actividad enzimática como la autofosforilación son dependientes de calcio. En paralelo se repitió el experimento usando la proteína StCDPK3 como fuente de enzima (Figura 3.6b). A diferencia de StCDPK1, StCDPK3 no logró fosforilar a NpPMA2 o a HSP1; tampoco pudo fosforilar a McCSP1 pero si fosforiló a AtDi aunque con menor intensidad; la fosforilación de las PAL fue también casi indetectable. En el caso de StCDPK3 se observa que la enzima se autofosforila tanto en ausencia como en presencia de calcio; este hecho ya fue observado previamente (Grandellis et al. 2012). Se repitió la fosforilación de AtDi19 por StCDPK1 usando menores concentraciones de sustrato y se incluyó un control para verificar que la quinasa no esté fosforilando a la etiqueta de GST presente en las proteínas usadas como sustrato (Figura 3.6c). La fosforilación de GST fue muy débil indicando que la fosforilación observada en los sustratos es específica. En otro experimento se analizó la fosforilación de AtDi19 y de McCSP1 por la 6xHisStCDPK2, usando los extractos de los cultivos inducidos como sustrato. La fosforilación del AtDi fue mucho menor y a diferencia de las otras isoformas, 6xHisStCDPK2 logró fosforilar a McCSP1 (Figura 3.6d). Estos resultados indican que cada isoforma fosforilaría sustratos de manera preferencial.



**Figura 3.5 Ensayos de fosforilación *in vitro* de sustratos demostrados para otras CDPKs.** Fosforilación de diferentes sustratos por 6xHisStCDPK1 (a) y 6xHisStCDPK3 (b). Las muestras se incubaron durante 5 min con 25 μM ATP frío y  $10^7$  cpm de ATP [ $\gamma P^{32}$ ] en presencia de 25 μM calcio o 1 mM EGTA y se analizaron por SDS-PAGE 12% y posterior revelado por autorradiografía. En todos los casos se usó 100 ng enzima y 4 μg de los sustratos purificados. Las flechas indican la banda correspondiente a cada sustrato o a las isoformas autofosforiladas. En el margen superior derecho se incluyó una Tabla con los PM esperados de los sustratos recombinantes (c) Ensayos de fosforilación de AtDi19 purificado (0,25 y 0,5 μg) y GST sólo (2 μg) por StCDPK1 (d) fosforilación de Histona H1 (4 μg), AtDi19 y McCSP por 6xHisStCDPK2 (100 ng). Las condiciones de ensayo fueron las mismas pero en este caso se usaron los extractos (50 μg) de los cultivos inducidos.

### Análisis de posibles sustratos de StCDPK1 en papa

En *Arabidopsis*, AtDi19-1 (*drought induced*) forma parte de una familia de siete miembros de proteínas Cys2/His2-tipo zinc-finger. Cinco de los miembros están preferentemente localizados en el núcleo; AtDi19-1 y AtDi19-3 se inducen por deshidratación mientras que AtDi19-2 y AtDi19-4 aumentan en respuesta a alta sal, sin embargo la mayor parte no son inducidos por ABA. Se demostró que frente a condiciones de sequía AtDi19-1 se une a los elementos TACA(A/G)T en los promotores de las proteínas de patogénesis PR1, PR2 y PR5 e induce su transcripción (Liu et al. 2013b). A su vez, se demostró que la isoforma CPK11 de *Arabidopsis* fosforila a AtDi19 en la

treonina 105 y la serina 107 en la señal bipartita de localización nuclear (Rodríguez-Milla et al., 2006) y aumenta de este modo la expresión de las proteínas PR que participan en la resistencia a sequía (Liu et al. 2013). Recientemente se demostró que AtDi19-3 también está involucrado en la respuesta de la planta a ABA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Mutantes AtDi19-3 T-DNA tienen mayor tolerancia a sal/estrés osmótico y ABA pero son más sensibles al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la germinación de la semilla y el desarrollo temprano de las plántulas mientras que plantas sobreexpresantes de AtDi19-3 presentan el fenotipo opuesto (Qin et al. 2014). Una búsqueda en el genoma de papa indicó que hay nueve homólogos del AtDi19, el de mayor homología corresponde a la proteína PGSC0003DMP400042950 que según NetPhos 2.0 contiene seis serinas (*scores*: 0,979; 0,997; 0,985; 0,992; 0,998 y 0,982) y una treonina (*score* 0,865) con alta probabilidad de ser fosforiladas. Cabe señalar que si bien AtDi19 y StDi19 presentan sólo 50% de identidad de secuencia (113/228) y 66% de positivos (151/228), los residuos fosforilados reportados en AtDi19 están conservados en StDi19 (Figura3.7).



**Figura 3.6 Comparación entre AtDi19 y su homólogo de papa, StDi19.** Estructura de AtDi19 (Rodríguez-Milla et al., 2006). Las serinas (S) y treoninas (T) predichas por NetPhos 2.0 se indican en rojo y se subraya el contexto aminoacídico; las S y T fosforiladas por AtCPK11 pertenecientes a la NLS-NES de AtDi (Rodríguez-Milla et al., 2006) se indican en verde y recuadro. Estos residuos están conservados en StDi19

Considerando que el promotor de StCDPK1 contiene numerosos elementos de respuesta a estrés asociados a frío, sequía y sal, la localización en raíces de la quinasa, antecedentes previos que sugieren su vínculo con el estrés osmótico (Raices et al. 2003c) y la intensa fosforilación observada en el AtDi19 se decidió clonar el homólogo de papa del factor de transcripción para estudiarlo como sustrato.

Por otro lado, con el fin de comprender el papel que StCDPK1 podría desempeñar en la tuberización se decidió producir otras dos proteínas recombinantes, StPIN4 y StSP6A que

(a)

MITWHDLYVVLTAVVPLYVAMILAYGSVRWWKIFSPDQCSGINRFVAIFAVPLLSFHFIAMNNPYEMNFRFIAADSLQKV  
IMLVLSLWANLTKNGSLEWSITIFSLSTLPNTLVMGIPILLIAMYGEYSGSLMVQVVVLQCIIWYTLTLLFLFEYRGAKML  
IMEQFPETAASIVSFKVESDVVSLDGHDFLETDAEIGQDGKLHVTVRK**SNASRRSFAMDHRSNLT**GAEIYSLSSSRNP  
**TPRGSIF**FNHNDFY**YS**MMGFPGGRLSNFGPADMY**SVQSSRGP****TPRPSN**FEENCAPGGLVQSS**SP**RFGYFFAQQPAPGSYPAP  
NPEISSAVPK**STK**PQQPNVQ**TQ**KQEVQQQQQQQQQPNAKANNHDAKELHMFVWSSSN**SPV**SEAGGLHVFPGGNDFSANE  
QSGR**SD**GAKEIRMLVSDHTQNGDSKAIPTQGEFGGEDFTFGGANGGGKDGDEEKEKEGPTGLTKLGSSST**SEL**HPKLA  
GGQDAGMGKQMPASVATRLILIMVVRKLIRNPNTYSSLIGLIWSLISFRWHVHMPKIIIEKSISILSDAGLGMAMFSLGL  
FMALQPKIIACGNVTATFAMAVRFLTGPVAMAAASIAVGLRGTLTLHVAIVQALPQGIVPFVFFAKEYNVHPAILSTAVIF  
GLMILPITLVYYIILGL

| Serinas    |             |              |
|------------|-------------|--------------|
| Posición   | Contexto    | Score        |
| 212        | KSNASRRSF   | 0.990        |
| 235        | YLSSSRNPN   | 0.986        |
| 276        | SVQSSRGPT   | 0.965        |
| 284        | TPRP\$NFEE  | 0.959        |
| 299        | LVQSSPRFG   | 0.986        |
| 329        | AVPKSTKPKQ  | 0.991        |
| 380        | NSPVSEAGG   | 0.972        |
| 402        | QSGRSDGAK   | 0.958        |
| 467        | LGSSSTSEL   | 0.989        |
| 469        | SSSTSELHP   | 0.938        |
| Treoninas  |             |              |
| Posición   | Contexto    | Score        |
| <b>240</b> | SRNP\$TPRGS | <b>0.984</b> |
| <b>280</b> | SRGPTPRPS   | <b>0.993</b> |
| <b>339</b> | PNVQTQKOE   | <b>0.951</b> |

73

resaltado en gris en el dominio M3 reemplaza a una treonina conservada. Las regiones transmembrana están resaltadas en fondo gris. (b) Tabla de las serinas y treoninas predichas indicando la posición, el contexto y el score. Sólo se mencionan aquellas con score>0,95.

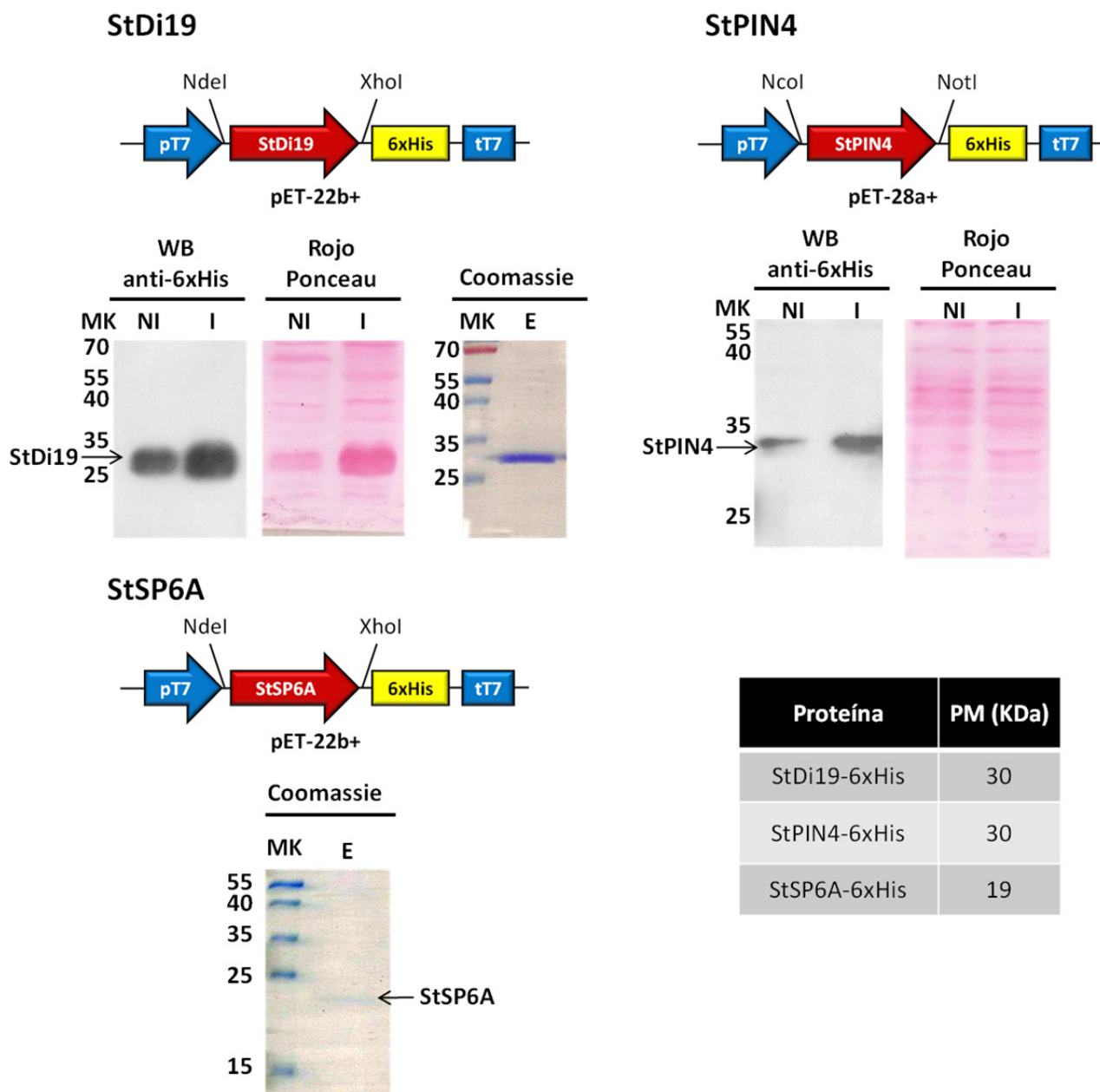
SP6A es homóloga de flowering locus T, y se demostró que controla la inducción de la tuberización (Navarro et al., 2011). En papa se ha reportado que existen nueve miembros de la familia FT/TFL1, de estas proteínas, estudios filogenéticos agrupan a StSP6A, StSP5G, StSP5G-like y StSP3D en el mismo clado que el FT de *Arabidopsis*, el SFT (*single flower trust*) de tomate y el Hd3a de arroz reportados como señales móviles inductoras de la floración. Se obtuvo la secuencia de la proteína SP6A a partir del genoma de papa (PGSC0003DMP400040404) y se analizó si presentaba sitios de fosforilación. Esta proteína de 19 kDa (Figura 3.9) presenta tres serinas (scores=0,995; 0,996 y 0,997) y una treonina (score= 0,978) que podrían ser fosforiladas (NetPhos. 2).

```
>PGSC0003DMP400040404
MPRVDPLIVGRVIGDVLDPFTRSVDLRVVYNNKDVNNACVLKPSQVVMQPRVHIGGDDL
NFYTLIMVDPDAPSPSDPNLREYLHLVTDIPATTNTSFGNEVVCYENPTPTMGIHRFVL
VLFRQSRRETTVYAPGWRQNFNTRDFAELYNLGLPVAAVYFNSHRESGTGGRR*
```

**Figura 3.8 Secuencia de la proteína StSP6A de papa.** En rojo se muestran las tres serinas y la treonina que podrían ser fosforiladas

Los transcriptos de papa de los genes SP6A, StDi19 y StPIN4 se amplificaron a partir de una biblioteca de expresión de estolones con oligonucleótidos que contenían sitios de restricción adecuados para su posterior clonado en los vectores de expresión en bacterias. Los amplicones obtenidos para cada gen se subclonaron en el vector pGEMT-easy (Promega) y se confirmaron por secuenciación. Seguidamente se liberaron los insertos con las enzimas correspondientes y se clonaron en los vectores de expresión. Los homólogos de papa StSP6A y StDi19 se introdujeron en el vector pET22b+, mientras que para StPIN4 se utilizó pET28a+. En los tres casos, la proteína resultante quedaría etiquetada en su extremo C-terminal con 6 histidinas.

Se transformaron bacterias *E. coli* BL21 *shuffle* con los plásmidos conteniendo los constructos StDi19, StSP6A y StPIN4 (bucle hidrofílico) etiquetados con 6xHis y se indujo la expresión de las proteínas con 1 mM IPTG. Como se observa en la Figura 3.10 se obtuvieron las proteínas recombinantes StDi19 y StPIN4 etiquetadas con 6xHis pero al intentar purificarlas se comprobó que quedaron retenidas en cuerpos de inclusión. Se realizó el protocolo de extracción con 8M urea y posterior purificación en columnas de níquel-agarosa de acuerdo al protocolo de QIAexpressionist. En el caso de la proteína StSP6A se detectó una banda del PM esperado en los extractos inducidos que no estaba presente en el cultivo no inducido (dato no mostrado), esta banda luego se purificó por la columna de Níquel-agarosa indicando la presencia de las 6xHis (Figura 3.10c); falta sin embargo la confirmación por Western blot.



**Figura 3.9 Producción de proteínas recombinantes StDi19, StPIN4, StSP6A.** Se muestra la estrategia de clonado y el análisis por SDS-PAGE. Los extractos de los cultivos inducidos y no inducidos de StDi19 y StPIN4 se analizaron por Western blot (WB) con anticuerpo anti-polihistidina (1:5000); se muestran las membranas de nitrocelulosa teñidas con rojo Ponceau. Además se muestra el Coomassie Blue del eluido de la columna de níquel-agarosa de StDi19 y de StSP6A. En la Tabla inserta se detallan los PM esperados. La banda observada en los cultivos no inducidos se debe a una expresión basal (*leaky*).

Para realizar el ensayo de fosforilación se debía eliminar previamente la urea; para ello se precipitaron los extractos con 10%TCA en acetona y luego de lavar con acetona se resuspendieron los *pellets* en 20 mM Tris-HCl pH 7,5. Este procedimiento tuvo bajísimo rendimiento por lo que actualmente se está optimizando la obtención de las proteínas recombinantes para poder realizar los ensayos de fosforilación.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

---

- ✓ StCDPK1 está asociada al tejido vascular de la planta y muestra una fuerte expresión en raíces, en estolones tuberizantes, en la porción superior del tallo y en yemas axilares. La actividad CDPK detectada en extractos microsomales de tallos y raíces puede atribuirse parcialmente a esta isoforma.
- ✓ StCDPK1 es regulada post-transcripcionalmente por miR390. La expresión de StCDPK1 durante la transición estolón-tubérculo es dinámica y se observa una correlación inversa entre los niveles de transcritos de StCDPK1 y miR390 en estadios de tuberización y minitubérculos. Se puede proponer que miR390 modula la expresión de StCDPK1 durante el desarrollo del tubérculo degradando los transcritos de la quinasa. Como fuera mencionado previamente otros miRNAs intervienen en la tuberización regulando la expresión de otros actores de este proceso.
- ✓ La expresión de StCDPK1 durante el desarrollo del tubérculo coincide con la del transportador de eflujo de auxinas StPIN4.
- ✓ La obtención de la proteína recombinante 6xHisStCDPK1 permitió la caracterización de sus constantes cinéticas y sus requerimientos de calcio. Se demostró que StCDPK1 es una quinasa de proteínas activa, dependiente de calcio y capaz de autofosforilarse en múltiples residuos.
- ✓ StCDPK1 es capaz de fosforilar *in vitro* al factor de transcripción AtDi19.
- ✓ StCDPK2 se expresa fuertemente en: hojas, yemas axilares, la porción superior de tallo, ápices radiculares y en los primordios de raíces laterales. Dado que el promotor de StCDPK2 presenta varios elementos de respuesta a auxinas, hormona involucrada en el desarrollo de raíces se podría proponer que participa de este proceso.

Los resultados presentados en esta tesis abren varias perspectivas sobre las posibles funciones asociadas a StCDPK1 y StCDPK2 que sería interesante explorar. Considerando estos resultados y datos previos del laboratorio que indican que StCDPK1 aumenta en condiciones de estrés osmótico (Raices et al., 2003) y en respuesta a ABA (Gargantini et al., 2009) unido a su homología (98%) con la isoforma NtCDPK15 de tabaco (Figura C.1) que se induce fuertemente en raíces y hojas en condiciones de alta sal (NaCl 200 mM) y ABA (100  $\mu$ M) y se reprime en sequía (20% PEG 6000) permiten proponer que StCDPK1 participaría en la respuesta a estreses abióticos (Le et al. 2013).

StCDPK1 MGVCLSKSKPAESKSDGHRSGGSDGGVGKGKHNHGHQAQIQYTKSPGPETQLPLRPQ  
 NtCDPK15 MGICLSKTKPAESKSNHGHRSGGSGG-----PHQTQIQYTKSPGPESQLPMRPS  
 \*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*:..\*\* .\*\*:\*~\*\*\*\*\*:\*\*\*:~\*\*

StCDPK1 ASPKPVFKQETILGKAFEDVKAHYTLGKELGRGQYGVTFCLCTEIATGHQYACKSISKKKL  
 NtCDPK15 ASPKPVFKQETILGKPFEDVKAYITLGKELGRGQFGVTFCLCTEIATGHQYACKSISKKKL  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Fig.C1 Homología de secuencia entre StCDPK1 y NtCDPK15. En verde se destaca el dominio NTV

Para comprobar la función de StCDPK1 en proceso de desarrollo y en respuesta a señales de estrés abiótico se obtuvieron plantas transgénicas de papa que sobreexpresan esta isoforma. Las plantas fueron transformadas con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 que portaba el vector binario pGWB408 conteniendo la secuencia codificante de StCDPK1, fusionada a 6xHis en el extremo C-terminal, bajo el promotor 35S. Se realizaron ensayos de PCR para detectar la presencia del constructo y se detectó la proteína StCDPK16xHis en extractos de la líneas transgénicas mediante Western blot con un anticuerpo anti-polihistidina. Además en ensayos de RT-qPCR normalizados con GAPDH o el factor de elongación 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) se observó que en las líneas C y F la expresión de StCDPK1 fue 2 y 4 veces o 5 y 7 veces mayor que en las plantas no transformadas (Figura C2). Las plantas mostraron un fenotipo normal.

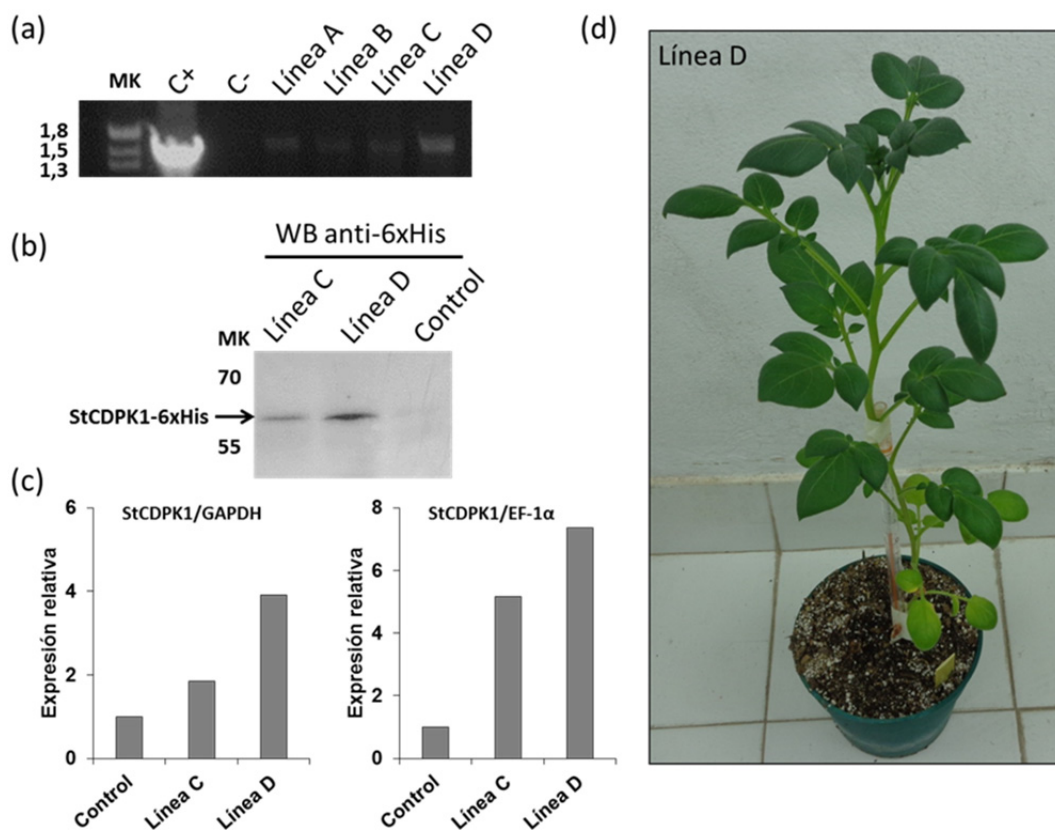


Figura 0-I. Producción de plantas transgénicas sobreexpresantes de StCDPK1. (a) Confirmación de la presencia del transgén (b) Detección de la proteína StCPK16xHis por Western blot con anti-polihistidina (1:5000) (c) Expresión relativa del transgén con respecto al endógeno, los valores se normalizaron respecto a GAPDH o EF-1 $\alpha$  (d) Planta transgénica

Próximamente se evaluará la respuesta de estas plantas a estímulos tuberizantes y la tolerancia de las líneas a diferentes tipos de estreses abióticos. La hipótesis subyacente es que para responder adecuadamente a las presiones del medio la planta debe actuar con celeridad y su sistema de vigilancia debe estar alerta. Las CDPKs se activan en segundos o minutos luego de que las plantas sean expuestas a señales adversas bióticas o abióticas e inducen respuestas defensivas locales que incluyen cambios en los patrones de expresión génica. Estas enzimas pueden regular tanto la respuesta local como la sistémica; por un lado permiten la propagación del estímulo desde la membrana plasmática de la célula local a regiones distales de la planta, por el otro actúan regulando la actividad y localización nuclear de factores de transcripción. Su sobreexpresión podría brindar una segunda línea de vigilancia teniendo en cuenta que para ser activas requieren el estímulo de calcio. Este proyecto tiene el doble propósito de avanzar en la comprensión del papel de StCDPK1 en procesos de estrés y de evaluar si su sobreexpresión puede ser beneficiosa en términos de productividad.

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## Cepas bacterianas

### *Escherichia coli*

#### ➤ **Condiciones de cultivo**

Se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  para los clonados. Para la producción de proteínas recombinantes se emplearon las cepas BL21 codon plus, BL21 Shuffle y BL21 Rosetta 2. Los cultivos líquidos se crecieron a 37°C en medio LB (peptona de triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, y NaCl 5 g/L) con agitación a 220 rpm durante 16 hs. Los cultivos sólidos se crecieron en placas de Petri a 37°C en medio LB adicionado con 1.5 % de agar. El medio se suplementó con antibióticos de acuerdo a la resistencia otorgada por cada plásmido y en las siguientes concentraciones: ampicilina 100  $\mu$ g/ml, kanamicina 50  $\mu$ g/ml

#### ➤ **Transformación de células competentes de *E. coli* por shock térmico.**

#### **Preparación de células termo-competentes de *E. coli*.**

A partir de una colonia aislada se preparó un cultivo *overnight* de LB líquido de 5 ml durante 16 hs. Se inocularon 100 ml de LB líquido con 4 ml de ese cultivo, se incubó a 37° hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub>= 0,4. El cultivo se incubó a 4°C durante 5 minutos y se centrifugó a 1900 x g durante 5 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió suavemente en 40 ml de solución TFB I a 4°; se centrifugó a 1900 x g durante 5 minutos a 4°C y el precipitado se resuspendió en 4 ml de solución TFB II fría. Se incubó en hielo durante 15 minutos, se separaron alícuotas de 50  $\mu$ l en tubos *ependorf* y se congeló en nitrógeno líquido. Las células competentes fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

| TFB I                          | TFB II                        |
|--------------------------------|-------------------------------|
| Acetato de Potasio 30 mM       | MOPS 10 mM                    |
| RbCl <sub>2</sub> o KCl 100 mM | RbCl <sub>2</sub> o KCl 10 mM |
| CaCl <sub>2</sub> 10 mM        | CaCl <sub>2</sub> 75 mM       |
| MnCl <sub>2</sub> 50 mM        | Glicerol 15 %                 |
| Glicerol 15 %                  |                               |

Se ajusta a pH 6,5 con KOH 1 M. Se ajusta a pH 5,8 con ácido acético 0,2 M

#### **Transformación de células termo-competentes de *E. coli*.**

A 50  $\mu$ l de células competentes en hielo se adicionaron 100 ng de plásmido o reacción de ligación durante 30 min. Luego se realizó un *shock* térmico a 42° C durante 1 min. Transcurrido este tiempo

se incubó nuevamente en hielo durante 2 min. Se agregó 1 ml de medio LB líquido y se incubaron las bacterias a 37° durante 1 hora con agitación. Se sembraron placas de LB solido con el antibiótico correspondiente.

## ***Agrobacterium tumefaciens***

### ➤ **Condiciones de cultivo**

Se utilizaron las cepas GV3101 y LBA4404.

| Cepa    | Resistencia Plásmido Ti    | Resistencia cromosómica |
|---------|----------------------------|-------------------------|
| GV3101  | Gentamicina (50 µg/ml)     | Rifampicina (50 µg/ml)  |
| LBA4404 | Estreptomicina (100 µg/ml) | Rifampicina (50 µg/ml)  |

Los cultivos de *A. tumefaciens* crecieron en el medio LB líquido a 28°C con agitación a 200 rpm y en oscuridad durante 48 hs.

### ➤ **Transformación de células competentes de *A. tumefaciens***

#### **Preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens***

Una colonia aislada de *A. tumefaciens* se sembró en 5 ml de medio LB con los antibióticos correspondientes (Rifampicina en todos los casos y otro dependiendo del plásmido Ti que contenían) y se cultivó durante 16 hs a 28°C a 200 rpm. Se utilizó como inóculo de un cultivo de 200 ml que se creció hasta alcanzar una  $DO_{600nm} = 0,5$ . El cultivo se centrifugó a 1100 x g durante 15 min a 4°C. El *pellet* se resuspendió suavemente a 4°C en 200 ml de agua destilada esterilizada por autoclave. Se generaron alícuotas de 50 µl y se congelaron en nitrógeno líquido. Las alícuotas de bacterias competentes fueron almacenadas a -70°C.

#### **Transformación de células competentes de *A. tumefaciens***

Se descongeló una alícuota conteniendo 50 µl de la preparación de células de *A. tumefaciens* competentes y se mantuvo en hielo. Se agregó 50-100 ng de ADN plasmídico y se mezcló suavemente. Las células se transfirieron a una cubeta de electroporación con tamaños de vidrio 1-2mm. Se ajustó el *Gene Pulser* a 2.5 KV y el CAP a 25 µFD. La resistencia fue de 400 Ohm en el Pulse Controller Unit. Se introdujo la cuba en el equipo y se realizó un pulso hasta escuchar el tono que indica que se logró el pulso deseado. Se agregó 1 ml de medio LB inmediatamente en la cubeta de electroporación y se colocó en hielo. Se transfirió el contenido de la cubeta a un tubo falcon de 15 ml y se incubó en agitación constante a 28°C durante 1-2 hs. Se sembró en medio selectivo (conteniendo Kanamicina y Rifampicina) y se incubó a 28°C durante 48 hs.

Se transformaron las cepas GV3101 y LBA4404 con el plásmido binario pBI101 conteniendo el promotor del gen StCDPK1 o StCDPK2 fusionado al gen reportero glucuronidasa (GUS). El plásmido

posee el gen de resistencia NPTIII que permite la selección de las plantas con kanamicina. Para clonar el promotor de StCDPK1 en pBI101 se utilizaron los sitios de restricción *Sall* y *Xmal* del Sitio de Clonado Múltiple (SCM). En el caso del promotor de StCDPK2 se utilizaron los sitios *XbaI* y *XmaI*.

## **Material vegetal**

Se utilizaron plantas de papa *S. tuberosum* ssp *tuberosum* var Spunta (libres de virus, Diagnósticos Vegetales, Mar del Plata) y *S. tuberosum* L var. Desirée. Durante el transcurso de esta tesis se obtuvieron plantas de papa *S. tuberosum* L var. Desirée que expresan el gen reportero B-glucuronidasa (GUS) bajo el promotor de StCDPK1 (plantas CPK1pro::GUS) y bajo el promotor de StCDPK2 (plantas CPK2pro::GUS). Asimismo se propagaron las plantas CPK3pro::GUS previamente obtenidas en el laboratorio (Tesis Doctoral Carolina Grandellis, 2012).

Además se obtuvieron plantas transgénicas de papa *S. tuberosum* L var. Desirée que sobreexpresan las isoformas StCDPK1, 2 y 3 etiquetadas con 6 histidinas en el C-terminal de la proteína.

Se utilizaron plantas de *Nicotiana benthamiana* cultivadas en tierra durante 6 semanas para los ensayos de agroinfiltración.

## **Cultivo in vitro**

### ➤ ***Multiplicación***

Las plantas fueron micropropagadas *in vitro* en medio de multiplicación MS utilizando porciones del tallo que contengan yemas meristemáticas. Las plantas se colocaron en tubos de vidrio con tapones de gasa y algodón autoclavados y se mantuvieron en cuartos de cultivo a 25°C con un fotoperiodo de 16 hs luz - 8 hs oscuridad.

### ➤ ***Medio de multiplicación***

Sales MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa 2% p/v, pH 5,7 (+/- 7 g/L agar).

### ➤ ***Sistema de tuberización in vitro***

Porciones del tallo conteniendo yemas meristemáticas se colocaron en frascos conteniendo MS agar, 8% sacarosa. Se mantuvieron en oscuridad durante 4 semanas. Se recolectaron estolones tempranos, estolones engrosados y minitubérculos.

### ➤ ***Medio de tuberización***

Sales MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa 8% p/v, pH 5,7 (+/- 7 g/L agar).

## **Cultivo en invernadero**

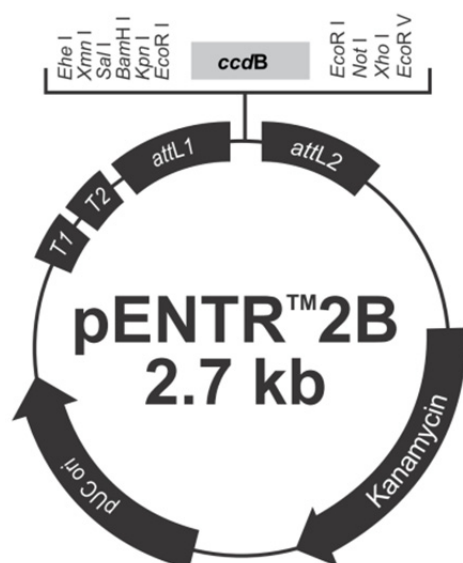
Se sembraron tubérculos de papa en maceta (mezcla 3:1:1 de humus, turba y perlita) en el invernadero en condiciones de fotoperiodo 16 hs luz - 8 hs oscuridad y temperatura entre 20-25°C. Las plantas propagadas en invernadero se procesaron cuando tenían de 2 a 3 meses de edad. Se recolectaron brotes, hojas, pecíolos, tallos, raíces, estolones y minitubérculos.

Se sembraron semillas de *N. benthamiana* en maceta en las mismas condiciones que las plantas de papa.



**pGWB408:** vector binario que posee origen de replicación *E. coli* y *A. tumefaciens* con resistencia a espectinomicina y kanamicina. Este plásmido permite clonar la secuencia de interés bajo el promotor 35S quedando la secuencia codificante en fusión con 6xHis. Fue gentilmente provisto por el Dr. Nakagawa de Shimane University, Japón (Nakagawa et al., 2007).

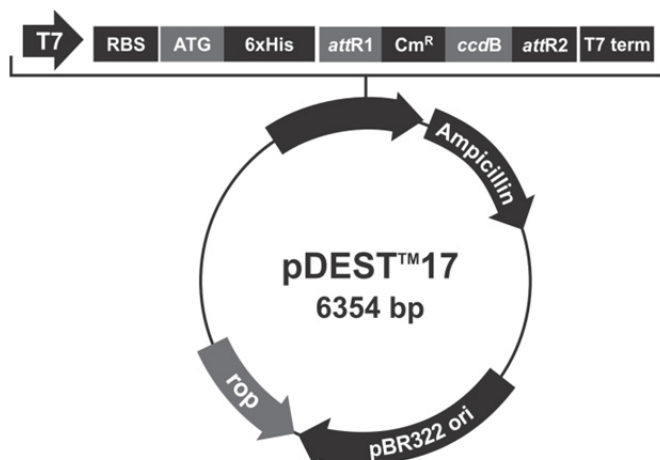
### pENTR™ 2B



#### Comments for pENTR™2B 2718 nucleotides

*rrnB* T1 transcription termination sequence: bases 106-149  
*rrnB* T2 transcription termination sequence: bases 281-308  
*attL1*: bases 358-457 (complementary strand)  
*ccdB* gene: bases 613-918  
*attL2*: bases 947-1046  
Kanamycin resistance gene: bases 1169-1978  
pUC origin: bases 2042-2715

### pDEST17



#### Comments for pDEST™17 6354 nucleotides

T7 promoter: bases 21-40  
Ribosome binding site (RBS): bases 86-92  
Initiation ATG: bases 101-103  
6xHis tag: bases 113-130  
*attR1*: bases 140-264  
Chloramphenicol resistance gene (*Cm<sup>R</sup>*): bases 373-1032  
*ccdB* gene: bases 1374-1679  
*attR2*: bases 1720-1844  
T7 transcription termination region: bases 1855-1983  
*bla* promoter: bases 2471-2569  
Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 2570-3430  
pBR322 origin: bases 3575-4248  
*ROP* ORF: bases 4619-4810 (C)  
C=complementary strand

### pET 22b+



➤ *Oligonucleótidos iniciadores utilizados en este trabajo*

Tabla M1

| Nombre               | Secuencia                                                  |
|----------------------|------------------------------------------------------------|
| <b>GSP1</b>          | 5'-ATCTCAACAGATCCAGAAATCAAG-3'                             |
| <b>GSP2</b>          | 5'-CTGCTGGTTTACTTTTGC-3'                                   |
| <b>St1-prom-Fw</b>   | 5'-AAT <b>GTCGAC</b> GGTATCTCTTTTGTGTTGG-3'                |
| <b>St1-prom-Rev</b>  | 5'-CTTGATTTCTGGATCTGTTGAGAT <b>CCCGGGGGA</b> -3'           |
| <b>ST-470</b>        | 5'-ATCTTTCTTGAATCTCCATCTGGGG-3'                            |
| <b>GUS-rev</b>       | 5'-GATTCACGGGTGGGGTTTC-3'                                  |
| <b>St1 FP</b>        | 5'- <b>CCGGATCC</b> GATGGGTGTTTGTGTTGAG-3'                 |
| <b>St1 RP</b>        | 5'-AGCTAAACAACCAGGCAAGCTCTT <b>CTCGAGATA</b> -3'           |
| <b>St7 FP</b>        | 5'-AGGG <b>GACCG</b> ATGGGGAACACTTGTGTAGGACC-3'            |
| <b>St7 RP</b>        | 5'-GCC <b>CTCGAG</b> TGTAGTTTTAGTGCTTCTCTGAATCCAATGC-3'    |
| <b>CDPK1 FP</b>      | 5'-GGTAAAGGGCATAATCATGGAAC-3'                              |
| <b>CDPK1 RP</b>      | 5'-CCAAAATGGTTTCTTGCTTGAA-3'                               |
| <b>CDPK7 FP</b>      | 5'-CTTCAATCAATGTCAGCAGC-3'                                 |
| <b>CDPK7 RP</b>      | 5'-GAACTGGCAAAGGTGATTCAG-3'                                |
| <b>GAPDH FP</b>      | 5'-GAAGGACTGGAGAGGTGGA-3'                                  |
| <b>GAPDH RP</b>      | 5'-GACAACAGAAACATCAGCAGT-3'                                |
| <b>EF-1α FP</b>      | 5'-TGAGGCAAAGTGTGCTGTC-3'                                  |
| <b>EF-1α RP</b>      | 5'-TGGAAACACCAGCATCACAC-3'                                 |
| <b>miR390FP</b>      | 5'-CGCGCCAAGCTCAGGAGGG-3'                                  |
| <b>univRP</b>        | 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'                                     |
| <b>miR390STP</b>     | 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGTGCTAT-3' |
| <b>pGWB408rev</b>    | 5'-GGGAAATTCGAGCTCTAAGCATG-3'                              |
| <b>St2promrev</b>    | 5'-TACCCGGGTATTAGCATTATTGGGTTTACCTTTACTA-3'                |
| <b>St2promfw</b>     | 5'-ATTCTAGAGGTACTCATAGCATGTGTCCACTGAGG-3'                  |
| <b>St1-pENTR FP</b>  | 5'- <b>CCGGATCC</b> GATGGGTGTTTGTGTTGAG-3'                 |
| <b>St1-pENTR RP</b>  | 5'-TT <b>GCGGCCGCT</b> TAGAAGAGCTTGCCTGGTT-3'              |
| <b>St1-pENTR RP2</b> | 5'- <b>TACTCGAG</b> CCAAAATGGTTTCTTGCTTGAA-3'              |
| <b>StPIN4 FP</b>     | 5'-AA <b>CCATGG</b> ACCATCGGCCGTC-3'                       |
| <b>StPIN4 RV</b>     | 5'-TTT <b>GCGGCCGCC</b> CATACCAGCATCTTGTCTC-3'             |
| <b>StDi19 FP</b>     | 5'-GCT <b>CATATG</b> GATGCTGATTCATGGAG-3'                  |
| <b>StDi19 RP</b>     | 5'-CAG <b>CTCGAG</b> TAAATTATCATCCAGAATGGTAGACA-3'         |
| <b>StSP6A FP</b>     | 5'-GCT <b>CATATG</b> CCTAGAGTTGATCCATTG-3'                 |
| <b>StSP6A RP</b>     | 5'-AAT <b>CTCGAG</b> TGCGCGACGTCCTCC-3'                    |

Los sitios de restricción se indican en negrita

➤ *Mini preparación de ADN plasmídico*

Se inocularon 5 ml de LB líquido con el antibiótico requerido con colonias aisladas conteniendo el plásmido de interés. Los cultivos fueron crecidos durante 16 hs con agitación a 37°C. Se centrifugaron 4 ml del cultivo y el precipitado se resuspendió en 200 µl de solución 1 (Tris-HCl 50

mM pH 8, EDTA 10 mM). Se agregaron 300 µl de solución 2 (NaOH 200 mM, SDS 1 %), se mezcló por inversión y se incubó a 4° durante 5 minutos. Se agregaron 300 µl de solución 3 (acetato de potasio 3 M, pH 5,5), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. Transcurrida la incubación se centrifugaron las muestras a 10000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, se agregaron 400 µl de cloroformo, se mezcló por inversión enérgicamente 10 veces y se centrifugó 1 min a temperatura ambiente. Se agregó un volumen de isopropanol. Se mezcló por inversión y se centrifugó nuevamente a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500 µl de etanol 70 %, se secó y se resuspendió en 20 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada conteniendo ARNsA A para eliminar restos de ARN presentes en la extracción. El ADN fue cuantificado por Nanodrop.

#### ➤ ***Purificación de ADN plasmídico utilizando kits comerciales***

Se utilizaron los sistemas de purificación *Wizard plus SV minipreps ADN Purification System* (Promega), siguiendo los protocolos del fabricante. El ADN fue cuantificado por Nanodrop.

#### ➤ ***Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de Agarosa***

Se utilizó el *kit Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System* de Promega. La purificación se realizó acorde a las instrucciones del fabricante.

#### ➤ ***Amplificación de insertos por PCR***

La amplificación de fragmentos de ADN por PCR, se hizo utilizando las enzimas *Taq* ADN polimerasa (New England Biolabs) o *Phusion* ADN polimerasa (New England Biolabs) en los clonados donde fue necesaria una alta fidelidad. Las reacciones se llevaron a cabo de acuerdo a las condiciones proporcionadas por el fabricante. Se utilizaron 10 ng de ADN plasmídico como molde y 100-300 ng para ADN genómico. Las condiciones de reacción, número de ciclos y temperatura variaron de acuerdo a los oligonucleótidos utilizados, longitud del amplicón y polimerasa utilizada en cada caso.

#### ➤ ***Digestión con enzimas de restricción***

Las reacciones de digestión de plásmidos o ADN genómico se realizaron utilizando enzimas de restricción de Promega, Fermentas o New England Biolabs (NEB). Se utilizaron los buffers proporcionados y BSA. Los tiempos de digestión variaron de 1 a 3 horas a 37°C. El resultado de estas reacciones fue visualizado en electroforesis en geles de agarosa (1-2%) conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Se utilizó un transiluminador marca *Syngene* para la captura de imágenes.

### ➤ **Reacciones de ligación**

Las reacciones de ligación de plásmidos e insertos se hicieron utilizando la ADN ligasa del fago T4 (Promega, catalogo M1801). Se usaron 50 ng de plásmido y relaciones molares de extremos plásmido:inserto (1:3). En cada caso se utilizó el *buffer* suministrado por Promega 10X o 2X al utilizar el sistema de clonado pGEMt-easy. El volumen final de reacción varió entre 10-20µl. Se utilizaron 3 U de la enzima ligasa en todos los casos y el tiempo de incubación varió de 1 hora a 25°C o 16 hs a 4°C.

### ➤ **Cuantificación del ADN y ARN**

Se estimó la relación Absorbancia 260/ Absorbancia 280. Esta relación permite estimar la pureza de la muestra. Preparaciones puras de ADN y ARN presentan una relación de 1,8 y 2, respectivamente. Relaciones menores indican contaminación con proteínas, sales o fenol.

## **Extracción de proteínas**

### ➤ **Extracción de proteínas para ensayos de actividad o Western blot**

Las muestras de tejido vegetal fueron homogeneizadas en mortero con nitrógeno líquido. Se adicionó 1 volumen de buffer de extracción (50 mM TrisHCl pH 6.8, 1% β-mercaptoetanol, 0,2% polivinilpirrolidona) suplementado con inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail* P9599 – para extractos de células y tejidos vegetales, en DMSO). Se centrifugó a 4°C durante 30 minutos a 10000 g. El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo y se mantuvo a 4°C hasta la electroforesis.

### ➤ **Extracción de proteínas para ensayo fluorométrico de GUS**

Se maceraron con un vástago plástico de punta cónica 25 mg de hoja en un microtubo, y se agregó 125 µl de *buffer* de extracción (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7, 10 mM EDTA, 0,1% sarcosil, 0,1% Tritón X-100, 10 mM β-mercaptoetanol). Se centrifugaron las muestras a 12000 rpm y se mantuvieron a 4°C hasta el ensayo fluorométrico.

### ➤ **Cuantificación de proteínas totales**

La concentración de proteínas se determinó utilizando el método de Bradford (1976). En una placa de ELISA se adicionaron 200 µl del reactivo de Bradford comercial de Bio Rad (dilución 1:5) y se agregaron 10 µl de muestra. Se registró el valor de absorbancia a 580 nm. Se estimó la concentración mediante una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA).

## **Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

Plantas de 3 semanas propagadas *in vitro* de la variedad *Solanum tuberosum* L. cv. *Désirée* fueron seleccionadas para transformación mediada por *A. tumefaciens*. En cada placa de Petri se colocaron aproximadamente 15 entrenudos. Cada placa de Petri se inoculó con 100 µl del cultivo correspondiente de *A. tumefaciens*, con una DO de 0.8. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación y luego fueron selladas con *parafilm* y se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente por 48 horas. Pasado ese tiempo, los entrenudos se colocaron en otra placa de Petri conteniendo medio sólido inductor del callo (MIC) durante una semana, en cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas luz-8 horas oscuridad. Los explantos luego fueron transferidos a medio inductor de brotes (MID) y fueron repicados cada dos semanas hasta el surgimiento de los brotes (aproximadamente 30-40 días). Cuando los brotes regenerantes alcanzaban una longitud de 1-2 cm se transferían a medio de enraizamiento (ME). Para ello se utilizó una pinza y se separaron cuidadosamente los brotes del explanto inicial.

**Medio de Infección (MI):** MS sal y vitaminas, libre de fitohormonas, suplementada con 20 g/L de sacarosa y 10 mg/L de Acetosiringona.

**Medio Inductor de Callo (MIC):** MS sal y vitaminas, 8 g/L agar, suplementada con 20 g/L de glucosa, 5 mg/L ácido 1-naftalenacético, Sigma: N-0640 (NAA), 0.1mg/L 6-bencilaminopurina (BAP), Sigma: B-3408, 250 mg/L cefotaxima, 50 mg/L Kanamicina.

**Medio Inductor de Brotes (MIB):** MS sal y vitaminas, 8 g/L agar, suplementada con 20 g/L de glucosa, 2.2 mg/L *trans*-Zeatín Ribósido (ZR) Sigma: Z3541, 0.02 mg/L NAA, 0.15 mg/L GA3, 250 mg/L cefotaxima, 50 mg/L Kanamicina

**Medio de Enraizamiento (ME):** MS sal y vitaminas, 8 g/L agar, suplementada con 20 g/L de glucosa, 250 mg/L cefotaxima, 50 mg/L Kanamicina.

### **Reactivos utilizados para la transformación**

**Acetosiringona (AS, PhytoTechnology Laboratories):** compuesto fenólico que se libera en tejidos vegetales en respuesta a daños. Se utilizó una concentración de 10 mg/L. El compuesto se disuelve en poco volumen de dimetilsulfóxido (DMSO) y luego en agua. Se utilizó una concentración *stock* de 10 mg/ml. La solución se esterilizó por filtración.

**Cefotaxima (Laboratorios Richet):** antibiótico utilizado para inhibir el crecimiento de las bacterias *A. tumefaciens* luego de la transformación. Se utilizaron 250 mg/L. la solución *stock* se preparó en agua destilada con una concentración final de 250 mg/ml. La solución se esterilizó por filtración.

**Ácido 3-Indol-Acético (AIA, PhytoTechnology Laboratories):** Hormona tipo auxina. Se utilizó 50mgr/ml disueltos en etanol. Se preparó una solución *stock* de 0,87mgr/ml. La solución se esterilizó por filtración.

***trans*-Zeatín Ribósido (ZR, PhytoTechnology Laboratories):** Hormona tipo citoquinina. Se utilizó en una concentración final de 2,2 mg/l. La solución *stock* se preparó disolviendo la hormona en etanol 100% (17,57 mg/10ml). La solución se esterilizó por filtración.

**Kanamicina (Sigma):** antibiótico utilizado a una concentración final de 50 mg/l. Se disolvió en agua y se esterilizó por filtración. Se almacena a -20°C.

#### ➤ ***Extracción de ADN genómico de plantas transgénicas***

Se utilizaron 100-200 mg de tejido foliar proveniente de plantas *in vitro* y se machacaron en un tubo *ependorf* con un vástago. Se adicionaron 350 µl de buffer de extracción y se incubó 10 min a 65°C. Se agregaron 100 µl de solución III, se mezcló por inversión y colocó a 4°C. Se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm a 4°C y el sobrenadante se recuperó en un nuevo tubo. Se agregó 1 volumen de isopropanol, se centrifugó durante 15 min a 12000 rpm a 4°C. Se agregó 500 µl de etanol 80% y se centrifugó durante 5 min. El *pellet* fue resuspendido en 35 µl de agua con ARNsa. Se cuantificó por *nanodrop* y se utilizaron 100 ng como molde de reacción de PCR.

#### ➤ ***PCR para chequeo de plantas transgénicas***

Se evaluaron las plantas transgénicas mediante amplificación por PCR utilizando el ADN obtenido de cada línea como templado y los oligonucleótidos GUS rev y ST-470 (Tabla M1) en el caso de las líneas StCDPK1pro::GUS y CDPK1FP y pGWB408rev (Tabla M1) en el caso de las líneas sobreexpresantes.

#### ➤ ***Rusticación***

Para su pasaje a tierra, las raíces de cada planta se lavaron cuidadosamente con agua corriente para eliminar los restos de medio y se plantaron en macetas conteniendo una mezcla 3:1:1 de humus, turba y perlita. Durante la primera semana, las plantas se mantuvieron cubiertas con un film de polietileno para evitar su deshidratación en el proceso de adaptación a las nuevas condiciones de humedad. El crecimiento se hizo en un invernadero cerrado con un fotoperíodo controlado de 14/10 horas luz/oscuridad y a una temperatura de entre 25 y 30°C.

### **Ensayos de Agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana***

Hojas de plantas de *N. benthamiana* de 6 semanas fueron infiltradas con *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 transformadas con 35S::miR390precursor, 35S::CDPK1-6xHis, 35S::CDPK7-6xHis, o pGWB408 (vector vacío). Las bacterias se cultivaron toda la noche con 20µM acetosiringona, se precipitaron y el pellet se resuspendió en buffer (10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MES-K: pH5.6, 100 µM acetosiringona) ajustando la absorbancia a 0,4 para los análisis por qRT-PCR o a 1 para los ensayos de Western blot. Para co-expresar más de un constructo los cultivos se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h y se realizaron la co-inyecciones. Las hojas se inyectaron con buffer (control), vector vacío (EV), 35S::CDPK1 (CDPK1), 35S::miR390precursor (miR390) y 35S::CDPK7 (CDPK7). Además se realizaron las co-agroinfiltraciones simultáneas con CDPK1 y miR390 (CDPK1/miR390) o CDPK7 y miR390 (CDPK7/miR390). Las hojas se cosecharon a los 3 días post infiltración y se analizaron los niveles de transcritos y proteínas. Se agroinfiltraron por lo menos 6 hojas de plantas independientes para cada condición.

## Expresión y purificación de proteínas recombinantes

### ➤ *Purificación de proteínas recombinantes de fusión a GST en los plásmidos de la serie pGEX*

A partir de un cultivo bacteriano starter de 3 ml se inoculo un cultivo de 500 ml de LB - ampicilina y se incubo a 37° hasta una DO de 0.4. Se indujo con 1mM de IPTG y se incubo 16 hs. Posteriormente se centrifugo durante 15 min a 4000g. Se resuspendió el *pellet* en 5 ml de PBS1X frio y se sonicó en hielo 6 veces durante 15 segundos cada vez. Luego se agregó 0.01% concentración final de Tritón, y se incubó en agitación durante 30 minutos para favorecer la solubilización. Se centrifugó durante 15 min a 10000 rpm a 4°C y el sobrenadante se incubó durante 30 min con 500 µl de resina Glutathione Sepharose® 4B Reduced glutathione (GSH 4B 50%, GE HealthCare). Se realizaron 4 lavados con 2 ml de PBS1X cada vez, centrifugando 5 min a 500g a temperatura ambiente. Posteriormente se eluyó 4 veces utilizando 100 µl de buffer de elución, e incubando el buffer con la resina 10 min a temperatura ambiente cada vez. Se midió la absorbancia a 580nm para cuantificar los eluidos. Los eluidos fueron alicuotados y almacenados a -20°C.

**Buffer fosfato (PBS1X):** 140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.3

**Buffer de elución:** 10mM GSH, 50mM Tris-HCl pH 8 (10X). Se almacena a -20°C

### ➤ *Purificación de proteínas recombinantes de fusión a His*

A partir de un cultivo bacteriano starter de 5 ml se inoculo un cultivo de 1000 ml de LB- ampicilina y se incubo a 37° hasta una DO de 0.3. Se realizó el protocolo de purificación en condiciones nativas. Se indujo con 1mM de IPTG y se incubo 16 hs. Posteriormente se centrifugó durante 15 min a 4000g. El *pellet* se resuspendió en 4 ml de buffer de lisis. Se agregó 1mg/ml de lisozima y se incubo 30 min a 4°C. Se sonicó 6 veces durante 10 segundos cada vez. Se centrifugó el sobrenadante durante 10 min a 10000 rpm a 4°C. Se puso en contacto el sobrenadante obtenido con 1ml resina de Ni agarosa (QIAGEN) en agitación durante 1 hora a 4°C. Se eluyó el percolado y se realizaron 4 lavados de 2 ml cada uno utilizando buffer de lavado. Posteriormente se eluyó 4 veces con 500 µl cada vez. Los eluidos que contenían la proteína recombinante fueron dializados contra buffer 10mM Tris-HCl pH7.8, 200mM EDTA, a fin de eliminar trazas de Níquel presentes en la muestra. Los eluidos fueron cuantificados mediante el método de Bradford utilizando una curva patrón de BSA. Se dializo durante Los eluidos se almacenaron a -20°C. 2 hs a 4°C seguidos de 2 hs más contra buffer 10mM Tris-HCl pH7.8. Los eluidos fueron visualizados mediante SDS-PAGE y teñidos con Coomassie Brilliant Blue.

**Buffer de lisis:** 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 10mM Imidazol, pH 8.

**Buffer de lavado:** 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 20mM Imidazol, pH 8.

**Buffer de Elución:** 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 250mM Imidazol, pH 8, inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail-Sigma CNP9599) 10 µl/ml de buffer de elución, 5% glicerol.

Cuando las proteínas recombinantes quedaron retenidas en cuerpos de inclusión, se las extrajo con 8 M urea de acuerdo al protocolo de QIAexpressionist

## Ensayo de Western blot

Extractos proteicos (2-100 µg) fueron resueltos en geles SDS-PAGE 7-15%. Los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (Amersham-C) utilizando el sistema de transferencia semiseca Fastblot (Biometra) y el buffer de transferencia Tris-glicina 1x, 20% metanol durante 1 h a 4mA/cm<sup>2</sup>. Las membranas se bloquearon con caseína (leche en polvo) 0.5% TBS-Tween. Se incubó con el anticuerpo primario correspondiente durante 1 h a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados con TBS-Tween de 5 minutos cada uno. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 hora. El revelado fue utilizando placas sensibles de Amersham *Hyperfilm ECL* (GE Healthcare) y el sustrato Bio-lumina (Productos Biológicos-UNQ).

Anticuerpos utilizados:

-Anti-StCDPK1 (1:300)

-Anti-Goat (1:4000) igGH- HRP cat sc-2056 0.5% BSA

-Anti-GST (1:1000). 5mg/ml 27-4577-01 0.5% BSA

-Anti-His- anticuerpo monoclonal commercial (QIAGEN) 0.5% BSA (1:5000)

-Anti rabbit anti Fc-IgGs (*Invitrogen*) 0.5% BSA TBS 10X: 0,25M Tris-HCl pH 8, 9% p/v NaCl.

TBS-tween: TBS 1x, 0,05% Tween-20

Solución 40% acrilamida: bisacrilamida (19:1): 38 g de acrilamida, 2 gr de bisacrilamida, llevar a 100 ml con agua destilada.

## Metodología del ARN

### ➤ *Extracción de ARN mediante RNeasy Plant Mini Kit y RT-PCR mediante kit SuperScript® III One-Step RT-PCR*

Plantas de *Solanum tuberosum ssp.* Desireé fueron propagadas en macetas durante 4 semanas, en cámara de cultivo. Pasado ese tiempo se procedió a su cosecha y posterior extracción del ARN. Se cosecharon muestras de hojas, pecíolos, tallo, raíces, yemas axilares y estolones tempranos e inducidos y minitubérculos. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Se extrajo el ARN utilizando el reactivo de TRIzol (*Invitrogen*) agregando 1 ml/mg de tejido de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ARN se cuantificó por nanodrop. Se utilizó 1µg de ARN como punto de partida para ensayos de RT-qPCR o RT-PCR semicuantitativa

### ➤ *Determinación de la calidad del ARN*

Se resolvieron alícuotas de 200 ng del ARN adicionado con 1 µl de buffer de siembra en geles de agarosa 1,5%, buffer TAE1X adicionados con 6 µl de formamida. La presencia de bandas ribosomales definidas indican que el ARN está íntegro y puede utilizarse para la síntesis de ADNc.

### ➤ **Tratamiento con ADNasa**

Se partió de 200 ng o 1 µg de ARN purificado y se agregó 2 µl de *buffer Dnasa* (Promega), 1 µl de la enzima *Dnasa RQ1 ARNse free* (Promega), y se llevó a volumen final 20 µl. Se incubó la reacción a 37°C durante 30 minutos. Se adicionó 1 µl de la solución *stop Dnasa* (Promega), y se incubó nuevamente a 65°C durante 10 minutos.

### ➤ **Síntesis de ADNc**

Se preparó una mezcla en tubos de PCR (0,2 ml) conteniendo: 1 µg de ARN total tratado previamente con ADNasa, de una mezcla deoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 500 µM de cada uno), 0,5 µg de oligodT para StCDPK1, GAPDH y EF (factor de elongación) o 2,3 pM STP primer (stem-loop primer) para la expresión del miR390. Se incubó la reacción a 65°C durante 5 minutos, luego se enfrió en hielo por 1 minuto. Se agregó *First Strand Buffer* 1X (Promega), 0,1M DTT, 40 unidades de *RNaseOUT* y 200U de la enzima M-MLV-Transcriptasa Reversa (Promega). El volumen final de reacción fue de 25 µl. Se incubó la reacción a 42°C durante 60 minutos, seguido de 15 minutos a 70°C para inactivar la transcriptasa reversa. Todos los pasos de incubación se realizaron en un ciclador MiniCycler™ MJ Research. Se almacenó a -20°C hasta su uso.

### ➤ **PCRs cuantitativas**

Todas las reacciones de qPCR se realizaron en un ciclador Mastercycler Eppendorf Realplex utilizando la mezcla KAPA SYBR Green Master Mixture (Kapa Biosystems). Para la expresión de StCDPK1, se utilizaron los primers CDPK1 FP y CDPK1 RP y las reacciones se llevaron a cabo a 95°C durante 2 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos; 56°C 15 segundos and 72°C por 20 segundos. Para la normalización se utilizó GAPDH utilizando los primers GAPDH FP y GAPDH RP primers en las mismas condiciones de ciclado que para CDPK1. La especificidad de la reacción de PCR se verificó a través del análisis de las curvas de melting y los datos se analizaron mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Livak and Schmittgen 2001). Los niveles de miR390 se determinaron usando los primers miR390FP y univRP con el siguiente perfil de ciclado 95°C por 5 min seguido por 40 ciclos de 95°C por 5 s, 60°C por 10 s y 68°C por 8 s. Como en el caso anterior, la especificidad de la reacción de PCR se verificó a través del análisis de las curvas de melting. Se graficaron las Medias  $\pm$  SEM, posterior análisis de ANOVA de un factor y prueba de comparaciones múltiples de Tuckey.

## **Ensayos de actividad CDPK**

Se realizaron ensayos de actividad quinasa utilizando ATP [ $\gamma^{32}P$ ] para evaluar actividad quinasa de 6xHisStCDPK1, 2 y 3, fosforilación de diferentes sustratos, efecto de inhibidores de la actividad quinasa y autofosforilación.

Las determinaciones de actividad quinasa se realizaron de acuerdo a Macintosh y col. (1996). Se utilizaron 2ng/ $\mu$ l de 6xHisStCDPK1 en ensayos de fosforilación y 2  $\mu$ g en ensayos de autofosforilación. El volumen final de reacción fue de 60  $\mu$ l cuando se usa Syntide como sustrato y 40 $\mu$ l en los ensayos de fosforilación de histona H1. El buffer de reacción se componía de: Tris-HCl 20 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, ATP frío 50  $\mu$ M y ATP [ $\gamma$  <sup>32</sup>P] [ $1 \times 10^6$  cpm/ensayo; 3000 Ci/mmol, New England Biolabs. Los ensayos se realizaron en presencia de CaCl<sub>2</sub> (25 o 100  $\mu$ M final) o EGTA (1 o 5mM). Adicionalmente se hicieron curvas de calcio y EGTA. En los ensayos de fosforilación en geles de acrilamida se utilizó como aceptor de fosfatos a la proteína Histona H1 (1 mg/ml). Se evaluó la capacidad de algunos inhibidores de actividad quinasa de inhibir la actividad de 6xHisStCDPK1: ST (estaurosporina: inhibidor de quinasas competitivo con ATP) (1 $\mu$ M), CPZ: clorpromazina (2 mM) y el quelante de Ca<sup>2+</sup> EGTA (5mM). La reacción se incubó 30 minutos a 30 °C, luego se detuvo la reacción con la extracción de 40  $\mu$ l que se adicionó sobre papeles de 2cm x 2cm de fosfocelulosa Whatman P81, que está cargado positivamente con lo cual favorece el pegado de péptidos con grupos fosfatos. Los papeles fueron inmersos en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 75 mM y fueron lavados (x3) durante 10 minutos. El último lavado se realiza con acetona durante 1 minuto. Los papeles se secan y se colocan en un tubo polistor conteniendo 0.5 ml de líquido 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 dos con EGTA, sin fuente enzimática. Se graficaron las Medias  $\pm$  SEM, los datos mostrados son de un experimento representativo de tres repeticiones técnicas.

En los ensayos de fosforilación dependiente de calcio con histona H1 como sustrato la mezcla de reacción consistió en Tris-HCl 10 mM pH, 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, ATP frío 5 o 25 $\mu$ M y ATP [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] [ $10^7$  cpm/ensayo] y 0,1 mg/ml de histona H1. La mezcla de reacción se incubó durante 5 minutos a 30°C. Luego los tubos se colocaron en hielo y se agregó buffer de siembra 5x, se incubó a 100°C durante 5 minutos y se realizó una electroforesis con geles 12% SDS-PAGE). Se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se expusieron en placas autoradiográficas (Amersham Hyperfilm, GE Healthcare). Alternativamente, la señal se detectó utilizando un fosforimager Storm 820 (Pharmacia-Bio- tech).

### ➤ **Ensayos de Fosforilación de Sustratos in vitro**

Para los ensayos de fosforilación de sustratos usando 6xHisStCDPK1 y 6xHisStCDPK3 se utilizó una mezcla de reacción compuesta por: 25 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10mM MgCl<sub>2</sub>, y 25 $\mu$ M CaCl<sub>2</sub> o 1mM EGTA, 0,1% Tritón X-100, 10mM  $\beta$ -mercaptoetanol, y 0,1 mg/ml de cada sustrato recombinante y en el caso de usar 6xHisStCDPK2 como fuente de enzima se usaron 50  $\mu$ g de los extractos de cultivos inducidos de AtDi y de McCSP1, 20  $\mu$ M ATP suplementado con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (5000 Ci/mmol, 10 a 20 Ci por reacción) at 30°C durante 60 minutos. Las reacciones fueron resueltas por SDS-PAGE (Buffer Tris/Glicina), se expusieron en placas autoradiográficas (Amersham Hyperfim, GE Healthcare) durante una noche a temperatura ambiente.

## **Ensayo de tinción GUS (actividad $\beta$ -glucuronidasa)**

Este ensayo cualitativo se realizó en plantas *in vitro* de papa transgénicas, salvajes y en minitubérculos obtenidos *in vitro*. La solución de revelado, de acuerdo al protocolo desarrollado por McCabe y colaboradores (1988), consistió en 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7,2, 2mM X-GLUC (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucurónico). Se incubó 16 hs en oscuridad a 37°C. Luego se destiñó con sucesivos lavados con etanol 70% de 1 hora cada uno, hasta alcanzar la decoloración total.

### **➤ Ensayo fluorométrico de actividad $\beta$ -glucuronidasa.**

Se utilizó el método descrito por Jefferson y colaboradores (1987). Se maceraron 25 mg de hoja con vástago plástico de punta cónica en un microtubo, y se agregaron 125  $\mu\text{l}$  *buffer* de extracción GUS (*buffer* fosfato 50 mM pH 7, EDTA- $\text{Na}_2$  10 mM, N-lauryl sarcosine 0,1% [m/v], Triton X-100 0,1% [v/v], 2-mercaptoetanol 10 mM, PMSF [fenil metanosulfonil fluoruro] 1 mM). Se centrifugó durante 30 min a 10000 rpm a 4 °C, se trasvasó el sobrenadante un nuevo tubo. Se utilizó una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  del extracto proteico y se agregó a tubos conteniendo 490  $\mu\text{l}$  de *buffer* de reacción previamente calentado a 37°C durante 10 minutos. El *buffer* de reacción consiste en: *buffer* de extracción suplementado con 4-metilumbelliferyl- $\beta$ -D-glucurónico (Invitrogen) 1 mM. Se incubaron los tubos a 37°C. Se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de muestra a diferentes tiempos (0, 1, 2 y 4 hs) y se adicionaron a tubos conteniendo 1,9 ml de *buffer stop* ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 M). Se determinó la fluorescencia en las muestras utilizando el fluorómetro *DynaQuant 200* (Hoëfer), y se realizó la conversión entre unidades de fluorescencia y nmoles de 4-MU (4-metil-umbeliferona) con una curva de calibración construida con un estándar de 4-MU (Invitrogen) utilizando concentración de 4-MU de 0, 50, 100, 150 y 200 nM (500 Unidades fluorométricas corresponden a 50 nM 4-MU). La concentración de proteínas totales se determinó mediante el ensayo de Bradford (1976). Este ensayo fluorométrico se realizó por duplicado en cada línea, y se obtuvieron resultados similares.

## **Electroforesis Geles 2D**

### **➤ Ensayos de autofosforilación y fosforilación**

Se realizaron ensayos de autofosforilación de 6xHisStCDPK1. La enzima se incubó 1 hora a 30°C con una mezcla de reacción conteniendo 20mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM  $\text{MgCl}_2$ , 25 $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , 10mM ATP, 10mM BME, 50  $\mu\text{g}$  6xHisStCDPK1. El volumen final de reacción fue de 100  $\mu\text{l}$ .

### **➤ Electroforesis en geles bidimensionales**

Una vez concluido el tiempo de reacción se realizó una precipitación con 3 volúmenes de TCA, 10% acetona, 0,07% BME. Luego de 12 hs se centrifugó durante 30 minutos a 10000g. El *pellet* fue lavado dos veces con 500  $\mu\text{l}$  100% acetona, 0,07% BME y luego se centrifugó 5 minutos a 10000g. Se secó brevemente el *pellet* en estufa a 37°C y se resuspendió 106,8  $\mu\text{l}$  de *buffer* IEF (Buffer de

isoelectroenfoque). Se adicionó: 0,66  $\mu$ l IPG *Buffer* pH 4-7 (GE Healthcare), 10  $\mu$ l BpB (Azul de bromofenol saturado), 0,06M DTT. Se vortexeó la muestra y se incubó 30 minutos a 37°C. Luego se centrifugó 15 minutos a 10000 g y se procedió al reswelling (hidratación pasiva del *strip*). Para esto se adicionaron los 125  $\mu$ l de la muestra en la placa de reswelling y se colocó el *strip* en contacto con la muestra, de modo tal que el gel deshidratado quede boca abajo. La placa se cubrió con PlusOne Dry Strip Cover Fluid (GE Healthcare). Se incubó durante 16-20 hs a 30°C. Luego se realizó el isoelectroenfoque utilizando el equipo *Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing* (GE). El programa utilizado para el isoelectroenfoque consistió en 3 ciclos: 500V 30 minutos, 1000V 30 minutos, 5000V, 1 hora 40 minutos. Una vez concluido el programa se realizó un cuarto ciclo a 5000 V hasta completar un total de 8700V. Luego, los *strips* se incubaron en *buffer* de equilibrio suplementado con 10 mg/ml de DTT durante 15 minutos en agitación, seguido otra incubación en *buffer* de equilibrio suplementado con 45 mg/ml de iodoacetamida durante 15 minutos en agitación. Se lavaron los *strips* brevemente con *buffer* de corrida y se resolvieron en geles de acrilamida 10% desnaturalizantes. El *strip* fue inmovilizado sobre el gel de poliacrilamida por el agregado de una solución previamente calentada conteniendo: 0,6% de agarosa, 40  $\mu$ l de BpB 0,5% SDS. Las condiciones de la corrida fueron: 15mA por gel durante 15 minutos, luego se aumentó a 30mA por gel. Los spots de proteínas fueron visualizados por Western blot con anti-polihistidina (1:5000).

*Buffer de isoelectroenfoque (IEF)*: 0,84 gr urea, 0,3 gr tiourea, 0,4 ml CHAPS 2%, llevar a volumen final 2 ml.

*Buffer de equilibrio*: 50mM Tris-HCl pH 8,8, 6M Urea, 30% glicerol, 2% SDS, 4-8  $\mu$ l BpB

*Buffer de corrida*: 0,025M Tris, 0,19 Glicina, pH 8,3 SDS 0,15%

## Bioinformática

Se utilizaron diferentes *softwares* disponibles online para análisis de datos o imágenes:

Expasy SIB Bioinformatics Resource Portal <http://expasy.org/>

PROSITE y SMART - Simple Modular Architecture Research

Pfam ([pfam.xfam.org](http://pfam.xfam.org))

CSS-Palm (Zhou et al., 2006) NBA-Palm (Yu et al., 2006)

psRNATarget online tool ([plantgrn.noble.org/psRNATarget/](http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/)) (Dai y Zhao 2011)

TargetAlign (<http://www.leonxie.com/targetAlign>) (Xie y Zhang 2010)

Mfold (Zuker et al, 2003)

Plant-Specific Myristoylation Predictor (Podell & Gribskov, 2004)

NetPhos 2.0 (Blom et al., 1999)

PRISMA GraphPad

Las bases de datos del SPUD DB del Potato Genomics Resource de la Michigan State University (<http://potato.plantbiology.msu.edu/index.shtml>)

BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> *Basic Local Alignment Search Tool*  
OligoCalc: Oligonucleotide Properties Calculator:  
<http://www.basic.northWestern.edu/biotools/oligocalc.html>

# 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 molecular biology* 55:541-552 doi:10.1007/s11103-004-1178-y
- Allen GJ, Muir SR, Sanders D (1995) Release of Ca<sup>2+</sup> from individual plant vacuoles by both InsP<sub>3</sub> and cyclic ADP-ribose *Science* 268:735-737
- Allen GJ, Schroeder JI (2001) Combining genetics and cell biology to crack the code of plant cell calcium signaling *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2001:re13 doi:10.1126/stke.2001.102.re13
- An H et al. (2004) CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis* *Development* 131:3615-3626 doi:10.1242/dev.01231
- Anil VS, Harmon AC, Rao KS (2003) Temporal association of Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase with oil bodies during seed development in *Santalum album* L.: its biochemical characterization and significance *Plant & cell physiology* 44:367-376
- Appeldoorn NJ, Sergeeva L, Vreugdenhil D, Van Der Plas LH, Visser RG (2002) In situ analysis of enzymes involved in sucrose to hexose-phosphate conversion during stolon-to-tuber transition of potato *Physiologia plantarum* 115:303-310
- Artschwager EF (1924) Studies on the potato tuber *Journal of Agricultural Research* 27:809-836
- Asano T et al. (2002) Rice SPK, a calmodulin-like domain protein kinase, is required for storage product accumulation during seed development: phosphorylation of sucrose synthase is a possible factor *The Plant cell* 14:619-628
- Aukerman MJ, Sakai H (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes *The Plant cell* 15:2730-2741 doi:10.1105/tpc.016238
- Axtell MJ (2013) Classification and comparison of small RNAs from plants *Annual review of plant biology* 64:137-159 doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120043
- Ayre BG, Turgeon R (2004) Graft transmission of a floral stimulant derived from CONSTANS *Plant physiology* 135:2271-2278 doi:10.1104/pp.104.040592
- Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli AE (2005) Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation *Cell* 122:553-563 doi:10.1016/j.cell.2005.07.031
- Balamani V, Veluthambi K, Poovaiah BW (1986) Effect of Calcium on Tuberization in Potato (*Solanum tuberosum* L.) *Plant physiology* 80:856-858
- Ballas N, Wong LM, Theologis A (1993) Identification of the auxin-responsive element, AuxRE, in the primary indoleacetic acid-inducible gene, PS-IAA4/5, of pea (*Pisum sativum*) *Journal of molecular biology* 233:580-596 doi:10.1006/jmbi.1993.1537
- Banerjee AK, Chatterjee M, Yu Y, Suh SG, Miller WA, Hannapel DJ (2006) Dynamics of a mobile RNA of potato involved in a long-distance signaling pathway *The Plant cell* 18:3443-3457 doi:10.1105/tpc.106.042473
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function *Cell* 116:281-297
- Batistic O, Kudla J (2004) Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network *Planta* 219:915-924 doi:10.1007/s00425-004-1333-3
- Batistic O, Kudla J (2012) Analysis of calcium signaling pathways in plants *Biochimica et biophysica acta* 1820:1283-1293 doi:10.1016/j.bbagen.2011.10.012
- Bhogale S, Mahajan AS, Natarajan B, Rajabhoj M, Thulasiram HV, Banerjee AK (2014) MicroRNA156: a potential graft-transmissible microRNA that modulates plant architecture and tuberization in *Solanum tuberosum* ssp. andigena *Plant physiology* 164:1011-1027 doi:10.1104/pp.113.230714
- Blatt MR, Thiel G, Trentham DR (1990) Reversible inactivation of K<sup>+</sup> channels of *Vicia* stomatal guard cells following the photolysis of caged inositol 1,4,5-trisphosphate *Nature* 346:766-769 doi:10.1038/346766a0
- Blom N, Gammeltoft S, Brunak S (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites *Journal of molecular biology* 294:1351-1362 doi:10.1006/jmbi.1999.3310
- Bose J, Pottosin II, Shabala SS, Palmgren MG, Shabala S (2011) Calcium efflux systems in stress signaling and adaptation in plants *Frontiers in plant science* 2:85 doi:10.3389/fpls.2011.00085
- Botella JR, Arteca JM, Somodevilla M, Arteca RN (1996) Calcium-dependent protein kinase gene expression in response to physical and chemical stimuli in mungbean (*Vigna radiata*) *Plant molecular biology* 30:1129-1137

- Boudsocq M, Sheen J (2013) CDPKs in immune and stress signaling Trends in plant science 18:30-40 doi:10.1016/j.tplants.2012.08.008
- Boursiac Y, Harper JF (2007) The origin and function of calmodulin regulated Ca<sup>2+</sup> pumps in plants Journal of bioenergetics and biomembranes 39:409-414 doi:10.1007/s10863-007-9104-z
- Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs Science 320:1185-1190 doi:10.1126/science.1159151
- Camoni L, Harper JF, Palmgren MG (1998) 14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK) FEBS letters 430:381-384
- Campo S, Baldrich P, Messegue J, Lalanne E, Coca M, San Segundo B (2014) Overexpression of a Calcium-Dependent Protein Kinase Confers Salt and Drought Tolerance in Rice by Preventing Membrane Lipid Peroxidation Plant physiology 165:688-704 doi:10.1104/pp.113.230268
- Carrington JC, Ambros V (2003) Role of microRNAs in plant and animal development Science 301:336-338 doi:10.1126/science.1085242
- Chapman HW (1958) Tuberization in the Potato Plant Physiologia plantarum 11:215-224 doi:10.1111/j.1399-3054.1958.tb08460.x
- Chehab EW, Patharkar OR, Cushman JC (2007) Isolation and characterization of a novel v-SNARE family protein that interacts with a calcium-dependent protein kinase from the common ice plant, Mesembryanthemum crystallinum Planta 225:783-799 doi:10.1007/s00425-006-0371-4
- Chehab EW, Patharkar OR, Hegeman AD, Taybi T, Cushman JC (2004) Autophosphorylation and subcellular localization dynamics of a salt- and water deficit-induced calcium-dependent protein kinase from ice plant Plant physiology 135:1430-1446 doi:10.1104/pp.103.035238
- Chen H, Banerjee AK, Hannapel DJ (2004) The tandem complex of BEL and KNOX partners is required for transcriptional repression of ga20ox1 The Plant journal : for cell and molecular biology 38:276-284 doi:10.1111/j.1365-3113X.2004.02048.x
- Chen H, Rosin FM, Prat S, Hannapel DJ (2003) Interacting transcription factors from the three-amino acid loop extension superclass regulate tuber formation Plant physiology 132:1391-1404
- Chen X (2004) A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development Science 303:2022-2025 doi:10.1126/science.1088060
- Chen X (2009) Small RNAs and their roles in plant development Annual review of cell and developmental biology 25:21-44 doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113417
- Chen X, Liu J, Cheng Y, Jia D (2002) HEN1 functions pleiotropically in Arabidopsis development and acts in C function in the flower Development 129:1085-1094
- Cheng SH, Sheen J, Gerrish C, Bolwell GP (2001) Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active Arabidopsis CDPK expressed in maize protoplasts FEBS letters 503:185-188
- Chico JM, Raices M, Tellez-Inon MT, Ulloa RM (2002) A calcium-dependent protein kinase is systemically induced upon wounding in tomato plants Plant physiology 128:256-270
- Chincinska I et al. (2013) Photoperiodic regulation of the sucrose transporter StSUT4 affects the expression of circadian-regulated genes and ethylene production Frontiers in plant science 4:26 doi:10.3389/fpls.2013.00026
- Chincinska IA, Liesche J, Krugel U, Michalska J, Geigenberger P, Grimm B, Kuhn C (2008) Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response Plant physiology 146:515-528 doi:10.1104/pp.107.112334
- Chiu JC, Brenner ED, DeSalle R, Nitabach MN, Holmes TC, Coruzzi GM (2002) Phylogenetic and expression analysis of the glutamate-receptor-like gene family in Arabidopsis thaliana Molecular biology and evolution 19:1066-1082
- Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors The Journal of biological chemistry 275:1723-1730
- Choi HI et al. (2005) Arabidopsis calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity Plant physiology 139:1750-1761 doi:10.1104/pp.105.069757

- Christodoulou J, Malmendal A, Harper JF, Chazin WJ (2004) Evidence for differing roles for each lobe of the calmodulin-like domain in a calcium-dependent protein kinase *The Journal of biological chemistry* 279:29092-29100 doi:10.1074/jbc.M401297200
- Clark KL, Oelke A, Johnson ME, Eilert KD, Simpson PC, Todd SC (2004) CD81 associates with 14-3-3 in a redox-regulated palmitoylation-dependent manner *The Journal of biological chemistry* 279:19401-19406 doi:10.1074/jbc.M312626200
- Cosgrove DJ, Hedrich R (1991) Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L *Planta* 186:143-153
- Cuellar TL, McManus MT (2005) MicroRNAs and endocrine biology *The Journal of endocrinology* 187:327-332 doi:10.1677/joe.1.06426
- Cuperus JT, Fahlgren N, Carrington JC (2011) Evolution and functional diversification of MIRNA genes *The Plant cell* 23:431-442 doi:10.1105/tpc.110.082784
- Curran A et al. (2011) Calcium-dependent protein kinases from *Arabidopsis* show substrate specificity differences in an analysis of 103 substrates *Frontiers in plant science* 2:36 doi:10.3389/fpls.2011.00036
- D'Agostino IB, Deruere J, Kieber JJ (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin *Plant physiology* 124:1706-1717
- Dammann C et al. (2003) Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from *Arabidopsis* *Plant physiology* 132:1840-1848
- Davletova S et al. (2001) Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells *Journal of experimental botany* 52:215-221
- DeFalco TA, Bender KW, Snedden WA (2010) Breaking the code: Ca<sup>2+</sup> sensors in plant signalling *The Biochemical journal* 425:27-40 doi:10.1042/bj20091147
- Demidchik V, Davenport RJ, Tester M (2002) Nonselective cation channels in plants *Annual review of plant biology* 53:67-107 doi:10.1146/annurev.arplant.53.091901.161540
- Demidchik V, Maathuis FJ (2007) Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development *The New phytologist* 175:387-404 doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02128.x
- Donaldson LA (2001) Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view *Phytochemistry* 57:859-873
- Douglas P, Moorhead G, Hong Y, Morrice N, MacKintosh C (1998) Purification of a nitrate reductase kinase from *Spinacea oleracea* leaves, and its identification as a calmodulin-domain protein kinase *Planta* 206:435-442
- Drobak BK, Ferguson IB (1985) Release of Ca<sup>2+</sup> from plant hypocotyl microsomes by inositol-1,4,5-trisphosphate *Biochemical and biophysical research communications* 130:1241-1246
- Dutta R, Robinson KR (2004) Identification and characterization of stretch-activated ion channels in pollen protoplasts *Plant physiology* 135:1398-1406 doi:10.1104/pp.104.041483
- Edel KH, Kudla J (2015) Increasing complexity and versatility: How the calcium signaling toolkit was shaped during plant land colonization *Cell calcium* 57:231-246 doi:10.1016/j.ceca.2014.10.013
- Eriksson ME, Israelsson M, Olsson O, Moritz T (2000) Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length *Nature biotechnology* 18:784-788 doi:10.1038/77355
- Estruch JJ, Kadwell S, Merlin E, Crossland L (1994) Cloning and characterization of a maize pollen-specific calcium-dependent calmodulin-independent protein kinase *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:8837-8841
- Ewing EE, Struik PC (1992) Tuber Formation in Potato: Induction, Initiation, and Growth. In: *Horticultural Reviews*. John Wiley & Sons, Inc., pp 89-198. doi:10.1002/9780470650523.ch3
- Fahlgren N et al. (2010) MicroRNA gene evolution in *Arabidopsis lyrata* and *Arabidopsis thaliana* *The Plant cell* 22:1074-1089 doi:10.1105/tpc.110.073999
- Felcher KJ et al. (2012) Integration of two diploid potato linkage maps with the potato genome sequence *PloS one* 7:e36347 doi:10.1371/journal.pone.0036347
- Finkler A, Kaplan B, Fromm H (2007) Ca-Responsive cis-Elements in Plants *Plant signaling & behavior* 2:17-19
- Freyemark G, Diehl T, Miklis M, Romeis T, Panstruga R (2007) Antagonistic control of powdery mildew host cell entry by barley calcium-dependent protein kinases (CDPKs) *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 20:1213-1221 doi:10.1094/MPMI-20-10-1213
- Fukaki H, Okushima Y, Tasaka M (2007) Auxin-mediated lateral root formation in higher plants *International review of cytology* 256:111-137 doi:10.1016/S0074-7696(07)56004-3

- Gargantini PR, Giammaria V, Grandellis C, Feingold SE, Maldonado S, Ulloa RM (2009) Genomic and functional characterization of StCDPK1 *Plant molecular biology* 70:153-172 doi:10.1007/s11103-009-9462-5
- Gargantini PR et al. (2006) A CDPK isoform participates in the regulation of nodule number in *Medicago truncatula* *The Plant journal : for cell and molecular biology* 48:843-856 doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02910.x
- Geiger D et al. (2011) Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1 *Science signaling* 4:ra32 doi:10.1126/scisignal.2001346
- Giacometti S, Marrano CA, Bonza MC, Luoni L, Limonta M, De Michelis MI (2012) Phosphorylation of serine residues in the N-terminus modulates the activity of ACA8, a plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase of *Arabidopsis thaliana* *Journal of experimental botany* 63:1215-1224 doi:10.1093/jxb/err346
- Giammaria V, Grandellis C, Bachmann S, Gargantini PR, Feingold SE, Bryan G, Ulloa RM (2011) StCDPK2 expression and activity reveal a highly responsive potato calcium-dependent protein kinase involved in light signalling *Planta* 233:593-609 doi:10.1007/s00425-010-1319-2
- Gilroy S, Read ND, Trewavas AJ (1990) Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol triphosphate initiates stomatal closure *Nature* 346:769-771 doi:10.1038/346769a0
- Gonzalez-Schain ND, Diaz-Mendoza M, Zurczak M, Suarez-Lopez P (2012) Potato CONSTANS is involved in photoperiodic tuberization in a graft-transmissible manner *The Plant journal : for cell and molecular biology* 70:678-690 doi:10.1111/j.1365-313X.2012.04909.x
- Grabov A, Blatt MR (1998) Membrane voltage initiates Ca<sup>2+</sup> waves and potentiates Ca<sup>2+</sup> increases with abscisic acid in stomatal guard cells *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:4778-4783
- Grandellis C, Giammaria V, Bialer M, Santin F, Lin T, Hannapel DJ, Ulloa RM (2012) The novel *Solanum tuberosum* calcium dependent protein kinase, StCDPK3, is expressed in actively growing organs *Planta* 236:1831-1848 doi:10.1007/s00425-012-1732-9
- Gregory LE (1956) Some Factors for Tuberization in the Potato *Plant American Journal of Botany* 43:281-288 doi:10.2307/2438945
- Guleria P, Mahajan M, Bhardwaj J, Yadav SK (2011) Plant small RNAs: biogenesis, mode of action and their roles in abiotic stresses *Genomics, proteomics & bioinformatics* 9:183-199 doi:10.1016/S1672-0229(11)60022-3
- Gutermuth T et al. (2013) Pollen tube growth regulation by free anions depends on the interaction between the anion channel SLAH3 and calcium-dependent protein kinases CPK2 and CPK20 *The Plant cell* 25:4525-4543 doi:10.1105/tpc.113.118463
- Gutierrez L, Bussell JD, Pacurar DI, Schwambach J, Pacurar M, Bellini C (2009) Phenotypic plasticity of adventitious rooting in *Arabidopsis* is controlled by complex regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR transcripts and microRNA abundance *The Plant cell* 21:3119-3132 doi:10.1105/tpc.108.064758
- Hamel LP, Sheen J, Seguin A (2014) Ancient signals: comparative genomics of green plant CDPKs *Trends in plant science* 19:79-89 doi:10.1016/j.tplants.2013.10.009
- Hamilton JP et al. (2011) Single nucleotide polymorphism discovery in elite North American potato germplasm *BMC genomics* 12:302 doi:10.1186/1471-2164-12-302
- Hannapel DJ (2010) A model system of development regulated by the long-distance transport of mRNA *Journal of integrative plant biology* 52:40-52 doi:10.1111/j.1744-7909.2010.00911.x
- Harmon AC (2003) Calcium-regulated protein kinases of plants *Gravitational and space biology bulletin : publication of the American Society for Gravitational and Space Biology* 16:83-90
- Harmon AC, Putnam-Evans C, Cormier MJ (1987) A calcium-dependent but calmodulin-independent protein kinase from soybean *Plant physiology* 83:830-837
- Harper JF (2001) Dissecting calcium oscillators in plant cells *Trends in plant science* 6:395-397 doi:10.1016/S1360-1385(01)02023-4
- Harper JF, Binder BM, Sussman MR (1993) Calcium and lipid regulation of an *Arabidopsis* protein kinase expressed in *Escherichia coli* *Biochemistry* 32:3282-3290
- Harper JF, Harmon A (2005) Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection *Nature reviews Molecular cell biology* 6:555-566 doi:10.1038/nrm1679
- Harper JF, Sussman MR, Schaller GE, Putnam-Evans C, Charbonneau H, Harmon AC (1991) A calcium-dependent protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin *Science* 252:951-954

- Hatton D, Sablowski R, Yung MH, Smith C, Schuch W, Bevan M (1995) Two classes of cis sequences contribute to tissue-specific expression of a PAL2 promoter in transgenic tobacco *The Plant journal : for cell and molecular biology* 7:859-876
- Hattori T, Totsuka M, Hobo T, Kagaya Y, Yamamoto-Toyoda A (2002) Experimentally determined sequence requirement of ACGT-containing abscisic acid response element *Plant & cell physiology* 43:136-140
- Hauffe KD, Lee SP, Subramaniam R, Douglas CJ (1993) Combinatorial interactions between positive and negative cis-acting elements control spatial patterns of 4CL-1 expression in transgenic tobacco *The Plant journal : for cell and molecular biology* 4:235-253
- Hedden P, Thomas SG (2012) Gibberellin biosynthesis and its regulation *The Biochemical journal* 444:11-25 doi:10.1042/BJ20120245
- Hernandez Sebastia C, Hardin SC, Clouse SD, Kieber JJ, Huber SC (2004) Identification of a new motif for CDPK phosphorylation in vitro that suggests ACC synthase may be a CDPK substrate *Archives of biochemistry and biophysics* 428:81-91 doi:10.1016/j.abb.2004.04.025
- Hettenhausen C, Yang DH, Baldwin IT, Wu J (2013) Calcium-dependent protein kinases, CDPK4 and CDPK5, affect early steps of jasmonic acid biosynthesis in *Nicotiana attenuata* *Plant signaling & behavior* 8:e22784 doi:10.4161/psb.22784
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999 *Nucleic acids research* 27:297-300
- Hou C et al. (2014) DUF221 proteins are a family of osmosensitive calcium-permeable cation channels conserved across eukaryotes *Cell research* 24:632-635 doi:10.1038/cr.2014.14
- Hua B-G, Mercier RW, Zielinski RE, Berkowitz GA (2003) Functional interaction of calmodulin with a plant cyclic nucleotide gated cation channel *Plant Physiology and Biochemistry* 41:945-954 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2003.07.006>
- Huang F, Zago MK, Abas L, van Marion A, Galvan-Ampudia CS, Offringa R (2010) Phosphorylation of conserved PIN motifs directs Arabidopsis PIN1 polarity and auxin transport *The Plant cell* 22:1129-1142 doi:10.1105/tpc.109.072678
- Huang QS, Wang HY, Gao P, Wang GY, Xia GX (2008) Cloning and characterization of a calcium dependent protein kinase gene associated with cotton fiber development *Plant cell reports* 27:1869-1875 doi:10.1007/s00299-008-0603-0
- Huang SJ, Chang CL, Wang PH, Tsai MC, Hsu PH, Chang IF (2013) A type III ACC synthase, ACS7, is involved in root gravitropism in *Arabidopsis thaliana* *Journal of experimental botany* 64:4343-4360 doi:10.1093/jxb/ert241
- Huarte M, Capezio S (2013) Cultivo de papa. In: *Agricultura y ganadería pampeanas*. 1a edn. EUDEM, Mar del Plata, pp 172-202
- Huda KM, Banu MS, Garg B, Tula S, Tuteja R, Tuteja N (2013) OsACA6, a P-type IIB Ca(2)(+) ATPase promotes salinity and drought stress tolerance in tobacco by ROS scavenging and enhancing the expression of stress-responsive genes *The Plant journal : for cell and molecular biology* 76:997-1015 doi:10.1111/tpj.12352
- Hussey SG, Mizrahi E, Creux NM, Myburg AA (2013) Navigating the transcriptional roadmap regulating plant secondary cell wall deposition *Frontiers in plant science* 4:325 doi:10.3389/fpls.2013.00325
- Hwang I, Harper JF, Liang F, Sze H (2000a) Calmodulin activation of an endoplasmic reticulum-located calcium pump involves an interaction with the N-terminal autoinhibitory domain *Plant physiology* 122:157-168
- Hwang I, Sze H, Harper JF (2000b) A calcium-dependent protein kinase can inhibit a calmodulin-stimulated Ca<sup>2+</sup> pump (ACA2) located in the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:6224-6229
- Ibraheem O, Botha CE, Bradley G (2010) In silico analysis of cis-acting regulatory elements in 5' regulatory regions of sucrose transporter gene families in rice (*Oryza sativa Japonica*) and *Arabidopsis thaliana* *Computational biology and chemistry* 34:268-283 doi:10.1016/j.compbiolchem.2010.09.003
- Ishida S, Yuasa T, Nakata M, Takahashi Y (2008) A tobacco calcium-dependent protein kinase, CDPK1, regulates the transcription factor REPRESSION OF SHOOT GROWTH in response to gibberellins *The Plant cell* 20:3273-3288 doi:10.1105/tpc.107.057489
- Israelsson M, Eriksson ME, Hertzberg M, Aspeborg H, Nilsson P, Moritz T (2003) Changes in gene expression in the wood-forming tissue of transgenic hybrid aspen with increased secondary growth *Plant molecular biology* 52:893-903

- Ito T, Nakata M, Fukazawa J, Ishida S, Takahashi Y (2010) Alteration of substrate specificity: the variable N-terminal domain of tobacco Ca(2+)-dependent protein kinase is important for substrate recognition *The Plant cell* 22:1592-1604 doi:10.1105/tpc.109.073577
- Iwasaki T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1995) Identification of a cis-regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis *Molecular & general genetics* : MGG 247:391-398
- Jackson SD (1999) Multiple signaling pathways control tuber induction in potato *Plant physiology* 119:1-8
- Jelich-Ottmann C, Weiler EW, Oecking C (2001) Binding of regulatory 14-3-3 proteins to the C terminus of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase involves part of its autoinhibitory region *The Journal of biological chemistry* 276:39852-39857 doi:10.1074/jbc.M106746200
- Jing Q et al. (2005) Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability *Cell* 120:623-634 doi:10.1016/j.cell.2004.12.038
- Jones-Rhoades MW (2012) Conservation and divergence in plant microRNAs *Plant molecular biology* 80:3-16 doi:10.1007/s11103-011-9829-2
- Kalinina EV, Fricker LD (2003) Palmitoylation of carboxypeptidase D. Implications for intracellular trafficking *The Journal of biological chemistry* 278:9244-9249
- Kang CH et al. (2013) Rice small C2-domain proteins are phosphorylated by calcium-dependent protein kinase *Molecules and cells* 35:381-387 doi:10.1007/s10059-013-2185-0
- Kim J et al. (2005) microRNA-directed cleavage of ATHB15 mRNA regulates vascular development in *Arabidopsis* inflorescence stems *The Plant journal : for cell and molecular biology* 42:84-94 doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02354.x
- Kim VN (2005) Small RNAs: classification, biogenesis, and function *Molecules and cells* 19:1-15
- Kloosterman B, Vorst O, Hall RD, Visser RG, Bachem CW (2005) Tuber on a chip: differential gene expression during potato tuber development *Plant biotechnology journal* 3:505-519 doi:10.1111/j.1467-7652.2005.00141.x
- Knight H, Knight MR (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk *Trends in plant science* 6:262-267
- Kobayashi M et al. (2007) Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase *The Plant cell* 19:1065-1080 doi:10.1105/tpc.106.048884
- Komatsu S, Yang G, Khan M, Onodera H, Toki S, Yamaguchi M (2007) Over-expression of calcium-dependent protein kinase 13 and calreticulin interacting protein 1 confers cold tolerance on rice plants *Molecular genetics and genomics* : MGG 277:713-723 doi:10.1007/s00438-007-0220-6
- Kudla J, Batistic O, Hashimoto K (2010) Calcium signals: the lead currency of plant information processing *The Plant cell* 22:541-563 doi:10.1105/tpc.109.072686
- Kumar D, Wareing PF (1974) STUDIES ON TUBERIZATION OF SOLANUM ANDIGENA *New Phytologist* 73:833-840 doi:10.1111/j.1469-8137.1974.tb01311.x
- Kunz C, Chang A, Faure J-D, Clarke A, Polya G, Anderson M (1996) Phosphorylation of style S-RNases by Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases from pollen tubes *Sexual Plant Reprod* 9:25-34 doi:10.1007/BF00230363
- Lakhota N et al. (2014) Identification and characterization of miRNAome in root, stem, leaf and tuber developmental stages of potato (*Solanum tuberosum* L.) by high-throughput sequencing *BMC plant biology* 14:6 doi:10.1186/1471-2229-14-6
- Lanteri ML, Pagnussat GC, Lamattina L (2006) Calcium and calcium-dependent protein kinases are involved in nitric oxide- and auxin-induced adventitious root formation in cucumber *Journal of experimental botany* 57:1341-1351 doi:10.1093/jxb/erj109
- Le K, Li Z, Lei Z, Qingzhang W, Anming D, Peng Z, Guanshan L (2013) Cloning and Expression of Calcium-dependent Protein Kinase 15 (NtCDPK15) in *Nicotiana tabacum* *Chinese Tobacco Science*:48-54
- Lemtiri-Chlieh F et al. (2003) Inositol hexakisphosphate mobilizes an endomembrane store of calcium in guard cells *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:10091-10095 doi:10.1073/pnas.1133289100
- Lescot M et al. (2002) PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences *Nucleic acids research* 30:325-327
- Li G, Boudsocq M, Hem S, Vialaret J, Rossignol M, Maurel C, Santoni V (2014) The calcium-dependent protein kinase CPK7 acts on root hydraulic conductivity *Plant, cell & environment* doi:10.1111/pce.12478

- Li WG, Komatsu S (2000) Cold stress-induced calcium-dependent protein kinase(s) in rice (*Oryza sativa* L.) seedling stem tissues *Theor Appl Genet* 101:355-363 doi:10.1007/s001220051491
- Li Y, Liu ZB, Shi X, Hagen G, Guilfoyle TJ (1994) An auxin-inducible element in soybean SAUR promoters *Plant physiology* 106:37-43
- Liesche J, Krugel U, He H, Chincinska I, Hackel A, Kuhn C (2011) Sucrose transporter regulation at the transcriptional, post-transcriptional and post-translational level *Journal of plant physiology* 168:1426-1433 doi:10.1016/j.jplph.2011.02.005
- Liu G, Chen J, Wang X (2006) VcCPK1, a gene encoding calcium-dependent protein kinase from *Vicia faba*, is induced by drought and abscisic acid *Plant, cell & environment* 29:2091-2099 doi:10.1111/j.1365-3040.2006.01582.x
- Liu Q, Halvey PJ, Shyr Y, Slebos RJ, Liebler DC, Zhang B (2013a) Integrative omics analysis reveals the importance and scope of translational repression in microRNA-mediated regulation *Molecular & cellular proteomics : MCP* 12:1900-1911 doi:10.1074/mcp.M112.025783
- Liu WX, Zhang FC, Zhang WZ, Song LF, Wu WH, Chen YF (2013b) Arabidopsis Di19 functions as a transcription factor and modulates PR1, PR2, and PR5 expression in response to drought stress *Molecular plant* 6:1487-1502 doi:10.1093/mp/sst031
- Liu ZB, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997) A G-Box-Binding Protein from Soybean Binds to the E1 Auxin-Response Element in the Soybean GH3 Promoter and Contains a Proline-Rich Repression Domain *Plant physiology* 115:397-407
- Lu C, Fedoroff N (2000) A mutation in the Arabidopsis HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin *The Plant cell* 12:2351-2366
- Luan S, Kudla J, Rodriguez-Concepcion M, Yalovsky S, Gruissem W (2002) Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants *The Plant cell* 14 Suppl:S389-400
- Ludwig AA et al. (2005) Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:10736-10741 doi:10.1073/pnas.0502954102
- Luo X, Chen Z, Gao J, Gong Z (2014) Abscisic acid inhibits root growth in Arabidopsis through ethylene biosynthesis *The Plant journal : for cell and molecular biology* 79:44-55 doi:10.1111/tpj.12534
- Ma SY, Wu WH (2007) AtCPK23 functions in Arabidopsis responses to drought and salt stresses *Plant molecular biology* 65:511-518 doi:10.1007/s11103-007-9187-2
- MacIntosh GC, Ulloa RM, Raices M, Tellez-Inon MT (1996) Changes in Calcium-Dependent Protein Kinase Activity during in Vitro Tuberization in Potato *Plant physiology* 112:1541-1550
- Mahajan A, Bhogale S, Kang IH, Hannapel DJ, Banerjee AK (2012) The mRNA of a Knotted1-like transcription factor of potato is phloem mobile *Plant molecular biology* 79:595-608 doi:10.1007/s11103-012-9931-0
- Mall TK et al. (2011) Expression of the rice CDPK-7 in sorghum: molecular and phenotypic analyses *Plant molecular biology* 75:467-479 doi:10.1007/s11103-011-9741-9
- Mallory AC, Vaucheret H (2006) Functions of microRNAs and related small RNAs in plants *Nature genetics* 38 Suppl:S31-36 doi:10.1038/ng1791
- Manimaran P, Mangrauthia SK, Sundaram RM, Balachandran SM (2015) Constitutive expression and silencing of a novel seed specific calcium dependent protein kinase gene in rice reveals its role in grain filling *Journal of plant physiology* 174:41-48 doi:10.1016/j.jplph.2014.09.005
- Martin A, Adam H, Diaz-Mendoza M, Zurczak M, Gonzalez-Schain ND, Suarez-Lopez P (2009) Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA miR172 *Development* 136:2873-2881 doi:10.1242/dev.031658
- Martinez J, Feltl T, Scanlon CH, Lumsden PJ, Machackova I (2000) Subcellular localization of a high affinity binding site for D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate from *Chenopodium rubrum* *Plant physiology* 124:475-483
- Matarasso N, Schuster S, Avni A (2005) A novel plant cysteine protease has a dual function as a regulator of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic Acid synthase gene expression *The Plant cell* 17:1205-1216 doi:10.1105/tpc.105.030775
- Matschi S, Hake K, Herde M, Hause B, Romeis T (2015) The Calcium-Dependent Protein Kinase CPK28 Regulates Development by Inducing Growth Phase-Specific, Spatially Restricted Alterations in Jasmonic Acid Levels Independent of Defense Responses in Arabidopsis *The Plant cell* doi:10.1105/tpc.15.00024
- Matschi S, Werner S, Schulze WX, Legen J, Hilger HH, Romeis T (2013) Function of calcium-dependent protein kinase CPK28 of Arabidopsis thaliana in plant stem elongation and vascular development *The Plant journal : for cell and molecular biology* 73:883-896 doi:10.1111/tpj.12090

- Mauriat M, Moritz T (2009) Analyses of GA20ox- and GID1-over-expressing aspen suggest that gibberellins play two distinct roles in wood formation *The Plant journal : for cell and molecular biology* 58:989-1003 doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03836.x
- McAinsh MR, Webb A, Taylor JE, Hetherington AM (1995) Stimulus-Induced Oscillations in Guard Cell Cytosolic Free Calcium *The Plant cell* 7:1207-1219 doi:10.1105/tpc.7.8.1207
- McMichael RW, Jr., Bachmann M, Huber SC (1995) Spinach Leaf Sucrose-Phosphate Synthase and Nitrate Reductase Are Phosphorylated/Inactivated by Multiple Protein Kinases *In vitro Plant physiology* 108:1077-1082
- Miedema H, Bothwell JH, Brownlee C, Davies JM (2001) Calcium uptake by plant cells--channels and pumps acting in concert *Trends in plant science* 6:514-519
- Muir SR, Sanders D (1996) Pharmacology of Ca<sup>2+</sup> release from red beet microsomes suggests the presence of ryanodine receptor homologs in higher plants *FEBS letters* 395:39-42
- Mundy J, Yamaguchi-Shinozaki K, Chua NH (1990) Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice rab gene *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:1406-1410
- Muniz Garcia MN, Giammaria V, Grandellis C, Tellez-Inon MT, Ulloa RM, Capiati DA (2012) Characterization of StABF1, a stress-responsive bZIP transcription factor from *Solanum tuberosum* L. that is phosphorylated by StCDPK2 *in vitro Planta* 235:761-778 doi:10.1007/s00425-011-1540-7
- Myers C et al. (2009) Calcium-dependent protein kinases regulate polarized tip growth in pollen tubes *The Plant journal : for cell and molecular biology* 59:528-539 doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03894.x
- Nag R, Maity MK, Dasgupta M (2005) Dual DNA binding property of ABA insensitive 3 like factors targeted to promoters responsive to ABA and auxin *Plant molecular biology* 59:821-838 doi:10.1007/s11103-005-1387-z
- Nakagawa Y et al. (2007) Arabidopsis plasma membrane protein crucial for Ca<sup>2+</sup> influx and touch sensing in roots *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:3639-3644 doi:10.1073/pnas.0607703104
- Nakai T et al. (1998) An increase in apparent affinity for sucrose of mung bean sucrose synthase is caused by *in vitro* phosphorylation or directed mutagenesis of Ser11 *Plant & cell physiology* 39:1337-1341
- Navarro-Lerida I, Corvi MM, Barrientos AA, Gavilanes F, Berthiaume LG, Rodriguez-Crespo I (2004) Palmitoylation of inducible nitric-oxide synthase at Cys-3 is required for proper intracellular traffic and nitric oxide synthesis *The Journal of biological chemistry* 279:55682-55689 doi:10.1074/jbc.M406621200
- Navarro C et al. (2011) Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T *Nature* 478:119-122 doi:10.1038/nature10431
- Navazio L, Bewell MA, Siddiqua A, Dickinson GD, Galione A, Sanders D (2000) Calcium release from the endoplasmic reticulum of higher plants elicited by the NADP metabolite nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:8693-8698 doi:10.1073/pnas.140217897
- Ogasawara Y et al. (2008) Synergistic activation of the Arabidopsis NADPH oxidase AtrbohD by Ca<sup>2+</sup> and phosphorylation *The Journal of biological chemistry* 283:8885-8892 doi:10.1074/jbc.M708106200
- Ookura T, Komatsu S, Kawamura Y, Kasamo K (2005) A 55-kDa Calcium Dependent Protein Kinase Phosphorylated Thr Residues from the Auto-Regulatory Domain of Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase in Rice *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ* 39:99-104 doi:10.6090/jarq.39.99
- Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X (2002) CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana *Current biology : CB* 12:1484-1495
- Patharkar OR, Cushman JC (2000) A stress-induced calcium-dependent protein kinase from *Mesembryanthemum crystallinum* phosphorylates a two-component pseudo-response regulator *The Plant journal : for cell and molecular biology* 24:679-691
- Patharkar OR, Cushman JC (2006) A novel coiled-coil protein co-localizes and interacts with a calcium-dependent protein kinase in the common ice plant during low-humidity stress *Planta* 225:57-73 doi:10.1007/s00425-006-0330-0
- Peiter E, Maathuis FJ, Mills LN, Knight H, Pelloux J, Hetherington AM, Sanders D (2005) The vacuolar Ca<sup>2+</sup>-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement *Nature* 434:404-408 doi:10.1038/nature03381
- Podell S, Gribskov M (2004) Predicting N-terminal myristoylation sites in plant proteins *BMC genomics* 5:37 doi:10.1186/1471-2164-5-37

- Potato Genome Sequencing C et al. (2011) Genome sequence and analysis of the tuber crop potato *Nature* 475:189-195 doi:10.1038/nature10158
- Prat S et al. (1990) Gene expression during tuber development in potato plants *FEBS letters* 268:334-338
- Qin LX, Li Y, Li DD, Xu WL, Zheng Y, Li XB (2014) Arabidopsis drought-induced protein Di19-3 participates in plant response to drought and high salinity stresses *Plant molecular biology* 86:609-625 doi:10.1007/s11103-014-0251-4
- Raes J, Rohde A, Christensen JH, Van de Peer Y, Boerjan W (2003) Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis *Plant physiology* 133:1051-1071 doi:10.1104/pp.103.026484
- Raices M, Chico JM, Tellez-Inon MT, Ulloa RM (2001) Molecular characterization of StCDPK1, a calcium-dependent protein kinase from *Solanum tuberosum* that is induced at the onset of tuber development *Plant molecular biology* 46:591-601
- Raices M, Gargantini PR, Chinchilla D, Crespi M, Tellez-Inon MT, Ulloa RM (2003a) Regulation of CDPK isoforms during tuber development *Plant molecular biology* 52:1011-1024
- Raices M, MacIntosh GC, Ulloa RM, Gargantini PR, Vozza NF, Tellez-Inon MT (2003b) Sucrose increases calcium-dependent protein kinase and phosphatase activities in potato plants *Cellular and molecular biology* 49:959-964
- Raices M, Ulloa RM, MacIntosh GC, Crespi M, Tellez-Inon MT (2003c) StCDPK1 is expressed in potato stolon tips and is induced by high sucrose concentration *Journal of experimental botany* 54:2589-2591 doi:10.1093/jxb/erg282
- Rawat R, Xu ZF, Yao KM, Chye ML (2005) Identification of cis-elements for ethylene and circadian regulation of the *Solanum melongena* gene encoding cysteine proteinase *Plant molecular biology* 57:629-643 doi:10.1007/s11103-005-0954-7
- Reeve RM, Hautala E, Weaver ML (1969) Anatomy and compositional variation within potatoes *American Potato Journal* 46:361-373 doi:10.1007/BF02869557
- Reichert AI, He XZ, Dixon RA (2009) Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from tobacco (*Nicotiana tabacum*): characterization of the four tobacco PAL genes and active heterotetrameric enzymes *The Biochemical journal* 424:233-242 doi:10.1042/BJ20090620
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002) Prediction of plant microRNA targets *Cell* 110:513-520
- Rigo G et al. (2013) Inactivation of plasma membrane-localized CDPK-RELATED KINASE5 decelerates PIN2 exocytosis and root gravitropic response in Arabidopsis *The Plant cell* 25:1592-1608 doi:10.1105/tpc.113.110452
- Rodriguez-Falcon M, Bou J, Prat S (2006) Seasonal control of tuberization in potato: conserved elements with the flowering response *Annual review of plant biology* 57:151-180 doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105224
- Rodriguez Milla MA, Uno Y, Chang IF, Townsend J, Maher EA, Quilici D, Cushman JC (2006) A novel yeast two-hybrid approach to identify CDPK substrates: characterization of the interaction between AtCPK11 and AtDi19, a nuclear zinc finger protein *FEBS letters* 580:904-911 doi:10.1016/j.febslet.2006.01.013
- Romeis T, Herde M (2014) From local to global: CDPKs in systemic defense signaling upon microbial and herbivore attack *Current opinion in plant biology* 20:1-10 doi:10.1016/j.pbi.2014.03.002
- Romeis T, Ludwig AA, Martin R, Jones JD (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response *The EMBO journal* 20:5556-5567 doi:10.1093/emboj/20.20.5556
- Romeis T, Piedras P, Jones JD (2000) Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response *The Plant cell* 12:803-816
- Rosin FM, Hart JK, Horner HT, Davies PJ, Hannapel DJ (2003) Overexpression of a knotted-like homeobox gene of potato alters vegetative development by decreasing gibberellin accumulation *Plant physiology* 132:106-117 doi:10.1104/pp.102.015560
- Roumeliotis E, Kloosterman B, Oortwijn M, Kohlen W, Bouwmeester HJ, Visser RG, Bachem CW (2012a) The effects of auxin and strigolactones on tuber initiation and stolon architecture in potato *Journal of experimental botany* 63:4539-4547 doi:10.1093/jxb/ers132
- Roumeliotis E, Kloosterman B, Oortwijn M, Visser RG, Bachem CW (2013) The PIN family of proteins in potato and their putative role in tuberization *Frontiers in plant science* 4:524 doi:10.3389/fpls.2013.00524
- Roumeliotis E, Visser RG, Bachem CW (2012b) A crosstalk of auxin and GA during tuber development *Plant signaling & behavior* 7:1360-1363 doi:10.4161/psb.21515

- Ruan YL (2012) Signaling role of sucrose metabolism in development *Molecular plant* 5:763-765 doi:10.1093/mp/sss046
- 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 physiology* 129:156-168 doi:10.1104/pp.000869
- Saijo Y, Hata S, Kyoizuka J, Shimamoto K, Izui K (2000) Over-expression of a single Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants *The Plant journal : for cell and molecular biology* 23:319-327
- Sanders D, Brownlee C, Harper JF (1999) Communicating with calcium *The Plant cell* 11:691-706
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF (2002) Calcium at the crossroads of signaling *The Plant cell* 14 Suppl:S401-417
- Sasayama D, Ganguly A, Park M, Cho HT (2013) The M3 phosphorylation motif has been functionally conserved for intracellular trafficking of long-looped PIN-FORMEDs in the Arabidopsis root hair cell *BMC plant biology* 13:189 doi:10.1186/1471-2229-13-189
- Scherzer S, Maierhofer T, Al-Rasheid KA, Geiger D, Hedrich R (2012) Multiple calcium-dependent kinases modulate ABA-activated guard cell anion channels *Molecular plant* 5:1409-1412 doi:10.1093/mp/sss084
- Schnabel E, Journet EP, 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 molecular biology* 58:809-822 doi:10.1007/s11103-005-8102-y
- Schumaker KS, Sze H (1987) Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca<sup>2+</sup> from vacuolar membrane vesicles of oat roots *The Journal of biological chemistry* 262:3944-3946
- Scruse-Field SA, Knight MR (2003) Calcium: just a chemical switch? *Current opinion in plant biology* 6:500-506
- Sheen J, Zhou L, Jang JC (1999) Sugars as signaling molecules *Current opinion in plant biology* 2:410-418
- Shen Q, Ho TH (1995) Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element *The Plant cell* 7:295-307
- Snedden WA, Fromm H (2001) Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants *New Phytologist* 151:35-66 doi:10.1046/j.1469-8137.2001.00154.x
- Steinhorst L, Kudla J (2014) Signaling in cells and organisms - calcium holds the line *Current opinion in plant biology* 22:14-21 doi:10.1016/j.pbi.2014.08.003
- Suarez-Lopez P (2005) Long-range signalling in plant reproductive development *The International journal of developmental biology* 49:761-771 doi:10.1387/ijdb.052002ps
- Sugiyama K-i, Mori IC, Takahashi K, Muto S, Shihira-Ishikawa I (2000) A calcium-dependent protein kinase functions in wound healing in *Ventricaria ventricosa* (chlorophyta) *Journal of Phycology* 36:1145-1152 doi:10.1046/j.1529-8817.2000.00050.x
- Szczegieliński J et al. (2005) A wound-responsive and phospholipid-regulated maize calcium-dependent protein kinase *Plant physiology* 139:1970-1983 doi:10.1104/pp.105.066472
- Sze H, Liang F, Hwang I, Curran AC, Harper JF (2000) Diversity and regulation of plant Ca<sup>2+</sup> pumps: insights from expression in yeast *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 51:433-462 doi:10.1146/annurev.arplant.51.1.433
- Tanaka K, Swanson SJ, Gilroy S, Stacey G (2010) Extracellular nucleotides elicit cytosolic free calcium oscillations in Arabidopsis *Plant physiology* 154:705-719 doi:10.1104/pp.110.162503
- Tang GQ, Novitzky WP, Carol Griffin H, Huber SC, Dewey RE (2005) Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation *The Plant journal : for cell and molecular biology* 44:433-446 doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02535.x
- Tatsuki M, Mori H (2001) Phosphorylation of tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, LE-ACS2, at the C-terminal region *The Journal of biological chemistry* 276:28051-28057 doi:10.1074/jbc.M101543200
- Thion L, Mazars C, Nacry P, Bouchez D, Moreau M, Ranjeva R, Thuleau P (1998) Plasma membrane depolarization-activated calcium channels, stimulated by microtubule-depolymerizing drugs in wild-type Arabidopsis thaliana protoplasts, display constitutively large activities and a longer half-life in ton 2 mutant cells affected in the organization of cortical microtubules *The Plant journal : for cell and molecular biology* 13:603-610
- Thompson GA, Jr., Okuyama H (2000) Lipid-linked proteins of plants *Progress in lipid research* 39:19-39
- Tsuji H, Nakamura H, Taoka K, Shimamoto K (2013) Functional diversification of FD transcription factors in rice, components of florigen activation complexes *Plant & cell physiology* 54:385-397 doi:10.1093/pcp/pct005

- Turck F, Fornara F, Coupland G (2008) Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage Annual review of plant biology 59:573-594 doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092755
- Ulloa RM, Mac Intosh GC, Melchiorre M, Mentaberry AN, Dallari P, Moriconi DN, Téllez-Iñón MT (1997) Protein kinase activity in different stages of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtuberization Plant cell reports 16:426-429 doi:10.1007/BF01146787
- Ulloa RM, Raices M, MacIntosh GC, Maldonado S, Tellez-Inon MT (2002) Jasmonic acid affects plant morphology and calcium-dependent protein kinase expression and activity in *Solanum tuberosum* Physiologia plantarum 115:417-427
- Uno Y, Rodriguez Milla MA, Maher E, Cushman JC (2009) Identification of proteins that interact with catalytically active calcium-dependent protein kinases from Arabidopsis Molecular genetics and genomics : MGG 281:375-390 doi:10.1007/s00438-008-0419-1
- Valmonte GR, Arthur K, Higgins CM, MacDiarmid RM (2014) Calcium-dependent protein kinases in plants: evolution, expression and function Plant & cell physiology 55:551-569 doi:10.1093/pcp/pct200
- Vazquez F, Gascioli V, Crete P, Vaucheret H (2004) The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing Current biology : CB 14:346-351 doi:10.1016/j.cub.2004.01.035
- Viola R et al. (2001) Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading The Plant cell 13:385-398
- Wan B, Lin Y, Mou T (2007) Expression of rice Ca(2+)-dependent protein kinases (CDPKs) genes under different environmental stresses FEBS letters 581:1179-1189 doi:10.1016/j.febslet.2007.02.030
- Webb AAR, McAinsh MR, Taylor JE, Hetherington AM (1996) Calcium Ions as Intracellular Second Messengers in Higher Plants. In: Callow JA (ed) Advances in Botanical Research, vol Volume 22. Academic Press, pp 45-96. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)60056-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2296(08)60056-7)
- White PJ, Bowen HC, Demidchik V, Nichols C, Davies JM (2002) Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells Biochimica et biophysica acta 1564:299-309
- White PJ, Broadley MR (2003) Calcium in plants Annals of botany 92:487-511 doi:10.1093/aob/mcg164
- Williamson RE, Ashley CC (1982) Free Ca<sup>2+</sup> and cytoplasmic streaming in the alga Chara Nature 296:647-650
- Wu L, Belasco JG (2005) Micro-RNA regulation of the mammalian lin-28 gene during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells Molecular and cellular biology 25:9198-9208 doi:10.1128/MCB.25.21.9198-9208.2005
- Wu L, Fan J, Belasco JG (2006) MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103:4034-4039 doi:10.1073/pnas.0510928103
- Xie F, Zhang B (2010) Target-align: a tool for plant microRNA target identification Bioinformatics 26:3002-3003 doi:10.1093/bioinformatics/btq568
- Xing T, Wang XJ, Malik K, Miki BL (2001) Ectopic expression of an Arabidopsis calmodulin-like domain protein kinase-enhanced NADPH oxidase activity and oxidative burst in tomato protoplasts Molecular plant-microbe interactions : MPMI 14:1261-1264 doi:10.1094/MPMI.2001.14.10.1261
- Xu X, van Lammeren AA, Vermeer E, Vreugdenhil D (1998) The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation in vitro Plant physiology 117:575-584
- Xue Y, Chen H, Jin C, Sun Z, Yao X (2006) NBA-Palm: prediction of palmitoylation site implemented in Naive Bayes algorithm BMC bioinformatics 7:458 doi:10.1186/1471-2105-7-458
- Yang X, Kovalenko OV, Tang W, Claas C, Stipp CS, Hemler ME (2004) Palmitoylation supports assembly and function of integrin-tetraspanin complexes The Journal of cell biology 167:1231-1240 doi:10.1083/jcb.200404100
- Yoon GM, Dowd PE, Gilroy S, McCubbin AG (2006) Calcium-dependent protein kinase isoforms in Petunia have distinct functions in pollen tube growth, including regulating polarity The Plant cell 18:867-878 doi:10.1105/tpc.105.037135
- Yoon IS, Park DH, Mori H, Imaseki H, Kang BG (1999) Characterization of an auxin-inducible 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene, VR-ACS6, of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) and hormonal interactions on the promoter activity in transgenic tobacco Plant & cell physiology 40:431-438
- Yoshioka H, Asai S, Yoshioka M, Kobayashi M (2009) Molecular mechanisms of generation for nitric oxide and reactive oxygen species, and role of the radical burst in plant immunity Molecules and cells 28:321-329 doi:10.1007/s10059-009-0156-2

- Yu L, Yu X, Shen R, He Y (2005) HYL1 gene maintains venation and polarity of leaves *Planta* 221:231-242 doi:10.1007/s00425-004-1439-7
- Yu XC et al. (2006) Absciscic acid stimulates a calcium-dependent protein kinase in grape berry *Plant physiology* 140:558-579 doi:10.1104/pp.105.074971
- Yu XC et al. (2007) Expression of a grape calcium-dependent protein kinase ACPK1 in *Arabidopsis thaliana* promotes plant growth and confers absciscic acid-hypersensitivity in germination, postgermination growth, and stomatal movement *Plant molecular biology* 64:531-538 doi:10.1007/s11103-007-9172-9
- Yuan F et al. (2014) OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  increases vital for osmosensing in *Arabidopsis* *Nature* 514:367-371 doi:10.1038/nature13593
- Zanetti ME, Blanco FA, Daleo GR, Casalongue CA (2003) Phosphorylation of a member of the MBF1 transcriptional co-activator family, StMBF1, is stimulated in potato cell suspensions upon fungal elicitor challenge *Journal of experimental botany* 54:623-632
- Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR (2002) Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells *Molecular cell* 9:1327-1333
- Zhang B, Wang Q, Pan X (2007) MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants *Journal of cellular physiology* 210:279-289 doi:10.1002/jcp.20869
- Zhang R, Marshall D, Bryan GJ, Hornyik C (2013) Identification and characterization of miRNA transcriptome in potato by high-throughput sequencing *PloS one* 8:e57233 doi:10.1371/journal.pone.0057233
- Zhang XQ, Chollet R (1997) Seryl-phosphorylation of soybean nodule sucrose synthase (nodulin-100) by a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinase *FEBS letters* 410:126-130
- Zhang XS, Choi JH (2001) Molecular evolution of calmodulin-like domain protein kinases (CDPKs) in plants and protists *Journal of molecular evolution* 53:214-224 doi:10.1007/s002390010211
- Zhou B, Liu L, Reddivari M, Zhang XA (2004) The palmitoylation of metastasis suppressor KAI1/CD82 is important for its motility- and invasiveness-inhibitory activity *Cancer research* 64:7455-7463 doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1574
- Zhou F, Xue Y, Yao X, Xu Y (2006) CSS-Palm: palmitoylation site prediction with a clustering and scoring strategy (CSS) *Bioinformatics* 22:894-896 doi:10.1093/bioinformatics/btl013
- Zhou L, Lan W, Jiang Y, Fang W, Luan S (2014) A calcium-dependent protein kinase interacts with and activates a calcium channel to regulate pollen tube growth *Molecular plant* 7:369-376 doi:10.1093/mp/sst125
- Zhu QH, Helliwell CA (2011) Regulation of flowering time and floral patterning by miR172 *Journal of experimental botany* 62:487-495 doi:10.1093/jxb/erq295
- Zou JJ, Wei FJ, Wang C, Wu JJ, Ratnasekera D, Liu WX, Wu WH (2010) *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase CPK10 functions in absciscic acid- and  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated stomatal regulation in response to drought stress *Plant physiology* 154:1232-1243 doi:10.1104/pp.110.157545
- Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction *Nucleic acids research* 31:3406-3415

# ANEXO

**Tabla 1** Elementos cis-regulatorios comunes en los promotores de las tres isoformas.

| Asociado a:          | Elemento          | Número de elementos |            |            | Base de Datos |
|----------------------|-------------------|---------------------|------------|------------|---------------|
|                      |                   | StCDPK1pro          | StCDPK2pro | StCDPK3pro |               |
| Luz                  | 10PEHVPSBD        | 9                   | 3          | 2          | PLACE         |
|                      | CIACADIANLELHC    | 4                   | 2          | 3          | PLACE         |
|                      | GATABOX           | 27                  | 28         | 22         | PLACE         |
|                      | IBOXCORE          | 7                   | 11         | 6          | PLACE         |
|                      | INRNTPSADB        | 5                   | 12         | 9          | PLACE         |
|                      | REALPHALGLHCB21   | 11                  | 4          | 3          | PLACE         |
|                      | TBOXATGAPB        | 4                   | 1          | 3          | PLACE         |
|                      | circadian         | 4                   | 1          | 4          | PlantCare     |
|                      | Box 4             | 4                   | 4          | 2          | PlantCare     |
|                      | ATCT-motif        | 1                   | 3          | 1          | PlantCare     |
|                      | I-box             | 1                   | 2          | 3          | PlantCare     |
| Proteínas de reserva | AMYBOX1           | 1                   | 4          | 4          | PLACE         |
|                      | CAATBOX1          | 32                  | 49         | 27         | PLACE         |
|                      | CANBNNAPA         | 9                   | 2          | 1          | PLACE         |
|                      | DOFCOREZM         | 47                  | 38         | 41         | PLACE         |
|                      | EBOXBNNAPA        | 8                   | 18         | 18         | PLACE         |
|                      | SEF3MOTIFGM       | 1                   | 1          | 2          | PLACE         |
|                      | SEF4MOTIFGM7S     | 4                   | 17         | 7          | PLACE         |
|                      | SP8BFIBSP8AIB     | 1                   | 1          | 1          | PLACE         |
| Estrés biótico       | Skn-1_motif       | 3                   | 5          | 3          | PlantCare     |
|                      | BIHD1OS           | 7                   | 4          | 6          | PLACE         |
|                      | BOXLCOREDCPAL     | 1                   | 1          | 1          | PLACE         |
|                      | WBOXATNPR1        | 4                   | 6          | 6          | PLACE         |
|                      | WBOXNTCHN48       | 3                   | 1          | 1          | PLACE         |
|                      | WBOXNTERF3        | 6                   | 6          | 6          | PLACE         |
|                      | TC-rich repeats   | 1                   | 4          | 3          | PlantCare     |
|                      | CGTCA-motif       | 1                   | 3          | 2          | PlantCare     |
| Expresión en raíces  | NODCON1GM         | 6                   | 8          | 7          | PLACE         |
|                      | NODCON2GM         | 14                  | 3          | 10         | PLACE         |
|                      | RAV1AAT           | 19                  | 3          | 9          | PLACE         |
|                      | RHERPATEXPA7      | 1                   | 1          | 1          | PLACE         |
|                      | ROOTMOTIFTAPOX1   | 31                  | 37         | 5          | PLACE         |
|                      | SURECOREATSULTR11 | 2                   | 2          | 1          | PLACE         |
| Estrés abiótico      | DPBFCOREDCDC3     | 5                   | 3          | 3          | PLACE         |
|                      | MYB1AT            | 8                   | 3          | 3          | PLACE         |

|                      |                       |    |    |    |           |
|----------------------|-----------------------|----|----|----|-----------|
|                      | MYBCORE               | 2  | 7  | 3  | PLACE     |
|                      | MYCCONSUSAT           | 8  | 18 | 18 | PLACE     |
|                      | PREATPRODH            | 2  | 2  | 2  | PLACE     |
| Azúcares             | PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A | 6  | 2  | 5  | PLACE     |
|                      | TATCCAOSAMY           | 2  | 1  | 1  | PLACE     |
|                      | TATCCAYMOTIFOSRAMY3D  | 1  | 1  | 1  | PLACE     |
|                      | WBOXHVIS01            | 3  | 5  | 4  | PLACE     |
| Luz/Defensa/Hormonas | ASF1MOTIFCAMV         | 1  | 3  | 2  | PLACE     |
|                      | GT1CONSUSUS           | 18 | 38 | 23 | PLACE     |
|                      | GT1GMSCAM4            | 8  | 14 | 8  | PLACE     |
|                      | WRKY71OS              | 14 | 13 | 14 | PLACE     |
| Citoquininas         | ARR1AT                | 41 | 44 | 29 | PLACE     |
|                      | CPBCSPOR              | 4  | 2  | 2  | PLACE     |
| Giberelinas          | GAREAT                | 1  | 3  | 5  | PLACE     |
|                      | MYBGHVV               | 1  | 3  | 2  | PLACE     |
| Altas temperaturas   | HSE                   | 1  | 4  | 3  | PlantCare |
| Otros                | ANAERO1CONSUSUS       | 1  | 1  | 3  | PLACE     |
|                      | BOXIINTPATPB          | 1  | 2  | 3  | PLACE     |
|                      | CACTFTPPCA1           | 35 | 33 | 32 | PLACE     |
|                      | CARGCW8GAT            | 6  | 8  | 4  | PLACE     |
|                      | CCAATBOX1             | 7  | 7  | 2  | PLACE     |
|                      | CURECORECR            | 12 | 12 | 4  | PLACE     |
|                      | EECCRAH1              | 3  | 6  | 8  | PLACE     |
|                      | GTGANTG10             | 8  | 13 | 16 | PLACE     |
|                      | MYBST1                | 6  | 2  | 3  | PLACE     |
|                      | POLASIG1              | 10 | 15 | 9  | PLACE     |
|                      | POLASIG2              | 4  | 6  | 2  | PLACE     |
|                      | POLASIG3              | 10 | 13 | 2  | PLACE     |
|                      | POLLEN1LELAT52        | 15 | 24 | 18 | PLACE     |
|                      | TAAAGSTKST1           | 5  | 7  | 10 | PLACE     |
|                      | TATABOX5              | 6  | 19 | 6  | PLACE     |
|                      | TATABOXOSPAL          | 1  | 4  | 1  | PLACE     |