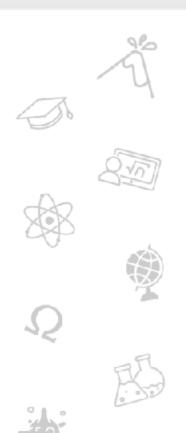
### **Tesis Doctoral**



Identificación y caracterización de nuevas CDPKs en la planta de papa. Estudio de su participación en respuesta a infección por P. Infestans. Producción de plantas de papa sobreexpresantes de CDPKs y evaluación de su resistencia

# Fantino, Elisa Inés

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Fantino, Elisa Inés. (2017-03-28). Identificación y caracterización de nuevas CDPKs en la planta de papa. Estudio de su participación en respuesta a infección por P. Infestans. Producción de plantas de papa sobreexpresantes de CDPKs y evaluación de su resistencia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Cita tipo Chicago:

Fantino, Elisa Inés. "Identificación y caracterización de nuevas CDPKs en la planta de papa. Estudio de su participación en respuesta a infección por P. Infestans. Producción de plantas de papa sobreexpresantes de CDPKs y evaluación de su resistencia". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-03-28.

# **EXACTAS**:

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales





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

"Identificación y caracterización de nuevas CDPKs en la planta de papa. Estudio de su participación en respuesta a infección por *P. infestans*. Producción de plantas de papa sobreexpresantes de CDPKs y evaluación de su resistencia"

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

Autor: Lic. Elisa Inés Fantino Director de tesis: Dra. Rita María Ulloa Consejero de estudios: Dra. Cecilia Varone

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

Fecha de defensa: 28 de Marzo de 2017, Buenos Aires.

# ÍNDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
Transducción de señales en plantas	
Calcio como segundo mensajero	
Proteínas sensoras de Ca <sup>2+</sup>	
Quinasas de proteínas dependientes de Ca <sup>2+</sup> (CDPKs)	
Modelos de activación de las CDPKs	
Mecanismos de defensa frente a estreses bióticos. Rol de las CDPKs	
Modelo de estudio: Solanum tuberosum	19
Descripción morfológica de la planta de papa	20
Tizón tardío de la papa	21
Genoma de papa	23
Antecedentes de CDPKs en papa	24
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS PARTICULARES	26
RESULTADOS	28
CAPÍTULO 1: Caracterización de la familia CDPK en papa	
Análisis genómico de la familia	
Estructura génica y localización cromosómica de la familia CDPK/CRK de papa	
Análisis de Expresión de las CDPKs	
DISCUSIÓN	39
CAPÍTULO 2: Estudio transcripcional y localización subcelular de StCDPK7	41
Clonado y análisis in silico de la secuencia codificante de StCDPK7	
Clonado y análisis in silico de la secuencia promotora de StCDPK7	
Análisis de expresión de StCDPK7	
Producción de líneas transgénicas promStCDPK7::GUS	
Análisis de la localización subcelular de StCDPK7	47
DISCUSIÓN	51
CAPÍTULO 3: Caracterización bioquímica de StCDPK7:6xHis	
Expresión, purificación y actividad de StCDPK7:6xHis	
Dependencia de Ca <sup>2+</sup> de StCDPK7:6xHis	5/
Cofactores del Complejo ATP-Me <sup>2+</sup> . Preferencia de Magnesio y Manganeso	
Determinación de los parámetros cinéticos (Vmáx y Km)	
DISCUSIÓN	
CAPÍTULO 4: Rol en defensa	64
Regulación de la expresión del gen StCDPK7 frente a la infección de P. infestans	
Evaluación de la capacidad de StCDPK7 de fosforilar sustratos	
Líneas sobreexpresantes de StCDPK7	
Evaluación de resistencia/tolerancia de líneas 35S::StCDPK7:6xHis	
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	77

MATERIALES Y METODOS	79
Cepas bacterianas	79
Escherichia coli	79
Agrobacterium tumefaciens	79
Material vegetal	80
Cultivo in vitro	81
Cultivo en invernadero	81
Cultivo de P. infestans	81
Ensayos de infección	81
Metodología del ADN recombinante	82
Clonados realizados en esta tesis	82
Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	85
Tabla MyM1	85
Tabla MyM2	86
Mini preparación de ADN plasmídico	87
Metodología del ARN	88
Extracción de ARN	88
Tratamiento con DNAsa	88
Síntesis de ADNc	88
PCRs cuantitativas	89
Metodología de Proteínas	89
Extracción de proteínas para ensayos de actividad o western blot	89
Expresión y purificación de proteínas recombinantes	90
Ensayo de western blot	91
Ensayos de actividad CDPK	91
Ensayos de Autofosforilación y de Fosforilación de Sustratos en geles	92
Electroforesis Geles 2D	92
Transformación mediada por Agrobacterium tumefaciens	93
Extracción de ADN genómico de plantas transgénicas	94
PCR para chequeo de plantas transgénicas	94
Transformación transitoria de hojas de N. benthamiana mediada por A. tumefaciens	94
Ensayos de bombardeo en hojas de N. benthamiana	95
Microscopia Confocal	95
Ensayo de tinción GUS (actividad β-glucuronidasa)	
Bioinformática	95
BIBLIOGRAFÍA	97
APÉNDICE	108
Apéndice 1.	
Apéndice 2	
, néndice 3	

### **AGRADECIMIENTOS**

A todas las personas que me acompañaron en este camino, ya sea en mi formación profesional, como en lo personal.

Especialmente a mi familia; papá, mamá, María (por estar siempre) y Juan. Al resto de la familia también.

A mis amigas de Trenque, amigos de la facu y los de la vida.

A los miembros del Instituto:

Norma y Rubén, por salvarnos el día, muchas veces.

Los becarios, que más que colegas, ofician de amigos y maestros: los Papas, las chicas de la Tere, el 222.

A los demás investigadores, por aconsejar, ayudar y compartir.

A mis compañeros del día a día, Fran, por enseñarme y hacerme reír tanto. Ceci y Marce, por aguantarme en esta última etapa.

A Rita, por darme un lugar.

A CONICET por haberme otorgado la beca doctoral.

### **RESUMEN**

El calcio (Ca<sup>2+</sup>) 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 ambientales. En varias especies de plantas se demostró la participación de CDPKs en vías de señalización que median respuestas defensivas frente al ataque por patógenos (Romeis & Herde 2014). A lo largo de la evolución, las plantas desarrollaron mecanismos de respuesta rápida ante patógenos que involucran cambios en los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup> y en el estado de fosforilación de las proteínas. Las CDPKs poseen un dominio quinasa de proteínas (KD) unido a través de una región bisagra o dominio autoinhibitorio (AD) a un dominio regulador homólogo a la calmodulina (CLD) con 4 sitios de unión al calcio (EF-hands). En angiospermas, las CDPKs componen familias multigénicas de 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 y la especificidad de sustrato. En la planta de papa, Solanum tuberosum, nuestro grupo caracterizó tres isoformas de CDPK, StCDPK1, 2 y 3, que se expresan durante el proceso de tuberización (Raíces et al. 2001; Raíces et al. 2003; Gargantini et al. 2009; Giammaria et al. 2011; Grandellis et al. 2012; Santin et al. 2016; Grandellis et al. 2016). Además otros tres miembros de la familia fueron caracterizados por otros grupos, StCDPK4 y 5 (Kobayashi et al. 2007), y StCPK1 (Lakatos et al. 1998).

Una búsqueda bioinformática en el genoma de Solanum phureja (PGSC) mostró que la familia CDPK de papa está compuesta por 26 miembros agrupados en los 4 grupos característicos de angiospermas. El grupo I es el más expandido con 12 miembros, el II está compuesto por 7 miembros, el III por 5 y sólo 2 miembros componen el grupo IV. Se encontraron además 3 quinasas de proteínas relacionadas con CDPK (CRKs) que se agrupan en una rama cercana al grupo IV, y una proteína CDPK-like más distante. El análisis evolutivo sugirió que CDPKs, CRKs y CDPK-like comparten un mismo origen evolutivo. El uso de herramientas bioinformáticas permitió inferir diversas características de los miembros de la familia, entre ellas su capacidad de miristoilarse y palmitoilarse, la presencia de péptidos señales a otras organelas y la presencia de motivos PEST. Estudios de expresión y análisis de datos de RNAseq disponibles en la base de datos del genoma de papa permitieron determinar que varias CDPKs presentan una expresión ubicua mientras que un tercio de sus miembros se expresa exclusivamente en órganos florales, mayoritariamente en estambres. Los datos de RNAseg también permitieron identificar CDPKs cuya expresión se induce en respuesta a estreses bióticos. Entre estas últimas, se eligió la isoforma StCDPK7, perteneciente al grupo I, para caracterizarla en profundidad. Se clonó la secuencia codificante que codifica una proteína de 578 aminoácidos, cuyo peso molecular es de 66 kDa y presenta todos los dominios característicos de una CDPK. En su NTV se predijo, in silico, la presencia de un péptido de tránsito a cloroplastos y de dos motivos PEST. Se estudió su patrón de expresión en tejidos por RT-qPCR, se clonó y analizó su secuencia promotora (2.273 pb) y se obtuvieron plantas promStCDPK7::GUS. Tanto la tinción histoquímica como las RT-qPCRs mostraron que la enzima se expresa mayoritariamente en raíces lo que concuerda con los elementos reguladores en cis encontrados en su región promotora. Ensayos de expresión transitoria, en hojas de Nicotiana benthamiana, de las proteína de fusión, StCDPK7:YFP y StCDPK7<sup>1-157</sup>:GFP, mostraron que, en condiciones estándar de cultivo, StCDPK7 presenta localización citosólica y no se encuentra asociada a cloroplastos. Para proceder a su caracterización bioquímica y determinar sus parámetros cinéticos, se obtuvo la proteína recombinante StCDPK7 etiquetada con 6xHis. Se demostró que StCDPK7:6xHis es una quinasa activa dependiente de Ca<sup>2+</sup>, capaz de autofosforilarse en múltiples sitios en presencia del catión, fosforila diversos sustratos y puede usar Mn<sup>2+</sup> o Mg<sup>2+</sup> como cofactores del complejo ATP-Me<sup>2+</sup>. En ensayos de RT-qPCR se observó que la expresión de *StCDPK7* aumenta (3,5 veces) en hojas distales de plantas que fueron infectadas con el patógeno hemibiotrófico Phythophthora infestans. Asimismo, se confirmó la inducción, en hojas inoculadas y distales de plantas infectadas, de StPR-1b, gen asociado a la patogénesis y de StPAL1 que codifica una fenilalanina amonio liasa. Se demostró que StCDPK7:6xHis fosforila en forma específica a cuatro proteínas NtPAL de tabaco que presentan un alto grado de homología con las enzimas de papa. Finalmente, se produjeron plantas que sobrexpresan la proteína StCDPK7 (35S::StCDPK7:6xHis) como una primera aproximación funcional para determinar si esta isoforma interviene en la respuesta de la planta a estreses bióticos. Un dato llamativo fue que los niveles del transcripto StPAL1 disminuyeron en estas plantas. La papa es el tercer cultivo alimenticio luego del arroz y del trigo (FAOSTAT, 2009). El oomycete P. infestans, causante del tizón tardío de la papa, ocasiona cuantiosos daños al cultivo en condiciones de alta humedad y bajas temperaturas. Por el momento la única solución para el manejo de la enfermedad es el uso de agroquímicos. Una variante es la generación de resistentes. Es necesario completar la caracterización 35S::StCDPK7:6xHis y realizar los ensayos de infección con P. infestans en estas plantas, para determinar si la manipulación biotecnológica de StCDPK7 puede conferir resistencia al oomycete.

#### Palabras clave:

Proteínas quinasas dependientes de calcio (CDPKs) • fenilalanina amonio liasa (PAL) • fosforilación dependiente de Ca<sup>2+</sup>• *Phytophthora infestans* • regulación transcripcional • *Solanum tuberosum* 

**ABSTRACT:** "Identification and characterization of new CDPKs in the potato plant. Study of their role in response to *P. infestans* infection. Production of transgenic potato plants that overexpress CDPKs and evaluation of their resistance"

Calcium-dependent protein kinases (CDPKs) decode calcium (Ca<sup>2+</sup>) signals and activate different signaling pathways involved in hormone signaling, plant growth, development, and both abiotic and biotic stress responses. In this study, we describe the potato CDPK/CRK multigene family; bioinformatic analysis allowed us to identify twenty six CDPK isoforms, three CDPK-related kinases (CRKs) and a CDPK-like kinase. Phylogenetic analysis indicated that the twenty-six StCDPKs can be classified into four groups, whose members are predicted to undergo different acylation patterns and exhibited diverse expression levels in different tissues and in response to various stimuli. With the aim of characterizing those members that are particularly involved in plant-pathogen interaction, we focused on StCDPK7.

StCDPK7 encodes a 66 kDa protein that presents all the characteristic domains of CDPKs. Prediction programs inferred that it harbors a chloroplast transit peptide in its NTV and two PEST motifs. Transient expression assays performed with StCDPK7:YFP or StCDPK7<sup>1-157</sup>:GFP fusion proteins showed that StCDPK7 displays a cytosolic/nuclear localization in spite of having a predicted chloroplast transit peptide. StCDPK7 promoter region (2,273 bp) was cloned and analyzed, and promStCDPK7::GUS plants were generated. Histochemical analysis detected GUS activity in the tips and initiation points of lateral roots and in adventitious roots. Tissue expression profile revealed that StCDPK7 transcript levels are high in swollen stolons, roots, and mini tubers correlating with the cis-elements identified in its promoter. Moreover, its expression is induced upon *Phytophthora infestans* infection in systemic leaves together with StPR-1b and StPAL1. The recombinant protein, StCDPK7:6xHis, is an active Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase that can phosphorylate four tobacco isoforms of phenylalanine ammonia lyase, an enzyme involved in plant defense responses. The analysis of the potato CDPK family provides the first step towards the identification of CDPK isoforms involved in biotic stress and StCDPK7 emerges as a relevant player that could be manipulated in order to deploy disease resistance in potato crops. StCDPK7 overexpressing lines were obtained. Preliminar data indicate that in S35::StCDPK7:6xHis lines, StPAL1 transcripts are reduced, however, upon infection with P. infestans, PAL expression is induced. Future experiments should be performed in order to determine the role of StCDPK7 in potato - P. infestans interaction.

### Keywords

Calcium-dependent protein kinases • Phenylalanine ammonia lyase • *Phytophthora infestans* • protein phosphorylation • *Solanum tuberosum* • transcriptional regulation

## **INTRODUCCIÓN**

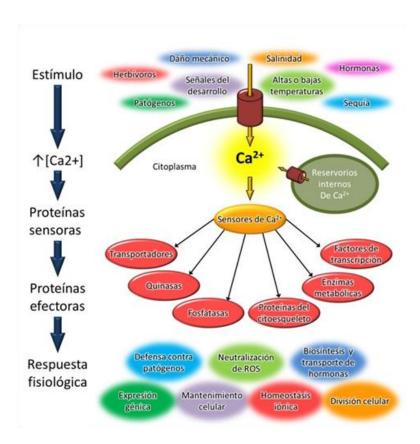
### Transducción de señales en plantas

Las plantas han desarrollado mecanismos de transducción de señales eficientes a lo largo de la evolución que les permitieron percibir los cambios en su entorno y adaptar su fisiología rápidamente, así poder crecer y desarrollarse. Las señales pueden variar en calidad y cantidad, las respuestas de las plantas a estos estímulos están moduladas por la edad, la historia ambiental previa, y ciclos circadianos que especifican día de noche, y momento del año. Para células maduras, la respuesta puede ser fisiológica y bioquímica; para células en crecimiento ésta puede ser morfológica y de desarrollo.

Las vías de transducción de señales transforman 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 adaptativas multifacéticas. El calcio (Ca<sup>2+</sup>) representa probablemente el ión más versátil en las células vegetales. 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.

### Calcio como segundo mensajero

El Ca<sup>2+</sup> 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/efectores de patógenos, y los factores de nodulación (Knight & Knight 2000; 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 Ca<sup>2+</sup> citosólico libre que resultan de la acción concertada de canales, bombas y transportadores (Miedema et al. 2001; Tanaka et al. 2010). Las señales de Ca<sup>2+</sup> 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 (FTs) y transportadores que conforman la maquinaria celular responsable de generar la respuesta fisiológica apropiada (Fig. I.1).



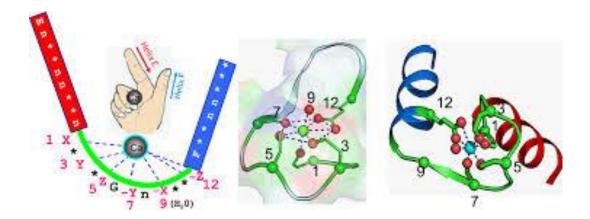
**Fig. I.1 El paradigma del calcio.** Los estímulos ambientales y las señales de desarrollo son percibidos en la superficie celular o intracelularmente e inducen aumentos transitorios de Ca<sup>2+</sup> (firmas) que son decodificados por proteínas sensoras que transmiten la señal río abajo a través de proteínas efectoras desencadenando la respuesta. Figura adaptada de DeFalco et al. (2010)

El Ca<sup>2+</sup> puede fácilmente formar complejos con proteínas, membranas y ácidos orgánicos debido a su flexibilidad al exhibir números de coordinación elevados y geometrías complejas. Por otro lado, esta característica convierte al Ca<sup>2+</sup> en un compuesto tóxico a altas concentraciones ya que forma complejos insolubles con el fosfato que son incompatibles con la viabilidad celular. Por este motivo la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> está sujeta a un estricto control espacial y temporal lo cual contribuyó al surgimiento de diferentes depósitos intracelulares y de numerosas cascadas de señalización mediadas por este catión. Su concentración es elevada (10<sup>-3</sup> M) en el medio extracelular, organelas y estructuras subcelulares y es baja en el citosol (10<sup>-7</sup> M). Se han reportado aumentos transitorios en la concentración de Ca2+ citosólico en gran variedad de procesos fisiológicos, incluidas las respuestas a estreses abióticos, hormonas y patógenos. Cambios definidos en la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico son provocados por segundos mensajeros celulares, tales como NAADP, IP3, IP6, 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). La identidad y la intensidad de un estímulo específico provoca alteraciones estímulo-específicas y dinámicas de la concentración citosólica de Ca<sup>2+</sup> (McAinsh et al. 1995; Allen et al. 1995). Estos "flujos" de Ca<sup>2+</sup>, de concentración, duración, amplitud, frecuencia y distribución espacial variable, condujeron a plantear el concepto de "firmas de Ca<sup>2+</sup>" (Webb et al. 1996). Así, la información de la señal sería codificada por una firma de Ca<sup>2+</sup> específica definida espacial, temporal y magnitudinalmente.

La diversidad de las firmas de Ca<sup>2+</sup> estímulo-específicas a nivel celular, da lugar a respuestas a nivel de tejidos u órganos. Esto podría contribuir a una mayor diversidad en respuestas locales y sistémicas. Por lo tanto, la investigación sobre la señalización de Ca<sup>2+</sup> en plantas ha utilizado sistemas modelo de una sola célula y en paralelo avanza en la elucidación de la dinámica del Ca<sup>2+</sup> en el contexto del tejido y en todo el organismo.

### Proteínas sensoras de Ca<sup>2+</sup>

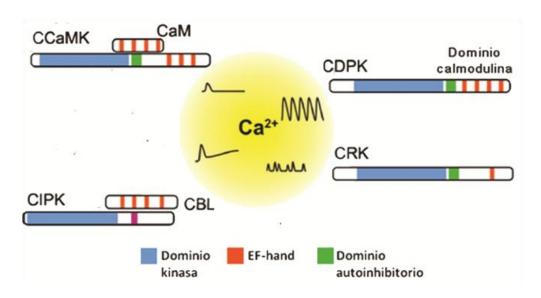
Todos los organismos eucariotas poseen una batería de proteínas sensoras que detectan las firmas de Ca<sup>2+</sup>, las decodifican y transmiten la información a componentes río abajo, generando una respuesta adecuada. La mayoría posee el motivo clásico *EF-hand*, que al coordinarse con iones de Ca<sup>2+</sup> provoca cambios conformacionales en la proteína. Este motivo consiste en 29 aminoácidos (aa) con una estructura hélice-*loop*-hélice. Se asemeja a una mano con los dedos índice y pulgar extendidos en ángulo recto y el resto de los dedos enroscados hacia la palma formando la curvatura o *loop* (Fig. I.2). El *loop* consiste en 12 aa con residuos ácidos que coordinan el Ca<sup>2+</sup>. La unión de Ca<sup>2+</sup> genera cambios conformacionales que exponen bolsillos hidrofóbicos. A su vez estos sitios facilitan la interacción con otras proteínas. Estos motivos ocurren típicamente de a pares y facilitan la unión a Ca<sup>2+</sup> con alta afinidad de forma cooperativa. Un ejemplo clásico de una proteína sensora de Ca<sup>2+</sup> es la calmodulina (CaM).



**Fig. I.2 Estructura del motivo** *EF-hands* **presente en los sensores de Ca<sup>2+</sup>**. Se muestra la estructura de hélice-*loop*-hélice y los aminoácidos que se coordinan con el Ca<sup>2+</sup>.

En plantas, las proteínas sensoras pueden clasificarse en sensoras-relé (sensor-relay) y en sensoras-efectoras o sensoras-transductoras. Las primeras, entre ellas CaM o calcineurina-B-like (CBL), no poseen actividad enzimática per se y deben interaccionar con proteínas efectoras (proteínas quinasas, PK) para transducir la señal. En Arabidopsis, el 4% de su

genoma codifica para PKs, que pueden clasificarse en diferentes familias y subfamilias de acuerdo con su función y filogenia (Champion et al. 2004; Zulawski et al. 2014). Las plantas poseen cuatro familias de PKs que decodifican las señales de Ca<sup>2+</sup> en respuesta a diversos estímulos: PKs dependientes de Ca<sup>2+</sup> (CDPKs o CPKs), PKs relacionadas con CDPKs (CRKs), PKs activadas por Ca<sup>2+</sup> y CaM (CCaMKs) y PKs relacionadas con la no fermentación de sacarosa 3 (SnRK3s) (Harper et al. 2004). Las SnRK3s también son conocidas como CIPKs, PKs que interactúan con CBL (Fig. I.3). De estas cuatro clases de PKs, las CDPKs comprenden la familia más grande y se consideran sensores-transductores; en ellas el dominio de unión al Ca<sup>2+</sup> y el dominio catalítico se encuentran en el mismo péptido. Por el contrario, las CIPKs/SnRK3s y las CCaMKs son proteínas efectoras que requieren de la interacción con el sensor Ca<sup>2+</sup>- CBL (Batistic et al. 2010; Edel & Kudla 2015) o con Ca<sup>2+</sup>-CaM (Wang et al. 2015) para su activación.



**Fig. 1.3 Proteínas sensoras de Ca<sup>2+</sup> en plantas.** CaMs, CMLs y CBLs contienen sitios *EF-hand* (rojo) y regulan proteínas blanco. No contienen dominios adicionales. CBLs interactúan y modulan la actividad de las CIPKs. CDPKs, CRKs, CCaMK y CIPKs son PKs de serina/treonina (dominio quinasa en azul). En verde se señala el dominio autoinhibitorio. Adaptado de Batistic & Kudla (2012).

## Quinasas de proteínas dependientes de Ca<sup>2+</sup> (CDPKs)

Las CDPKs están presentes en plantas, algas verdes y protistas (Hamel et al. 2014). En angiospermas, la familia CDPK es multigénica; en Arabidopsis comprende 34 genes, 31 en arroz, 20 en trigo, 35 en maíz y 20 en la especie arbórea *Populus trichocarpa*, álamo (Cai et al. 2015). El análisis filogenético permite agrupar a sus miembros en 4 grupos (I a IV) (Fig. I.4). La comparación de la familia CDPK de diversas angiospermas con la de gimnospermas, pteridofitas, briofitas y algas verdes sugiere que la arquitectura de la familia CDPK se modeló cuando las plantas colonizaron la tierra ya que los 4 grupos se conservan en briofitas y pterodofitas mientras que las CDPKs de algas verdes evolucionaron en forma independiente. Esta comparación permite sugerir que la familia CDPK de angiospermas surgió de eventos de

duplicación recientes de genes que son comunes a todas la embriofitas más que a la diversificación de candidatos linaje específicos (Valmonte et al. 2014). Funcionalmente, las CDPKs están implicadas en el procesos de desarrollo de las plantas, así como en la señalización del estrés biótico y abiótico (Boudsocq & Sheen 2013; Hamel et al. 2014; Schulz et al. 2013).

Dado que forman familias multigénicas y se encuentran involucradas en diversas funciones es interesante saber cómo se rige la especificidad de la señalización. Se cree que se debe a la expresión espacio-temporal de las PKs y de sus sustratos. Por ejemplo, en Arabidopsis, AtCPK6/10/11/17 y 34, son especialmente abundantes en un tipo de célula particular (Leonhardt et al. 2004; Harper et al. 2004), mientras que otras CDPKs se expresan específicamente en respuesta a distintos estímulos (Ray et al. 2007; Wan et al. 2007). Otro factor importante es su localización subcelular, hay CDPKs que tienen una distribución ampliamente variable a través de la célula (por ejemplo, AtCPK3) o exclusivamente en un solo compartimento (Asai et al. 2013). El confinamiento a un compartimento específico puede aportar una considerable especificidad ya que limita el grupo de proteínas blancos accesibles y determina qué señales de Ca²+ pueden ser detectadas. Por último, las CDPKs muestran diferentes afinidades y dependencia a Ca²+, y se regulan por autofosforilación (Boudsocq et al. 2012). Todos estos factores juntos determinan dónde, cuándo y qué tipo de señal de Ca²+ activará una CDPK específica.

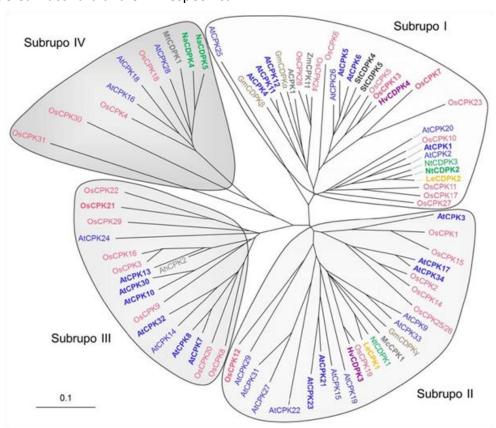
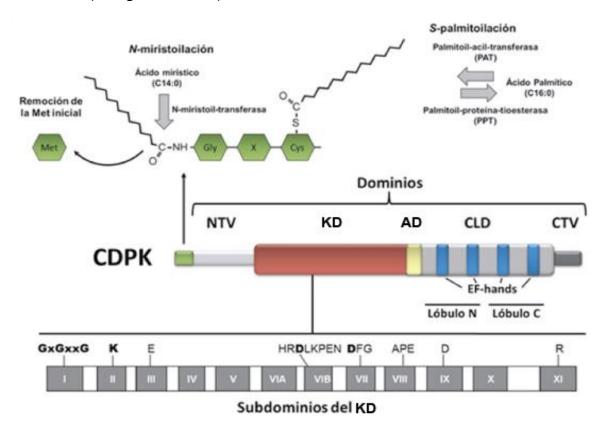


Fig. I.4 Árbol filogenético de la familia CDPK construido con isoformas de CDPKs de diversas angiospermas. Las CDPKs en negrita son aquellas cuya función biológica es conocida. Figura adaptada de Boudsocq & Sheen (2013).

Las CDPKs son proteínas monoméricas que presentan cinco dominios (Fig. I.5), un dominio amino terminal variable (NTV), un dominio quinasa de serina (S)/treonina (T) altamente conservado (KD), un dominio bisagra, autoinhibitorio o pseudosustrato (AD) que interacciona con el sitio activo, un dominio regulatorio similar a CaM (CLD) y un dominio carboxilo terminal (CTV) 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 PK con una CaM (Zhang & Choi 2001).



**Fig. I.5 Estructura de la CDPKs.** NTV: dominio amino terminal variable; KD: dominio quinasa de proteínas serina/treonina; AD: dominio autoinhibitorio, CLD: dominio similar a CaM, CTV: dominio C-terminal variable. En la figura se detallan las enzimas que participan en las N-acilaciones. Figura adaptada de Hamel et al. (2014).

Se investigó la ubicación subcelular de CDPKs en diferentes especies mediante ensayos de expresión transitoria de proteínas de fusión a la proteína verde fluorescente (GFP). Se las encontró asociadas a membrana plasmática (MP), núcleo, retículo endoplasmático (RE), cuerpos lipídicos, peroxisoma y Golgi (Dammann et al. 2003; Raíces et al. 2003; Brandt et al. 2012; Kawamoto et al. 2015; Gutermuth et al. 2013; Coca & San Segundo 2010; Asai et al. 2013; Boudsocq et al. 2012). Algunas son tanto solubles como asociadas a membranas (Mehlmer et al. 2010; Berendzen et al. 2012; Boudsocq et al. 2010), mientras que sólo unas pocas parecen ser exclusivamente solubles (Zhu et al. 2007; Milla et al. 2006). El NTV es importante para su localización subcelular ya que la asociación a membrana está mediada por la acilación N-terminal de la proteína. La mayoría de las CDPKs albergan un sitio de N-

miristoilación (glicina, G, en la posición 2), así como residuos de cisteína (C, posición 3, 4 ó 5) que permitirían la posterior palmitoilación (Cheng et al. 2002). La N-miristoilación ocurre cotraduccionalmente y es irreversible (Resh 2006). Confiere una asociación a membrana débil, mientras que la posterior palmitoilación (reversible) resulta en un anclaje estable de membrana (Resh 2006). La mutación en el sitio de miristoilación de G por alanina (A) previene la N-miristoilación así como la palmitoilación subsiguiente y conduce a una asociación disminuida de las CDPKs a la membrana (Lu & Hrabak 2002; Raíces et al. 2003; Benetka et al. 2008; Mehlmer et al. 2010). La reversibilidad de la palmitoilación permite que las CDPKs se desvinculen de la MP y se transloquen al citosol o al núcleo. Se han reportado cambios en la localización, inducidos por estímulos, para algunas CDPKs. Por ejemplo, McCPK1 de Mesembryanthemum crystallinum cambia su localización subcelular de MP al núcleo, RE y filamentos de actina, en respuesta a humedad reducida (Chehab et al. 2004). Se reportó que la acilación N-terminal de AtCPK16 impide su localización cloroplástica fuertemente predicha in silico (Stael et al. 2011). AtCPK16 alberga sitios consenso de miristoilación y palmitoilación en su extremo N-terminal y se localiza casi exclusivamente en la MP, con una señal débil también en núcleo. La mutación del sitio de palmitoilación desplaza fuertemente el equilibrio hacia la localización nuclear. Por el contrario, la mutación del sitio de miristoilación o de ambos sitios resulta en la abolición completa de la localización en MP y la transloca a cloroplastos. Esto sugiere que la N-miristoilación es suficiente para impedir la localización en cloroplasto de AtCPK16.

Los experimentos de intercambio de dominio demuestran que el NTV también desempeña un papel clave en la especificidad de señalización. No sólo determina la localización subcelular y, por lo tanto, las señales de Ca²+ que pueden activar a los miembros individuales de la familia; también confiere la interacción con las proteínas blanco/sustratos. Por ejemplo, se sabe que NtCDPK1 y StCDPK3 (Ito et al. 2010; Grandellis et al. 2016) interaccionan y fosforilan a los FTs bZIP *Repressor of Shoot Growth* (RSG) del tabaco y papa. La CDPK quimérica que contiene el NTV de NtCDPK1 fusionado a AtCPK9 también puede fosforilar a RSG, aunque la AtCPK9 nativa no puede unir ni fosforilar RSG (Ito et al. 2010). StCDPK5, localizada en la MP, reconoce la NADPH oxidasa *in vivo*, llamada *respiratory burst oxidase homolog* (StRBOHB). Al intercambiar su dominio NTV con el de SICDPK2, de tomate, la quinasa quimérica se dirige al trans-Golgi, donde SICDPK2 reside normalmente. Esta modificación espacial suprime la interacción *in vivo* con StRBOHB. En cambio, la versión quimérica de SICDPK2, que porta el dominio N-terminal StCDPK5, se dirige a la MP y activa StRBOHB. La forma nativa de SICDPK2 fosforila a la oxidasa *in vitro* pero no *in vivo* (Asai et al. 2013).

En el KD, el subdominio I (motivo GXGXXG) (Fig. I.5), la lisina (K) del subdominio II, y el aspártico (D) en el subdominio VII (motivo DFG) son responsables del anclaje y orientación del ATP. Estos se encuentran estrictamente conservados al igual que el D del subdominio VIb (motivo DLK) involucrado en la reacción de fosfotransferencia. El CLD posee dos lóbulos (N y C terminales) cada uno conteniendo los motivos *EF-hand*, responsables de unir Ca<sup>2+</sup>.

### Modelos de activación de las CDPKs

Szczegielniak et al. 2005).

Se postulan dos modelos (Harper & Harmon 2005). El primer modelo propone que al unir el Ca<sup>2+</sup>, el CLD, se une al dominio bisagra desplazando el AD y activando la quinasa. El segundo modelo postula que, cuando los niveles de Ca<sup>2+</sup> en la célula son basales, el dominio bisagra se encuentra unido al CLD. El lóbulo C-terminal del dominio regulatorio posee dos iones Ca<sup>2+</sup> unidos. Cuando el lóbulo N-terminal une otros dos iones Ca<sup>2+</sup> se produce la activación. Se propone que la conformación del lóbulo N-terminal se modifica cuando une Ca<sup>2+</sup> e induce un cambio conformacional en la interacción del AD con el KD (Christodoulou et al. 2004). 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;

# Mecanismos de defensa frente a estreses bióticos. Rol de las CDPKs

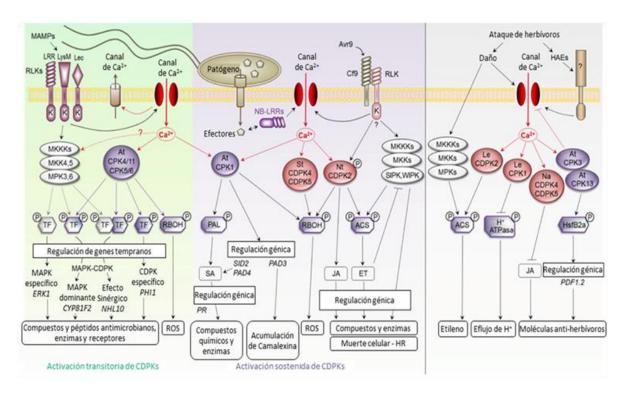
Las plantas están expuestas a muchos patógenos diferentes que, de acuerdo a su nutrición, se clasifican en biotróficos, hemibiotróficos o necrotróficos. En los dos primeros casos, el patógeno se alimenta de tejido vegetal vivo, sin matar a la planta; en cambio los necrótrofos matan al tejido vegetal para luego alimentarse. Las plantas han desarrollado diferentes estrategias defensivas por lo que sólo unos pocos patógenos pueden afectarlas. La inmunidad desencadenada por Patrones Moleculares Asociados a Patógenos o Microbios (PAMPs/MAPMs), PTI, detiene a casi todo microorganismo; la segunda línea de defensa es la inmunidad desencadenada por efectores, producidos por el patógeno (ETI) (Thomma et al. 2011). En ambos casos se desencadena una serie de respuestas rápidas que incluyen: flujos rápidos y transitorios de Ca<sup>2+</sup>, la activación de CDPKs y MAPKs, y la posterior producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Asimismo, se induce la respuesta hipersensible (HR), muerte celular programada del tejido adyacente al punto de ingreso del patógeno; esta estrategia, utilizada por plantas resistentes ante microorganismos biotrofos, evita la colonización del tejido de la planta. La HR requiere de la producción de ácido salicílico (SA). La acumulación de SA y la activación coordinada de genes que codifican proteínas asociadas a la patogénesis (PR), son necesarias para el establecimiento de la resistencia sistémica adquirida (SAR) en tejidos distantes del sitio de infección primaria. La SAR protege a la planta de infecciones futuras (Ryals et al. 1996; Liu et al. 2016). Otra proteínas involucradas son las fenilalanina amonio liasas (PALs), enzimas responsable de la producción de metabolitos secundarios que intervienen en respuestas defensivas (Huang et al. 2010). CDPKs de diferentes especies son inducidas transcripcionalmente en respuesta a elicitores microbianos (Romeis & Herde 2014) y durante la PTI y la ETI se generan distintas firmas de Ca<sup>2+</sup> que activan CDPKs específicas (Gao et al. 2014). La señalización de CDPKs desempeña un papel importante en la inmunidad innata de las plantas mediante la regulación de la producción de

ROS, la expresión génica y la señalización hormonal (Fig. I.6) (Boudsocq & Sheen 2013). La NADPH oxidasa RBOH es responsable de la producción de ROS. En Arabidopsis hay 10 genes AtRBOH (Sagi & Fluhr 2006) siendo AtRBOHD la fuente principal de ROS durante la PTI. La región C-terminal de RBOH alberga los dominios de unión a NADPH y FAD, y el dominio Nterminal citosólico contiene EF-hands, que son blanco de fosforilación y cruciales para la regulación de la actividad de RBOH (Kadota et al. 2015). Tanto el influjo de Ca<sup>2+</sup> apoplástico en el citosol como la fosforilación del dominio N-terminal son necesarias para la producción de ROS (Kadota et al. 2004). En Arabidopsis, se demostró que seis CDPKs del grupo I están involucradas en la PTI; CPK1/2 controlan el inicio de la HR y junto a CPK4/11 fosforilan NADPH oxidasas (Zhu et al. 2007). Tratamientos con elicitores activan las CPK4/5/6/11 que actúan como reguladores transcripcionales de receptores de reconocimiento de PAMPs (PAMP-R) (Sugiyama et al. 2000). Asimismo se determinó que AtCPK1 fosforila a una PAL (Cheng et al. 2001). Posteriormente, Boudsocq et al. (2010) identificaron cuatro CDPKs de Arabidopsis (AtCPK4, 5, 6 y 11) como reguladores de la respuesta transcripcional temprana de PTI, utilizando el gen NHL10, inducido por flagelina 22 (flg22). Las múltiples líneas knock out de estas CDPKs mostraron un estallido oxidativo progresivamente reducido, lo que implica que también regulan las NADPH oxidasas. Por otro lado, la sobreexpresión ectópica de AtCPK1 en protoplastos de tomate generó un estallido oxidativo debido a una mayor actividad de la RBOH (Xing et al. 2001).

También se identificaron CDPKs que intervienen en respuestas defensivas contra patógenos y daño mecánico en plantas de tabaco, tomate y papa (Romeis et al. 2000; Chico et al. 2002; Ludwig et al. 2004; Romeis & Herde 2014). Se demostró que las isoformas de tabaco NtCDPK2 y NtCDPK3 regulan la HR. Plantas de N. benthamiana silenciadas en estas isoformas mostraron una respuesta HR demorada y reducida al ser tratadas con elicitores/efectores en los modelos receptor-elicitor 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. 2001). En tomate, la isoforma SICDPK1 se induce frente a C. fulvum y en respuesta al daño mecánico (Chico et al. 2002). La primera evidencia de la participación de CDPKs en la activación de RBOHD provino de experimentos en papa, donde se encontró que StCDPK4 y 5 fosforilan in vivo al ortólogo StRBOHB iniciando el estallido oxidativo (Kobayashi et al. 2007). La actividad de PAL aumenta en cultivos de células de papa tratados con paredes celulares de hifas de P. infestans. Sin embargo, el pretratamiento con inhibidores de PKs, quelantes de Ca<sup>2+</sup> (EGTA), antagonistas de CaM o con un bloqueador de canales de Ca<sup>2+</sup> abolió esta inducción (Blanco et al. 2008). También en papa se observó que una CDPK fosforila al co-activador transcripcional StMBF1 inducido en respuesta a elicitores (Zanetti et al. 2003).

En soja se demostró que la oleato desaturasa, FAD2, responsable de la producción de ácido linoleico es regulada negativamente 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 jasmónico (JA), posiblemente a

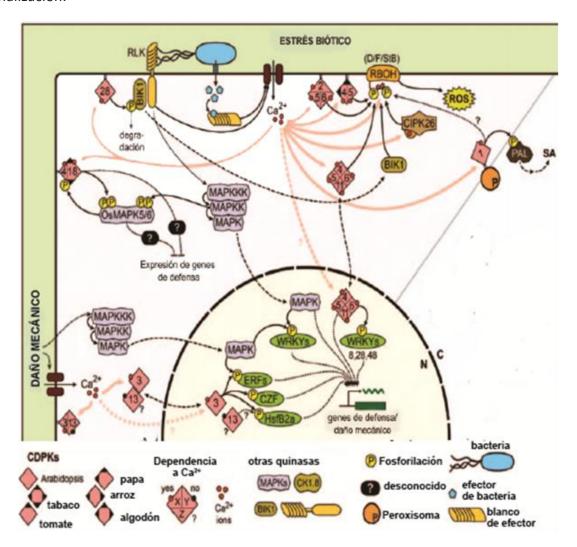
través de la fosforilación de las enzimas biosintéticas del JA, alene oxidasa sintasa (AOS) y alene oxidasa ciclasa (AOC) (Hettenhausen et al. 2013) y en este caso las inducción de determinadas CDPKs sería perjudicial para la planta. También en cebada se observó que la expresión transitoria de la isoforma 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). Por ejemplo, la sobreexpresión de StCDPK5 en plantas de papa confirió resistencia a *Phytophthora infestans*, un patógeno hemibiotrófico pero aumentó la sensibilidad a *Alternaria sp*, un patógeno necrotrófico (Yoshioka et al. 2009).



**Fig. I.6 CDPKs de diferentes especies que participan en procesos defensivos.** Se mencionan los sustratos identificados. Adaptado de Boudsocq & Sheen (2013).

La reprogramación transcripcional en condiciones de estrés implica la acción de varios FTs de tipo WRKY (Fig. I.7) (Gao & He 2013). En Arabidopsis, se encontró que AtWRKY8 se induce por alta sal y se propuso como un regulador positivo de la aclimatación al estrés salino (Hu et al. 2013). Al mismo tiempo, se encontró que los mutantes wrky8 son susceptibles a la infección por *Pseudomonas sp*, lo que sugiere que AtWRKY8 desempeña un papel positivo en la resistencia a la enfermedad mediada por ETI. AtWRKY8, 28 y 48 son fosforilados *in vitro*, en su dominio de unión al ADN, por AtCPK4/5/6 y 11 (Gao et al. 2013). Recientemente, se reportó que StWRKY1, confiere resistencia al tizón tardío en el genotipo F06025 de papa (Yogendra et al. 2015). A su vez, AtCPK3 y 13 median la regulación transcripcional de genes relacionados con la defensa desencadenada por la infección de *Spodoptera littoralis* (Kanchiswamy et al. 2010). AtCPK3 es capaz de fosforilar *in vitro* a tres FTs, AtERF1 inducible

por etileno, AtCZF1/ZFAR1 inducible por heridas y al factor de *shock* térmico AtHsfB2a, mientras que AtCPK13 sólo fosforiló AtHsfB2a. Como AtCPK3, y en menor medida AtCPK13, están parcialmente localizados en núcleo, es posible que estos FTs también sean fosforilados por AtCPK3 *in vivo*. El hecho de que muchos FTs involucrados en defensa sean potenciales blancos de CDPKs proporciona otra evidencia del rol de las CDPKs en la respuesta defensiva (Kmiecik et al. 2016). Sin embargo, se requiere identificar los sustratos específicos para obtener una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares de esta señalización.



**Fig. 1.7 Fig. 1.7 Actividades de CDPK en la respuesta al estrés biótico**. El esquema muestra la interacción de CDPKs y sus blancos conocidos inducidos por infección de patógenos y heridas. Las CDPKs de diferentes especies se representan como cuadrados rosas, con círculos rojos se indica su dependencia de Ca<sup>2+</sup> o no (círculos negros). Las líneas punteadas indican los procesos hipotéticos; las líneas discontinuas, el transporte de proteína/metabolito o eventos de translocación; las líneas continuas indican interacciones confirmadas experimentalmente *in vitro/in vivo*. N, núcleo; C, citosol; P, peroxisoma; SA, ácido salicílico; RLK, quinasa tipo receptor. Adaptado de Simeunovic et al. (2016).

Por último, es cada vez más reconocido el papel de los cloroplastos en la inmunidad innata; ya sea como sitio de biosíntesis de hormonas vegetales para la defensa, o como lugares

adicionales de producción de ROS (Shapiguzov et al. 2012; Stael et al. 2015; Mignolet-Spruyt et al. 2016). Esto hace que los cloroplastos sean objeto del ataque de patógenos, y se cree que la señalización dependiente de Ca<sup>2+</sup> juega un papel clave (de Torres Zabala et al. 2015; Serrano et al. 2016).

### Modelo de estudio: Solanum tuberosum

La papa (*Solanum tuberosum* L.), perteneciente a la familia Solanáceas, es una planta anual tetraploide (2n = 4x =48). 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. Se originó y fue domesticada por primera vez en las montañas de los Andes de Sudamérica. Hay más de 4.000 variedades de papas nativas, que en su mayoría se encuentran en los Andes. Asimismo, hay 151 especies de papa silvestre. Aunque son demasiado amargas para ser consumidas, su biodiversidad incluye importantes características como resistencia natural a plagas, enfermedades y condiciones climáticas (Base de datos del CIP, International Potato Center, http://cipotato.org/)

La papa es el tercer cultivo alimenticio más importante del mundo (FAOSTAT), en términos de consumo humano, después del arroz y del trigo. Es un alimento tradicional de la dieta de los argentinos (60 kg/cápita/año) que provee carbohidratos (almidón), proteínas de alta calidad, vitamina C y minerales. Aproximadamente 1.400 millones de personas consumen papa regularmente, la producción mundial del cultivo sobrepasa los 300 millones de toneladas métricas (CIP). Una hectárea de papa puede producir de dos a cuatro veces la cantidad de alimentos de los cereales. La papa genera más alimento por unidad de agua que ningún otro cultivo importante y es hasta siete veces más eficiente que los cereales en el aprovechamiento del agua. En Argentina, según la base de datos de FAOSTAT, el número de hectáreas cosechadas del 2012 al 2014 disminuyó 8,3%, (4.191 ha), la producción en toneladas disminuyó 7,3 % pero el rendimiento (hg/ha) aumentó un 1,07 %. Una de las regiones productoras por excelencia es el sudeste de la provincia de Buenos Aires, donde la plantación se concentra en la primavera (papa semitardía). La superficie destinada a la actividad semillera se distribuye entre las provincias de Mendoza, Catamarca y Tucumán (Mosciaro 2011).

Una amplia gama de patógenos y plagas amenazan a este cultivo. Uno de ellos, es el oomycete *Phytophthora infestans*, causante de la enfermedad llamada Tizón tardío de la papa que provocó la gran hambruna irlandesa a mediados del siglo XIX. Aún hoy puede devastar rápidamente lotes enteros de cultivo, bajo condiciones de alta humedad. Debido a ello, amplias cantidades de agroquímicos son aplicados, a través de un pronóstico de alarma, con el fin de manejar la enfermedad y reducir los daños. Se gastan alrededor de mil millones de dólares al año para controlar el tizón tardío en los Estados Unidos y Europa. La pérdida total (directa y a través de fungicidas) oscila entre 3 y 5 mil millones de dólares por año (Judelson & Blanco 2005; Haldar et al. 2006).

### Descripción morfológica de la planta de papa

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 genéticamente idéntica a la planta madre, por lo que los tubérculos también sirven como órganos de perennidad para estas especies anuales. La nueva planta puede producir 5 a 20 nuevos tubérculos. Las plantas de papa también producen flores y bayas que contienen entre 100 a 400 semillas botánicas (Fig. I.8). Estas pueden sembrarse para producir nuevos tubérculos que serán genéticamente diferentes a la planta madre.

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". 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, haz vascular, parénquima de reserva y médula.

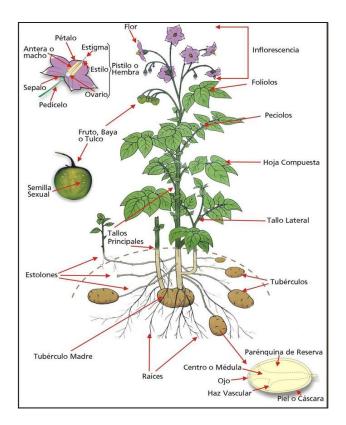


Fig.I.8 Descripción morfológica de la planta de papa. Figura obtenida de Huarte & Capezio (2013)

Cuando las yemas comienzan a crecer se denominan "brotes", cuyo color, forma y pilosidad permiten diferenciar las variedades. Los brotes dan origen 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 bajo el suelo, sean principales o laterales, producen estolones y tubérculos (Huarte & Capezio 2013).

### Tizón tardío de la papa

Phytophthora infestans es un microorganismo del suelo; la oospora (Fig. 1.9), espora de origen sexual, puede sobrevivir en el suelo por dos años. Las zoosporas, esporas de origen asexual, son biflageladas, teniendo movilidad en suelos anegados y películas de agua. Los zoosporangios transportados por lluvia y viento, alcanzas hojas y tallos de las plantas y si las condiciones son favorables, 18°C y alta humedad, maduran liberando zoosporas que ingresan por estomas o de manera activa produciendo apresorios (Fig. I.10a), atravesando la cutícula y pared celular (Kamoun 2006). Si no encuentran un sustrato vivo el cual infectar, las zoosporas pueden enquistarse, endurecen su pared, se mantienen viables por un par de días, y luego reinfectan (Dou & Zhou 2012). A su vez el mismo zoosporangio puede germinar, actuando como una espora e ingresar al tejido (Fig. I.10a). Dentro de la planta, el patógeno crece intercelularmente produciendo haustorios, hifas modificadas con capacidad de tomar fotosintatos de la célula vegetal, y así nutrirse a partir de ella (Fig. I.10) (Whisson et al. 2016). Como todo organismo hemibiotrófico, posee una fase biotrófica (Fig. I.10b) y luego de 5-7 días post infección (dpi), sufre modificaciones en la expresión génica y comienza a comportarse como un organismo necrotrófico (Kamoun 2006). En esta fase, genera necrosis; sobre las hojas se desarrollan manchas grandes, húmedas, pardas redondeadas con margen más claro (Fig, I.11a). La infección es muy virulenta, avanza rápidamente, infectando follaje, tallos, pecíolos y tubérculos (Fig, I.11a, c y d). Si descienden los valores de humedad, las lesiones adquieren consistencia de papel. Alrededor de estas lesiones, el patógeno libera los zoosporangios por los estomas (Fig, I.11b y c), que serán diseminados por lluvias a otras plantas o al suelo. De este modo infectaran tubérculos que se encuentren a corta distancia de la superficie, renovando el ciclo de la enfermedad.

En caso de encontrarse dos talos genéticamente compatibles, la reproducción sexual puede llevarse a acabo, originando oosporas, la espora de resistencia. La capacidad de la espora a sobrevivir en el suelo, su supervivencia en tubérculos, sus diferentes formas de penetración (Fig, I.11e y f) y los re-arreglos genéticos que generan rápidamente nuevas cepas, hacen de este microorganismo un patógeno altamente virulento y peligroso para el cultivo (Fry et al. 2015).

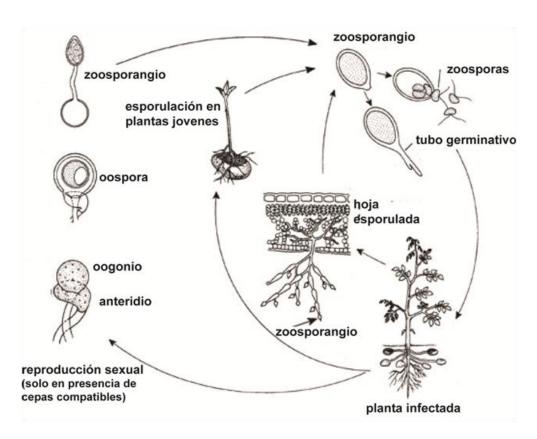
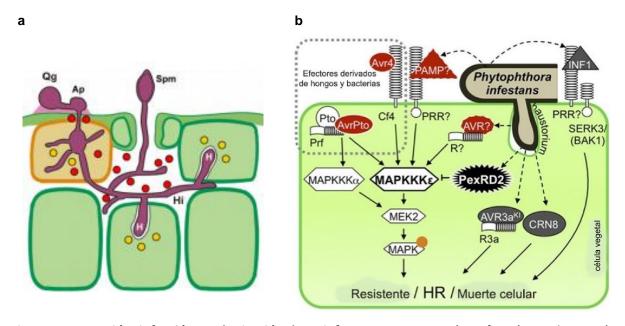


Fig.I.9 Ciclo del patosistema P. infestans - papa. Figura adaptada de Schumann & D'Arcy (2000)

Varios efectores de tipo RXLRs han sido identificados como determinantes de virulencia en *P. infestans* (Win et al. 2012; King et al. 2014). El reconocimiento de PAMPs y efectores conduce a la inducción de cascadas de MAPK y de genes relacionados con la defensa a través de la fosforilación de FTs (Chen et al. 2010; Abuqamar et al. 2009).



**Fig.I.10 Penetración, infección y colonización de** *P. infestans.* a Penetración, infección y colonización en hojas de papa. La muerte celular del tejido (naranja) ocurre en la etapa necrotrófica. Los círculos

rojos y amarillos representan efectores apoplásticos e intracelulares, respectivamente. (Qg) quiste germinado, (Ap) apresorio, (Hi) hifas de infección, (H) haustorio y (Spm) esporangio. Figura adaptada de Dou & Zhou (2012). **b** Modelo de acción del efector de tipo RXLR, PexRD2, durante la infección. PexRD2 interactúa con MAPKKKε en el citosol de la célula vegetal e inhibe la señalización, evitando la muerte celular desencadenada por la sobreexpresión de MAPKKKε, pero no la muerte celular desencadenada por MAPKKKα. PexRD2 también suprime la fosforilación de MAPK (círculo naranja). La HR desencadenada por efector Avr4 de *C. fulvum* y el efector de *P. syringae* (AvrPto), se suprimen por la presencia de PexRD2. Adaptado de King et al. (2014).

Algunos efectores del tipo RXLR son inducidos en la etapa de germinación del quiste o en la etapa de infección temprana. Por ejemplo, PexRD2 interactúa con el KD de MAPKKKE, un regulador positivo de la muerte celular (Fig. I.10b). La expresión de PexRD2 o el silenciamiento de MAPKKKE en plantas de *N. benthamiana* aumenta la susceptibilidad a *P. infestans* (King et al. 2014). Mientras que otros efectores, proteínas de tipo Nep1 (PNL), inductor de muerte celular, se expresan en etapas de infección tardía, lo que sugiere que contribuyen a la fase necrotrófica (Qutob et al. 2006).

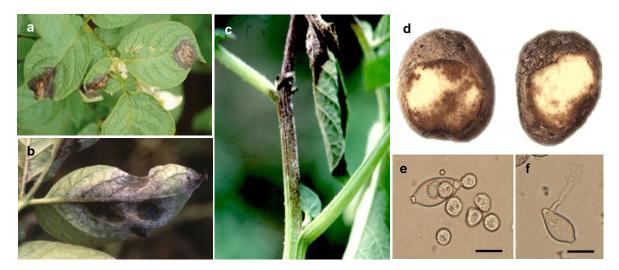


Fig.I.11 Síntomas y signo del Tizón tardío de la papa. a Necrosis del tejido en el haz de la hoja. b Eflorescencia blanquecina en el envés de la hoja (zoosporangios) c. Necrosis y esporulación en tallo d Necrosis y podredumbre de tubérculos. e Zoosporangio liberando zoosporas. f Zoosporangio germinando. Barras graduadas en 20 μm. (a-d Cátedra de Fitopatología, FAUBA. e y f E. Fantino).

### Genoma de papa

La secuenciación del genoma de papa se realizó a partir del Consorcio Internacional: *Potato Genome Sequencing Consortium* (PGSC), formado por grupos académicos y organizaciones de 16 países. El genoma de papa se publicó en 2011 en la revista Nature (Xu et al. 2011) y luego se desarrolló la base de datos Spud DB (http://potato.plantbiology.msu.edu/) que permite 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 pseudomoléculas, transcriptos, loci, contienen información de loci del *International Tomato Annnotation Group* (ITAG), de *Arabidopsis*, uva, álamo y tomate, y transcriptos ensamblados para otras 12 especies de solanáceas (PlantGDB). A su vez contiene datos de 56 bibliotecas de *RNASeq* 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 (Fragmentos por kilobase de la transcripción por millón de lecturas mapeadas, FPKM) en tejidos y tratamientos.

### Antecedentes de CDPKs en papa

En Solanum tuberosum, se identificaron seis isoformas de CDPK. Tres de ellas StCDPK1, 2 y 3, pertenecientes al grupo lla, fueron caracterizadas por nuestro grupo. StCDPK1 se expresa en estolones engrosados y StCDPK3 en estolones tempranos (Raíces et al. 2001; Raíces et al. 2003). La isoforma StCDPK2 es ubicua pero se expresa mayormente en hojas (Ulloa et al. 2002) y en brotes emergentes. Las tres comparten la misma estructura génica (ocho exones/siete intrones). Por Genome Walker Universal Kit, (Clontech) se obtuvieron las secuencias promotoras de StCDPK1 y StCDPK3. Se estudió su regulación transcripcional a través de plantas transgénicas portadoras del gen reportero GUS bajo el promotor de StCDPK1 y 3. StCDPK1 tienen alta expresión en el sistema vascular en raíces, tallos y hojas, y en el anillo vascular de tubérculos y estolones (Santin et al. 2016). 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 sitios de alta proliferación celular (Grandellis et al. 2012).

La actividad de StCDPK1/2 y 3 es estrictamente dependiente de Ca<sup>2+</sup>; sin embargo, difieren en sus parámetros cinéticos y en la concentración óptima de Ca<sup>2+</sup> requerida para la activación completa (Giammaria et al. 2011; Grandellis et al. 2012; Santin et al. 2016). A pesar de la alta homología en sus KD, estas tres isoformas CDPK difieren en sus dominios NTV (Santin et al. 2016). En ensayos *in vitro* se demostró la fosforilación del loop hidrofílico del transportador del eflujo de auxina StPIN4, por StCDPK1:6xHis (Santin et al. 2016). En cambio, StCDPK2:6xHis y StCDPK3:6xHis fosforilan el FT tipo StABF1, capaz de unir elementos de respuesta a ABA en el ADN (Muñiz García et al. 2012; Grandellis et al. 2016). Además, StCDPK3:6xHis es capaz de fosforilar el FT bZIP StRSG (Grandellis et al. 2016) que modula el contenido de giberelina (GA).

Otros grupos caracterizaron la isoforma StCPK1, que fue propuesta como un enlace evolutivo entre CDPK y CRKs (Lakatos et al. 1998) y las isoformas, StCDPK4 y 5, pertenecientes al grupo I que están implicadas en las respuestas de defensa (Kobayashi et al. 2007; Yoshioka et al. 2009; Asai et al. 2013).

En este trabajo analizamos la familia CDPK de la papa con el objetivo de identificar a sus miembros y caracterizar alguno que participe en la respuesta desencadenada por patógenos. En particular, nos centramos en StCDPK7, una isoforma perteneciente al grupo I, que se regula positivamente ante la infección con *P. infestans* en hojas sistémicas junto con StPAL1 y StPR-1b. In vitro StCDPK7:6xHis puede fosforilar específicamente cuatro isoformas de tabaco NtPAL:6xHis. Nuestros datos sugieren la participación de esta quinasa en la respuesta de la planta provocada por la interacción papa - *P. infestans*.

## **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 Ca<sup>2+</sup> que se desencadenan en respuesta a los desafíos ambientales y a los cambios internos. Las CDPKs componen familias multigénicas y sus diferentes miembros 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. En este trabajo de tesis proponemos que la isoforma StCDPK7 está involucrada en la cascada de transducción gatillada durante la interacción papa - *P. infestans*.

### **OBJETIVO GENERAL**

Analizar la familia CDPK de *Solanum tuberosum* e identificar aquellos miembros que pudieran participar en la respuesta de la planta frente a estreses bióticos. Caracterizar bioquímica y molecularmente a la isoforma StCDPK7 para comprender su función en la planta de papa.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- ldentificación de la familia CDPK de papa. Análisis filogenético de los miembros de la familia; estudio bioinformático de las CDPKs de *Solanum phureja* evaluando localización cromosómica, estructura de los genes (exones/intrones) y presencia de elementos reguladores en los promotores. En la secuencia codificante se evaluará la presencia de consensos de miristoilación y palmitoilación, señales proteolíticas y señales de localización subcelular. Análisis de expresión de las isoformas identificadas *in silico* en hojas y estolones tuberizantes por RT-PCR semicuantitativa y análisis de datos de *RNAseq* disponibles en la base de datos del genoma de genoma de papa, PGSC.
- Clonado de la CDS y de la región promotora de StCDPK7. Producción de plantas transgénicas promStCDPK7::GUS; análisis de expresión en tejidos por RT-qPCR y tinción histoquímica de las plantas promStCDPK7::GUS. Estudios de localización subcelular de la isoforma usando fusiones a GFP.
- Producción y caracterización bioquímica de la proteína recombinante StCDPK7:6xHis
- Análisis de expresión de StCDPK7 en plantas de papa sometidas a la infección por *P. infestans*. Búsqueda de potenciales proteínas blanco que puedan ser sustrato de fosforilación de StCDPK7 y que estén vinculadas con la respuesta de la planta a estreses.

>	Obtención y análisis de plantas de papa 355::StCDPK7:6xH	is que sobreexpresan StCDPK7

### **RESULTADOS**

# CAPÍTULO 1: Caracterización de la familia CDPK en papa

Un amplio análisis in silico del genoma de Solanum tuberosum var Phureja (PGSC) nos permitió identificar veinticuatro nuevas secuencias que presentan rasgos característicos de CDPKs. Estas secuencias codificantes (CDS), junto con las seis StCDPKs previamente caracterizadas (Gargantini et al. 2009; Giammaria et al. 2011; Grandellis et al. 2012; Kobayashi et al. 2007; Lakatos et al. 1998), se alinearon con CDPKs de Arabidopsis, tomate, tabaco y arroz (Tabla C1.1, Apéndice 1). La NtCCaMK2, de tabaco, fue utilizada como grupo externo (outgroup). El alineamiento se realizó por ClustalW y posterior análisis por el método Neighbor-Joining, en el programa MEGA6. El análisis filogenético (Fig. C1.1) indicó que la familia CDPK de la papa está compuesta por veintiséis miembros que se agrupan en cuatro grupos (I-IV) al igual que las CDPKs de Arabidopsis (AtCPKs) y de arroz (OsCDPKs) (Cheng et al. 2002; Asano et al. 2005). En este estudio renombramos a StCPK1 (Lakatos et al. 1998) como StCDPK25, debido a que pertenece al grupo IV (Fig. C1.1). El grupo I es el más grande con doce miembros, mientras que sólo dos isoformas pertenecen al grupo IV. Además, tres de las proteínas identificadas corresponden a PKs relacionadas con las CDPKs (CRK1, 2 y 3) y se agruparon en la rama que está más estrechamente relacionada con el grupo IV. Los miembros de los grupos I a III son proteínas ácidas con pls de 5,02 a 6,59. Sin embargo, las CDPKs del grupo IV y las CRKs son proteínas básicas, con pls entre 8,85 y 9,34 (Tabla C1.1). La secuencia restante (designada CDPK-like 1), no pertenece a la superfamilia

Los miembros de los grupos I a III son proteinas acidas con pis de 5,02 a 6,59. Sin embargo, las CDPKs del grupo IV y las CRKs son proteínas básicas, con pls entre 8,85 y 9,34 (Tabla C1.1). La secuencia restante (designada CDPK-like 1), no pertenece a la superfamilia CDPK/CRK (Fig.C1.1) y su homólogo más cercano en Arabidopsis (57% de identidad, 98% de cobertura) es la quinasa relacionada con la fosfoenolpiruvato carboxilasa 1 (PEPRK). Un análisis filogenético realizado en Arabidopsis apoya la hipótesis de que CDPKs, CRKs y PEPRK tienen un origen evolutivo común (Hrabak 2000).

### Análisis genómico de la familia

Las treinta secuencias nucletídicas de papa, CDPKs, CRKs y CDPK–like 1 (PEPRK), codifican proteínas monoméricas con un KD altamente conservado (48-88% de identidad y 62-95% de similitud). Sin embargo, sólo las CDPKs contienen un AD y un CLD funcionales. El AD que presenta 42-91% de identidad y 64-97% de similitud entre las distintas isoformas funciona como un sitio pseudosustrato y está implicado en la activación intramolecular de la quinasa (Harmon et al. 1994; Harper et al. 1994). Los CLDs (35-91% de identidad y 56-95% de similitud) son fuertemente ácidos (pI 4,04 a 4,6) y contienen cuatro sitios *EF-hand*, excepto los de las isoformas StCDPK22/23/24 (grupo III) que sólo contienen tres sitios; el más cercano al AD es degenerado (Tabla C1.1).

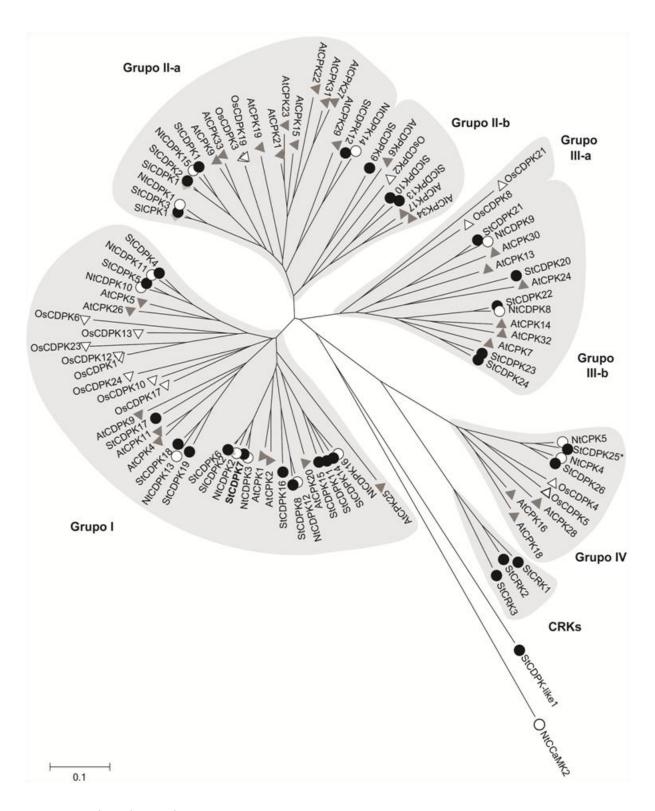


Fig. C1.1 Análisis filogenético de las *CDPKs* de papa, Arabidopsis, arroz, tabaco y tomate. La historia evolutiva se dedujo utilizando el método de *Neighbor-Joining*. El árbol se construyó luego de un *test* de *bootstrap* (n = 500) utilizando las CDS de 26 genes *CDPK* de papa (St, *S. tuberosum*,  $\bigcirc$ ), 31 genes de Arabidopsis (At, *Arabidopsis thaliana*,  $\triangle$ ), 14 genes de tabaco (Nt, *Nicotiana tabacum*,  $\bigcirc$ ), 3 genes de tomate (Sl, *Solanum lycopersicum*,  $\bigcirc$ ), y 17 genes de arroz (Os, *Oryza sativa*,  $\triangle$ ). La secuencia de *NtCCaMK2* se utilizó como *outgroup*. Los grupos dentro de la familia CDPK están indicados por números romanos. También se muestran tres *CRKs* y una *CDPK-like* de papa. *StCDPK7* se resalta en

negrita. Los números de accesos de las secuencias se indican en las Tablas C1.1 y Apéndice 1.

Las regiones C-terminales de las CRKs comparten poca similitud de secuencia con el CLD (22-26% de identidad y 50% de similitud), no presentan *EF-hands* canónicos y no contienen un AD funcional. Por otra parte, la CDPK–like 1 carece de los dominios AD y CLD y su extensión C-terminal no contiene ningún dominio regulador aparente. Una búsqueda por alineamiento de la proteína CDPK-like 1 indica la presencia de homólogos cercanos (> 90% de identidad, 100% de cobertura) en otras solanáceas.

El peso molecular (PM) previsto de CDPKs/CRKs oscila entre 56 y 71,6 kDa (Tabla C1.1) dependiendo principalmente de la longitud de los NTVs altamente divergentes (31 a 134 aa). Los NTVs son críticos para la correcta localización subcelular de las CDPKs (Lu & Hrabak 2013) y se han asociado con el reconocimiento del sustrato (Ito et al. 2010). CDPKs/CRKs también contienen un CTV relativamente corto (5 a 41 aa) y básico (pl: 8.59 a 12.30) que difiere entre los diferentes grupos. Sólo StCDPK11 tiene un CTV anormalmente largo y ligeramente ácido (70 aa, pl: 6,92).

Tabla C1.1 Análisis de las secuencias aminoacídicas de 26 CDPKs, 3 CRKs y una CDPK-like de papa.

Isoforma de CDPK	Número de acceso PGSCª	Sec.	pl°	PM <sup>c</sup> (kDa)	Nro de <i>EF-</i> hands <sup>d</sup>	Crom <sup>a</sup>	Sec. génicaª
StCDPK1 (Raices et al. 2001)	gi:10568115 PGSC0003DMT400071663	531	6,07	59	4	12	7
StCDPK2 (Giammaria et al. 2009)	gi:300390203 PGSC0003DMT400057484	515	6,75	57	4	7	5,5
StCDPK3 (Grandellis etal. 2012)	gi:297342354	558	5,81	63	4	3	11
StCDPK4 (Kobayashi et al. 2007)	gi:146219323 PGSC0003DMT400043321	557	5,56	62	4	10	10
StCDPK5 (Kobayashi et al. 2007)	gi:146219325 PGSC0003DMT400038030	535	5,65	60	4	1	14,1
StCDPK6 (Asai et al. 2013)	gi: 512386542 PGSC0003DMT400065419	581	5,54	65	4	4	6
StCDPK7	gb: KJ830932 PGSC0003DMT400002592	578	5,35	65	4	11	6
StCDPK8	PGSC0003DMT400072554	607	5,58	68	4	10	4
SCDPKt9	PGSC0003DMT400014939	517	5,79	58	4	8	5
StCDPK10	PGSC0003DMT400024436	524	5,77	59	4	11	6
StCDPK11	PGSC0003DMT400072292	638	5,17	70	4	10	4
StCDPK12	PGSC0003DMT400025581	540	7,89	53	4	4	10,5
StCDPK13	PGSC0003DMT400011824	535	5,44	60	4	12	4,5
StCDPK14	PGSC0003DMT400018575	544	5,31	60	4	10	4
StCDPK15	PGSC0003DMT400054991	582	5,71	65	4	1	5
StCDPK16	PGSC0003DMT400054983	598	5,42	68	4	1	4
StCDPK17	PGSC0003DMT400060262	503	5,02	56	4	5	5,7
StCDPK18	PGSC0003DMT400002331	505	5,49	57	4	11	4

StCDPK19	PGSC0003DMT400067082	501	5,69	56	4	6	4,5
StCDPK20	PGSC0003DMT400069175	536	5,97	61	4	6	5
StCDPK21	PGSC0003DMT400034291	538	6,43	61	4	3	6
StCDPK22	PGSC0003DMT400021055	524	7,60	59	3	10	4
StCDPK23	PGSC0003DMT400027809	533	6,44	60	3	1	7
StCDPK24	PGSC0003DMT400083474	532	6,12	60	3	11	5
StCDPK25 (StCPK1	gb: AF030879.1	564	9,01	64	4	3	7,9
Lakatos et al. 1998)	PGSC0003DMT400058126	304	9,01	04	4	3	7,5
StCDPK26	PGSC0003DMT400009177	564	9,34	64	4	2	6
StCRK1	PGSC0003DMT400026076	641	9,08	68	-	2	5
StCRK2	PGSC0003DMT400001990	590	8,65	66	-	2	6
StCRK3	PGSC0003DMT400066365	588	9,07	66	-	1	6
StCDPK – like 1	PGSC0003DMT400036995	511	5,94	56	-	3	4

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup>Número de acceso, localización cromosómica y longitudes de genes, disponibles en el PGSC. <sup>b</sup>El número de aminoácidos (aa) se estimó a través de Expasy – Translate tool. <sup>c</sup>Los pesos moleculares (PM) y pl se calcularon a partir de Expasy - Compute pl/Mw tool. <sup>d</sup>Número de *EF-hands* fueron predichos por Expasy – ScanProsite.

# Predicción de consensos de miristoilación y palmitoilación, identificación de péptidos tránsito a organelas y de motivos PEST

Muchas CDPKs son miristoiladas en la glicina (G) 2 cuando son traducidas (Hrabak 2000). Si bien la miristoilación por sí sola no es suficiente, esta modificación junto con palmitoilación, permite su asociación específica a membranas celulares (Martín & Busconi 2000; Rutschmann et al. 2002; Raíces et al. 2003; Benetka et al. 2008; Mehlmer et al. 2010; Witte et al. 2010). Programas de predicción *in silico* indican que las StCDPKs presentan diferentes patrones de acilación. Mientras que las CDPKs del grupo II, y CRKs tienen alta probabilidad de ser miristoiladas y palmitoiladas; los miembros del grupo I, excepto StCDPK14, no serían miristoiladas y sólo se predijo que StCDPK5 experimenta palmitoilación (Tabla C1.2). Es de notar que StCDPK5 se localiza predominantemente en la MP (Kobayashi et al. 2007). En cuanto al grupo III, los programas de miristoilación disponibles difieren en sus predicciones (Tabla C1.2). Sin embargo, se predijo que los cinco miembros del grupo podrían palmitoilarse (Tabla C1.2).

En el caso del grupo IV, se predijo que StCDPK25 se miristoila con alta probabilidad, mientras StCDPK26 tiene una puntuación baja, pero ninguna sería palmitoilada (Tabla C1.2). Quince isoformas de la familia de papa presentan una asparagina (N) en la posición 3 (Tabla C1.2), que según Yamauchi et al. (2010) afecta negativamente a la miristoilación. De acuerdo con estas predicciones, las isoformas no aciladas (la mayoría de los miembros de los grupos I y IV) deberían mostrar una localización subcelular soluble, mientras que las aciladas (CDPKs de los grupos II y III y CRKs) podrían estar asociadas a membranas. De hecho, StCDPK1 del grupo II experimenta miristoilación y palmitoilación, y se encuentra asociada a la MP (Raíces et al. 2003; Gargantini et al. 2009).

Tabla C1.2 Sitios consensos de miristoilación y palmitpilación de los miembros de la familia CDPK/CRK de papa.

						Citio	4
			Siti	Sitios de Miristoilación		Palmitoilac	Palmitoilación
Grupo	Isoforma	Secuencia NTV a	Predicción∜ Respuesta media de 25	NMT-MYR Predictor <sup>b</sup>	Myristoylator⁴		
			redes neuronales	Overall score	Score	Score	Out off
	StCDPK4	MSNTCRESIGGKTFQGYT	NO/no - ministoilada	NO' miristollada	-0,959602	14,51	10,722
	Stadpics	MGNACRESFGGKTFQGYP	NO/no - ministoilada	NO' miristollada	-0,934805	37,823	3,717
	StCDPK6	MGNTCVGPSISRNRFFQS	'TWILGHT ZONE'/ no - miristoilada	-1,789	-0,965882	16,599	10,722
	StCDPK7	MGINTCVGPSISKNGIFQS	'TWILGHT ZONE' / no - miristoilada	-1,932	-0,960975	19,095	10,722
	StCDPK8	MGNINCVHSKFTKGGFFNL	NO/no - ministollada	NO' miristollada	-0,979841	21,961	10,722
	StOPKII	MGNNCVGPKLANNGFLOS	NO/no - minstoilada	NO' miristollada	-0,960062	14,976	10,722
-	StCDPK14	MGNTCSGPTLNkDSADSS	RELIABLE' / Confianza Alta	2,509	0,971994	16,651	10,722
	StOPKUS	MGNITCIGPALGNNGFLOS	'TWILGHT ZONE' / no - miristoilada	-1,410	-0,976189	14,773	10,722
	StCDPK16	MGININCVHANDSKDGFFSS	NO/no - miristollada	NO' minstoilada	-0,962804	18,879	10,722
	StOPK17	MDSSDSAKTKTSSLSTPS		Sin G terminal			
	StCDPK18	MEIPKSENSKOPTVSSST		Sin G terminal			
	StCDPK19	MACAWAKKRPPISSKPSP		Sin G terminal			
	StCDPKI	MGVCLSKSkPAESKSDGH	RELIABLE" / Confianza Alta	2,194	0,989914	41,769	3,717
	StapPic	MEICASKGRONNANNGHH	RELIABLE'/ Confianza Alta	1,316	0,936355	43,133	3,717
	StCDPK3	MGGCFSKKYTQQDANG/R	RELIABLE" / Confianza Alta	2,386	0,990339	43,292	3,717
=	StCDPKG	MGNCNSISSOHPPPAAA	RELIABLE' / Confianza Media	1,058	0,538349	39,65	3,717
	StCDPK10	MGNCCSRGQPNDDDHIMS	RELIABLE" / Confianza Alta	3,303	0,988182	44,297	3,717
	StCDPK12	MISLOFTIKECCCPHYRDAP	RELIABLE" / Confianza Media	0,198	0,569004	41,038	3,717
	StCDPK13	MGGC CSKAETDPAQNNEE	RELIABLE' / Confianza Alta	3,472	0,989643	43,474	3,717
	StCDPIC20	METCMSVQNASFLKRTRM	RELIABLE' / Confianza Alta	0,857	0,985466	41,427	3,717
	StOPR21	MGINCNACIRPEEASKTDP	RELIABLE' / non-myristoy/ated	0,424	-0,272388	39,828	3,717
≣	StCDPIC22	MGNCCAVPKTSETEEKKR	RELIABLE / Confianza Media	1,852	0,735412	45,234	3,717
	StOPPC3	MGINCCWPGRSAERONIOK	RELIABLE" / Confianza Bja	969(0	0,336324	43,193	3,717
	StCDPIC4	MGNCCGTPGNSSENIOUN	RELIABLE" / Confianza Media	1,355	0,681893	42,979	3,717
2	StCDPACS	MGS CFSSSKVSGSNSNTP	RELIABLE' / Confianza Alta	2,387	0,980927	16,19	10,722
2	St@PR26	MGNICFSSSKVSGSNSNT	RELIABLE' / no -ministoilada	0,752	-0,980565	14,943	10,722
	StGRK1	MGACTSRPSMYSDDSITV	RELIABLE" / Confianza Alta	1,335	0,888822	38,588	3,717
8	StCRNZ	MGGCTSKPSPEPNYSNND	RELIABLE" / Confianza Alta	3,709	0,989446	41,191	3,717
	StORKS	MSACTSKPPRPNPYSPQE	RELIABLE' / Confianza Alta	1,992	0,990151	40,015	3,717
No StCDP relacionaddike1	StCDPK- addike1	MAVAKSNENTESSPYTSC		Sin G terminal			

Secuencias Activities (primeros 18 aa). Los residuos glicina (G) o cisteína (C) en negrita indican sitios putativos de miristoilación o palmitoilación. En gris se destacacias values de asparagina (N) que afectan negativamente la miristoilación (Yamauchi et al. 2010). Los sitios predichos por "NMT-The MYR Predictor, o "Myristoylator. En Myristoylator, el score (S) se basa en las respuestas promedio de 25 redes neuronales. S = Positivo - Negativo. Resultados positivos: 0,0 <5<0,4 -> Baja confianza; 0,4<5<0,85-> Confianza media; 0,85<5<1-> Alta Confianza. Puntuaciones negativas, no miristoilado. CLos sitios de palmitoilación fueron predichos por CSS-Palm 3.0.

Para estudiar si las CDPKs/CRKs de papa portan péptidos de tránsito a compartimentos subcelulares, se analizaron las secuencias utilizando las aplicaciones *TargetP 1.1* y *Wolf P Sort*. Se estableció con alta confianza la presencia de péptidos de tránsito a cloroplasto en los NTVs de StCDPK7/9/25 y 26 (Tabla C1. 3). Esta predicción se confirmó utilizando el programa *ChloroP 1.1* ( $Score \ge 0,5$ ). De acuerdo con este software, los péptidos de tránsito tienen 43, 63, 52 y 41 aa de longitud, respectivamente.

Tabla C1.3 Análisis de los potenciales péptidos señal en los NTV de las isoformas de papa

Grupo	Isoforma	Localización subcelular	Scores
1	StCDPK7	Cloroplasto	0,734
II	StCDPK9	Cloroplasto	0,767
1\/	StCDPK25	<ul><li>Cloroplasto</li></ul>	0,940
IV	StCDPK26	- Cloropiasto	0,533

Predicciones según el programa *ChloroP 1.1*. Se muestran sólo aquellas CDPKs que presentan potenciales péptidos de tránsito a cloroplasto ( $score \ge 0,5$ ).

La degradación de proteínas es un mecanismo rápido, regulador de control de diversos procesos biológicos. Un gran número de proteínas de corta vida media, entre ellas enzimas claves del control metabólico, FTs, PKs, fosfatasas y ciclinas presentan señales proteolíticas reconocidas por la maquinaria de degradación celular. Estas regiones, denominadas PEST, se caracterizan por ser ricas en residuos de prolina (P), glutamato/aspartato (E/D), serina (S) y treonina (T) y ser flanqueadas por aa básicos. Una búsqueda realizada en EMBOSS predijo potenciales motivos PEST en los NTV de StCDPK6/7/11 pertenecientes al grupo I y CRK3; en la región que abarca los subdominios VIII, IX y XI de StCDPK6/7 y CRK1/3 (Tabla C1.4) sugiriendo que estas proteínas podrían tener una mayor velocidad de recambio.

Tabla C1.4 Análisis de posibles motivos PEST (sitios de escisión proteolítica) de la familia de CDPK/CRK de papa.

Grupo	Isoforma	Posición (aa)	Potencial motivo PEST	Score	HI	DEPST:
	S+CDDV6	27-42	RVPDDTASTTNGGSSR	6,64	34,85	43,75 %(w/w)
	StCDPK6	331-349	HGDLDFSSDPWPSISEDAK	5,73	37,17	44,22 % (w/w)
		27-43	RSPDDSASTVNNDESVR	9,33	31,58	45,68 %(w/w)
•	StCDPK7	51-62	KETESPLPVQDK	5,29	32,41	39,08 %(w/w)
		328-346	HGDLDFTSDPWPSISEDAK	5,92	37,27	44,64 % (w/w)
	StCDPK11	25-50	KPNQSENLPLPNEGEPNSENSVDSSK	10,71	27,50	44,47 %(w/w)
	StCRK1	405-423	KADPSFEEQPWPTLSSEAK	7,38	33,92	44,25%(w/w)
ÇRK	StCRK3	10-33	RPNPYSPQEILPPPETPNVAETQK	( 6,65 33,86 42	42,87 %(w/w)	
	34LKK3	352-370	KADPTYDEAPWPTLT\$EAK	7,00	36,23	45,66 % (w/w)

El programa EMBOSS detalla la probabilidad de presentar posibles sitios PEST. Se muestran los potenciales motivos PEST junto con sus puntajes PEST (*score*), su índice de hidrofobicidad (HI) y el porcentaje en masa de DEPST.

### Estructura génica y localización cromosómica de la familia CDPK/CRK de papa

Al analizar la estructura de los genes CDPKs, CRKs y CDPK-like es evidente que todos los miembros de la familia CDPK/CRK comparten la posición de cuatro sitios de splicing y conservan el exón que codifica para el AD (Fig. C1.2), sugiriendo un único origen evolutivo. El tamaño de cuatro exones se conserva entre los genes StCDPKs de los grupos I, II y III (Fig. C1.2); la longitud del exón 1 (186 a 298 aa) en los grupos I y II depende de la longitud del dominio NTV (31 aa en StCDPK19 a 143 en StCDPK8). Por otra parte, los miembros de los distintos grupos conservan los sitios de splicing. Como se observa en la Fig. C1.2, todos los miembros del grupo I presentan una estructura de 7 exones/6 intrones, a excepción de StCDPK15 que tiene un sitio de splicing adicional en su NTV. Las isoformas del grupo II presentan una estructura de 8 exones/7 intrones; contienen un intrón adicional en el CLD que divide al exón 6, presente en los miembros del grupo I, en dos exones más pequeños. Un miembro de este grupo, StCDPK13, presenta un sitio de splicing adicional en su dominio NTV. Al analizar los cinco miembros del grupo III, se observa que StCDPK21 tiene la misma estructura génica que las isoformas del grupo I (7 exones/6 intrones), mientras que StCDPK20/22/23 y 24 poseen 8 exones/7 intrones. A diferencia del grupo II, el otro sitio de splicing se encuentra entre los subdominios V y VIb del KD. Al igual que StCDPK13 y 15, StCDPK20 también contiene un intrón extra en su dominio NTV (Fig. C1.2). Por otra parte, StCDPK25 y 26 del grupo IV presentan la misma estructura génica de 12 exones y 11 intrones; y comparten nueve sitios de splicing con StCRK1/2 y 3.

Aunque las posiciones de los intrones se conservan, el tamaño de los intrones es variable. Los genes *StCDPK3* y 5 son los más extensos (la CDS representa aproximadamente el 15 % de la longitud de genes) mientras que *StCDPK16* alberga los intrones más pequeños (la CDS representa 45,9 % de la longitud del gen) (Tabla C1.1).

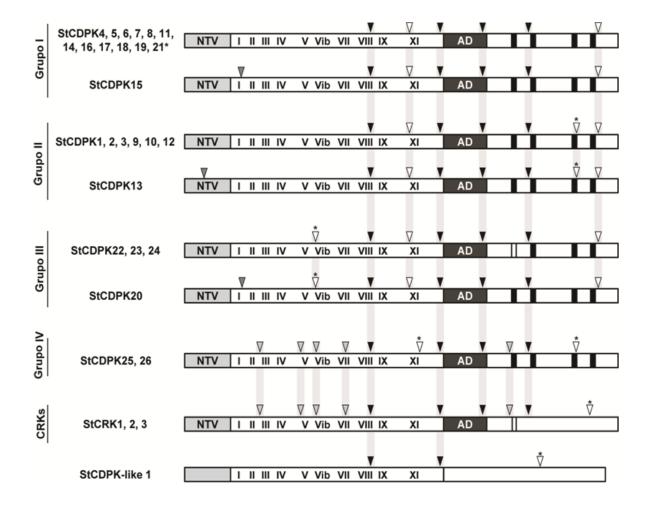


Fig. C1.2 Estructura aminoacídica y sitios de *splicing* de la familia CDPK/CRK de papa. Sitios de *splicing* de los genes *CDPKs*, *CRKs*, y *CDPK-like* de papa. Esquema de las proteínas: NTVs, regiones Nterminales variables; dominios de PK con los diferentes subdominios en números romanos; AD, dominio autoinhibitorio; *EF-hands* canónicas (barras negras) y degeneradas (barras blancas), están indicadas en los dominios de tipo CaM. Las posiciones del sitio de *splicing* se muestran mediante triángulos: ( $\nabla$ ) posiciones intrónicas conservadas entre todos los genes; ( $\nabla$ ) posiciones compartidas por genes *CDPK* del Grupo I, II, y III; ( $\nabla$ ). Posiciones compartidas por genes *CDPK* del Grupo IV y *CRKs*. (\*) Encima de los triángulos, indican los sitios de *splicing* que son exclusivos de cada grupo de *CDPKs*, *CRKs* o de *CDPK-like* 1. *StCDPK13/15/20* presentan una posición de *splicing* adicional en el NTV o KD ( $\nabla$ ). (\*\*) *StCDPK21* pertenece al grupo III.

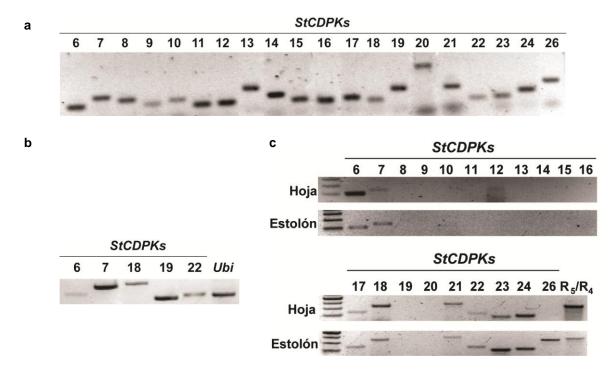
En el genoma de *S. phureja*, los genes de *CDPK* se distribuyen en todos los cromosomas, excepto el cromosoma 9 (Tabla C1.1). Hay cinco genes *CDPK* localizados en cromosoma 10 (4 de ellos son miembros del grupo I) y en el cromosoma 1. Curiosamente, el entorno genómico de *StCDPK4/8/11* localizados en cromosoma 10 es muy similar al de *CDPK5/15/16* localizados en el cromosoma 1. Además, *StCDPK4/5*; *8/16* y *11/15* están cercanos en el árbol filogenético (Fig. C1.1) y pueden ser considerados genes parálogos. Se encontraron otros cinco pares de genes parálogos (*StCDPK6/7*, *StCDPK13/10*, *StCDPK18/19*, *StCDPK23/24*,

StCDPK25/26); cuatro de estos pares tienen uno de sus miembros en el cromosoma 11 y el otro en los cromosomas 1, 4, 6 o 12. El par formado por StCDPK25/26 del grupo IV involucra los cromosomas 2 y 3. En cuanto a las CRKs, CRK1/2 son genes parálogos localizados en el mismo cromosoma, el 2. Una observación interesante es que StCDPK13 y 15 presentan un sitio de splicing extra en comparación con sus genes parálogos (StCDPK10/11) lo que sugiere que los diferentes genes fueron sometidos a diferentes presiones evolutivas.

#### Análisis de Expresión de las CDPKs

Se diseñaron oligonucleótidos específicos sobre las regiones NTV de cada nueva CDPK identificada (Tabla M&M1) para poder amplificar cada isoforma en particular. No se realizaron ensayos para las isoformas previamente descriptas (StCDPK1/2/3/4/5 y 25). Inicialmente se confirmó la presencia de los nuevos genes de la familia CDPK/CRK en papa; se realizó una reacción de PCR con dichos oligonucleótidos usando como templados ADN genómico de S. phureja (Fig. C1.3a), S. tuberosum subsp. Tuberosum var. Spunta y var. Desiree y de S. tuberosum subsp. Andigena. En el caso de StCDPK13 y 20, los amplicones obtenidos abarcaron el intrón presente en el NTV por lo que el tamaño de los mismos fue 230 y 400 pb, respectivamente.

Luego se realizaron ensayos de RT-PCR semicuantitativos usando como templados ADNc de plantas *in vitro* de *S. phureja* (Fig. C1.3b) y bibliotecas de ADNc de estolones tuberizantes o de hojas var. Desiree (Fig. C1.3c). Se utilizaron los oligonucleótidos específicos de cada CDPK y los oligonucleótidos R4/R5 que amplifican las isoformas StCDPK1/2 y 3 ya caracterizadas (Raíces et al. 2003). Como se observa en la Fig. C1.3b, se detectó expresión de *StCDPK6/7/18/19* pertenecientes al grupo I y *StCDPK22* del grupo III en *S. phureja*. A su vez, *StCDPK6/7/17/18* y *StCDPK21/22/23/24* del grupo III se expresan tanto en hojas como en estolones tuberizantes de *S. tuberosum*. Los tres genes *CRK* también se expresaron en hojas y en estolones (datos no mostrados). El análisis de datos de *RNAseq* disponibles en la base de datos del PGSC, indicó que *StCDPK6/7/17/18/21/22/23/24* y *StCRK1/2* y 3 se expresan de manera ubicua tanto en tejidos vegetativos como en tejidos florales. Por otra parte, *StCDPK12* (grupo II) se expresó débilmente en hojas, y *StCDPK26* (grupo IV) sólo se detectó en estolones tuberizantes (Fig. C1.3c). Los datos de *RNAseq* indican que *StCDPK12* exhibe bajos niveles de expresión (FPKM <5) en la mayoría de los tejidos excepto en frutos maduros (FPKM = 18) y que la expresión de *StCDPK26* es mayor en flores y en tubérculos que en hojas.



**Fig. C1.3 Análisis de expresión de** *StCDPKs.* **a** Presencia de genes de *CDPK* en ADN genómico de *S. phureja*. **b** Ensayos de RT-PCR semicuantitativos utilizando ADNc de *S. phureja* como templado. Se utilizaron oligonucléotidos específicos que amplifican Ubiquitina (Ubi), como control interno. **c** Ensayos de RT-PCR semicuantitativos utilizando bibliotecas de ADNc de hoja y de estolones tuberizantes como templados, y con oligonucleótidos específicos que amplifican cada CDPK recientemente identificada (6 a 26). Los oligonucleótidos R5/R4 amplifican *StCDPK1/2/3* (control positivo).

No se detectaron transcriptos de *StCDPK8/11/14/15/16/19* del grupo I, *StCDPK9/10/13* del grupo II o *StCDPK20* del grupo III. Los datos de *RNAseq* muestran que *StCDPK8/10/13/14/15/19* y *20* se transcriben casi exclusivamente en órganos florales, la mayoría de ellos en estambres, siendo *StCDPK13* la isoforma predominante (Fig. C1.4a). La expresión de *StCDPK20* fue relevante en carpelos (Fig. C1.4a). Los datos de *RNAseq* para *StCDPK16* sugieren que este gen no se expresa (FPKM valores < 1), mientras que la expresión de *StCDPK9* es baja en todos los tejidos. El análisis de los promotores de *StCDPK8/10/13/14/15/19* y *20*, utilizando las bases de datos PLACE (Higo 1998) y PlantCare (Lescot et al. 2002), y la aplicación FIMO de MEME Suite, reveló que contienen varios elementos reguladores presentes en genes expresados en polen, pistilo, pétalos o flores, corroborando su expresión en órganos florales (Apéndice 2). Curiosamente, los homólogos de *StCDPK14/15/16* en pimiento también se expresaron casi exclusivamente en flores (Cai et al. 2015) lo que sugiere que estos genes habrían adquirido su rol antes de la separación de las solanaceas.

Dado que nuestro interés era focalizarnos en CDPKs que podrían estar involucradas en las respuestas a estrés biótico, analizamos los datos de *RNAseq* disponibles en el PGSC realizados con hojas tratadas con elicitores (BABA y BTH) o infectadas con *P. infestans*. El

análisis indica que la expresión de *StCDPK6/7/17/18/21* y *25* aumenta ante estas condiciones en comparación con las hojas no tratadas (Fig. C1.4b).

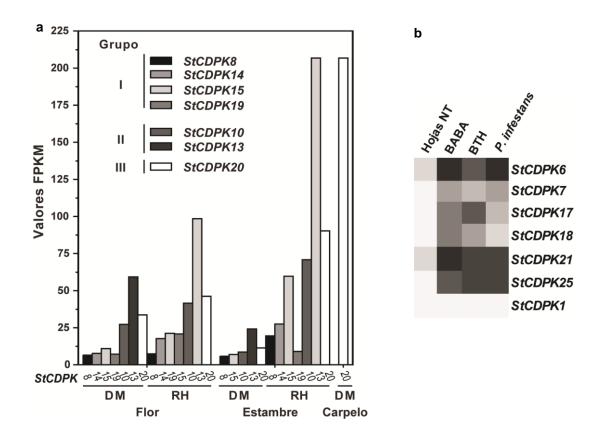


Fig. C1.4 Análisis de expresión de *StCDPKs*. a Valores FPKM (Fragmentos por kilobase de la transcripción por millón de lecturas mapeadas) para *StCDPK8/10/13/14/15/19/20* de acuerdo con los datos de *RNAseq* disponibles en PGSC; (RH) cultivar diploide heterocigoto de *S. tuberosum* Grupo Tuberosum cultivar RH89-039-16; (DM) doble monoploide *S. tuberosum* Grupo Phureja clon DM1-3. b La expresión de los miembros de la familia *CDPK* en respuesta a estreses bióticos usando datos de *RNAseq*: hojas no tratadas (ARN total de hoja, NT); hojas tratadas con elicitores, BABA o BTH (ARN total de hojas, tratadas a las 24 h, 48 h, 72 h); o infectadas con *P. infestans* (ARN de total de hojas tratadas a las 24 h, 48 h, 72 h). Los datos de *StCDPK1* se representan como control negativo. Escala: (□) sin expresión; (■), mayor nivel de expresión.

Se procedió a analizar las secuencias promotoras de las isoformas *StCDPK6*/7/17/18/21 y 25 inducidas por estreses bióticos (Fig. C1.4b). Según indica el Apéndice 3, estas secuencias promotoras contienen un alto número de elementos reguladores en *cis* que responden a SA, MeJa, elicitores o que están presentes en genes de respuesta a patógenos, asociados a defensa. El promotor de *StCDPK7* posee mayor número de motivos consensos PAL box A y L, y en menor medida box P; estos elementos están presentes en las secuencias promotoras de los genes *PAL* de perejil. Aparentemente son necesarios, pero no suficientes, para la activación de los genes *PAL*, mediada por luz o elicitores (Logemann et al. 1995). Además, el promotor de *StCDPK7* contiene elementos de unión al FT Pti4 de tomate que regula la expresión de genes relacionados con defensa (Chakravarthy et al. 2003). Por su parte, las

secuencias promotoras de las isoformas *StCDPK21* y *25,* presentan mayor número de repeticiones de elementos reguladores en *cis,* en concordancia, con su mayor inducción en respuesta a estreses bióticos (Fig. C1.4b).

#### **DISCUSIÓN**

Desde que fuera descripta por primera vez en Arabidopsis (Harmon et al. 2001; Cheng et al. 2002) se identificó la familia CDPK en los genomas de más de veinte angiospermas diferentes. La familia de mayor tamaño se encontró en maíz con 40 miembros (Kong et al. 2013) mientras que la familia de frutilla sólo cuenta con 16 miembros (Llop-Tous et al. 2002). En este trabajo hemos identificado veintiséis miembros de la familia CDPK de papa que se clasifican en cuatro grupos (Fig. C1.1) al igual que todos los genes CDPK de angiospermas, lo que sugiere que la expansión de la familia se produjo antes de la divergencia de monocotiledóneas y dicotiledóneas. El grupo IV es el grupo más pequeño al igual que en otras especies. Este está muy cerca de las CRKs en el árbol filogenético lo que indica un alto grado de similitud entre sus dominios catalíticos (Fig. C1.1). La presencia de EF-hands degenerados en las CRKs, sugiere que éstas pueden haber surgido hace relativamente poco tiempo en la evolución de un grupo distinto de CDPKs (Valmonte et al. 2014). En apoyo de esta hipótesis, los miembros del grupo IV y las CRKs presentan una estructura génica distinta del resto de la CDPKs (Fig. C1.2). El análisis evolutivo de CDPK de algas verdes a plantas superiores indicó que el linaje del grupo IV parecía haber divergido primero del último antepasado común. El grupo III forman un clado separado de los grupos I y II, mientras que la división entre los grupos I y II pareciera ser la más reciente (Valmonte et al. 2014). Por otro lado, los miembros del grupo III albergan sólo tres *EF-hands* en sus CLDs, por lo que el Ca<sup>2+</sup> podría no ser un requisito previo para la actividad. De hecho, AtCPK13, un miembro del grupo III de la familia de CDPK de Arabidopsis, es independiente de Ca<sup>2+</sup> (Ronzier et al. 2014).

La duplicación de genes (eventos de duplicación segmentaria) es la principal causa de expansión de la familia CDPK en plantas terrestres. De hecho, se encontraron ocho pares de genes de *CDPK* parálogos que comparten un nivel significativo de homología, tanto en el genoma de la papa como en el algodón (Liu et al. 2014), el tomate (Hu et al. 2016) y el pimiento (Cai et al. 2015). El análisis de pares de genes parálogos revela que la mayoría de los genes duplicados divergieron antes de la separación de las especies de *Solanum* (Aversano et al. 2015). Sin embargo, los genes de *CDPK* experimentaron una fuerte presión de selección depuradora con limitada divergencia funcional después de duplicaciones segmentarias, lo que sugiere que sus funciones no divergieron mucho durante la evolución posterior (Liu et al. 2014; Hu et al. 2016). Los mapas genéticos del tomate y la papa son casi colineares (Tanksley et al. 1992), y la sintenia ha sido demostrada por mapeo de RLFP para la papa, el tomate y el pimiento (Livingstone et al. 1999). Al comparar la familia CDPK de tomate y papa se observa que la distribución cromosómica es similar, y en ambos casos, los cromosomas 1 y 10, contienen 5 genes *CDPK*s.

El análisis de expresión génica de la familia CDPK/CRK de papa (este trabajo, los datos de *RNAseq* disponibles en el PGSC y trabajos previos de nuestro grupo y de otros laboratorios) indican que la mayoría de los genes se transcriben a excepción de *StCDPK16* (grupo I) mientras que *StCDPK9* y 12 (grupo II) presentan niveles bajos de expresión. El grupo I experimentó la mayor expansión con cinco pares de genes duplicados. Según los datos de *RNAseq*, la expresión de cinco miembros (*StCDPK8/11/14/15* y 19) se restringe a órganos florales. Con respecto a la expresión, las CDPK de la papa se pueden clasificar en aquellas que están ubicuamente expresadas en los diferentes tejidos y aquellas (aproximadamente un tercio de la familia CDPK) que tienen un patrón de expresión específico, preferentemente asociado a la reproducción sexual. Se han reportado CDPKs específicas de polen en varias especies, tales como petunia (Yoon et al. 2006), vid (Chen et al. 2013) o Arabidopsis (Zhou et al. 2009), lo que sugiere expansión funcional y divergencia de los miembros de esta familia. Por otro lado, la expresión de seis miembros del grupo I, *StCDPK4/5/6/7/17* y 18, se regula en respuesta a estreses bióticos (Fig. C1.4).

En base a los datos presentados en este capítulo, decidimos elegir, entre las nuevas CDPKs de papa identificadas, a StCDPK7 para caracterizarla en profundidad. Esta isoforma presenta ciertas características *in silico* interesantes, tales como un péptido de tránsito a cloroplastos y secuencias PEST en su NTV (Tablas C1.3 y 4). Además, de acuerdo a los datos de *RNAseq* del PGSC se induce ante la infección por *P. infestans* (Fig. C1.4). En los próximos capítulos de este trabajo de Tesis se analizará su expresión en tejidos, su localización subcelular, su actividad bioquímica y su expresión durante la interacción papa-*P. infestans*.

# CAPÍTULO 2: Estudio transcripcional y localización subcelular de StCDPK7

Con el fin de caracterizar en profundidad la isoforma StCDPK7 perteneciente al grupo I, se procedió a clonar y analizar sus CDS y promotora, estudiar su expresión en tejidos, y verificar su ubicación subcelular.

#### Clonado y análisis in silico de la secuencia codificante de StCDPK7

Se clonó la CDS de *StCDPK7* utilizando como templado una biblioteca de ADNc de *S. tuberosum* L var. Desiree de hoja, y oligonucleótidos diseñados sobre las regiones UTR 5´ y 3´ de la isoforma (Tabla MyM2). Se amplificó un fragmento de 1,7 kb que fue clonado en el plásmido pZErO-2. La secuencia aminoacídica, calculada a partir de la aplicación *Expasy – Translate tool*, presenta todos los dominios característicos de una CDPK (Fig. C2.1). El análisis bioinformático de la secuencia de StCDPK7 usando los programas *SMART*, *Pfam* y *PROSITE*, indica que la región N-terminal de la proteína contiene un dominio de baja complejidad comprendido entre los aa 17 y 39, y presenta una estructura desordenada entre los aa 70 a 90. El NTV es básico (pl: 8,71) y alberga dos potenciales dominios PEST y un péptido de tránsito a cloroplastos que fueron predichos *in silico* (Tablas C1.4, C1.5; Fig. C2.1). El KD abarca los aa 114 a 372, y en la región C-terminal de la proteína se encuentran los cuatro sitios *EF-hands* de unión al Ca<sup>2+</sup> (en la Tabla C2.1 se indica el inicio y fin de cada sitio).

Tabla C2.1 Predicción de motivos conservados en la secuencia de StCDPK7, a partir de los programas SMAR, Pfam y PROSITE

Nombre	Inicio	Fin	E-value
Baja Complejidad	70	90	N/A
KD	114	372	7,41E <sup>-100</sup>
EF-H	415	450	2,08E <sup>-8</sup>
EF-H	451	486	0,0575
EF-H	487	522	3,17E <sup>-4</sup>
EF-H	525	556	3,56E <sup>-7</sup>

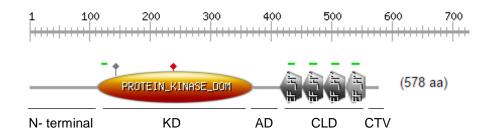


Fig. C2.1 Dominios predichos y secuencia aminoacídica de StCDPK7. Esquema modificado obtenido del programa ScanProsite, (◆) sitio activo, (◆) otros sitios, (-) motivos conservados. StCDPK7 presenta la estructura característica de una CDPK; en la secuencia se resaltan en gris los subdominios (I-XI) del KD; el AD y los cuatro sitios *EF-hand* del CLD. En verde se indican los 43 residuos de la región N-terminal que formarían parte del péptido de tránsito a cloroplasto, predicho por la aplicación *ChloroP 1.1*. Los recuadros indican los probables sitios PEST.

Como se observa en el árbol filogenético (Fig. C1.1), la CDS de *StCDPK7* presenta alta similitud de secuencia con sus ortólogos en Arabidopsis y tabaco, *AtCPK1* y *NtCDPK2*, que están involucrados en respuestas defensivas (Coca & San Segundo 2010; Romeis et al. 2001). A partir de un alineamiento local de las secuencias aminoacídicas, a través de la herramienta BLASTP, podemos concluir que StCDPK7, comparte 58% de identidad con AtCPK1 y 88% con NtCDPK2. NtCDPK2 y AtCPK1 también presentan potenciales motivos PEST en sus NTVs que podrían afectar la estabilidad de las proteínas (Witte et al. 2010). De las isoformas de papa pertenecientes al grupo I, StCDPK7 presenta alta similitud de secuencia con StCDPK6 (86%) y en menor grado con StCDPK4 y StCDPK5 (63% de identidad).

#### Clonado y análisis in silico de la secuencia promotora de StCDPK7

Para comprender mejor el rol que cumple StCDPK7 se procedió a clonar su secuencia promotora a partir de ADN genómico del cultivar Desiree y oligonucleótidos específicos conteniendo los sitios de corte de *BamHI* y *Sall* (Tabla MyM2). Se amplificaron 2.273 pares de bases (pb) río arriba del codón de inicio de la traducción. El inserto se clonó en el vector

binario pBI101 rio arriba del gen reportero de la β-Glucuronidasa (GUS) (Fig. C2.2). El constructo (promStCDPK7::GUS) se confirmó por secuenciación.

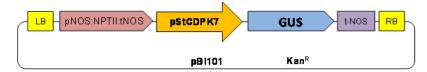
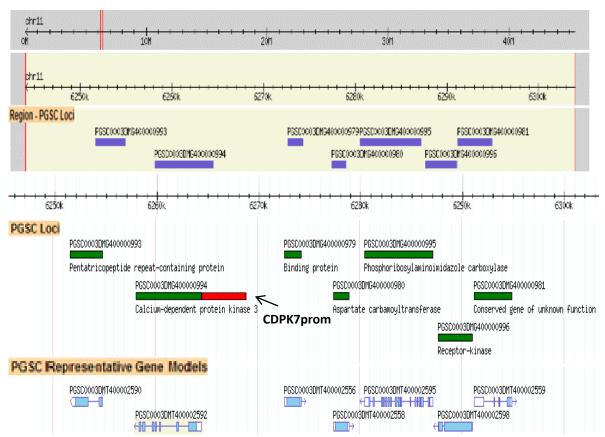


Fig.C2.2 Esquema de clonado, de la secuencia promotora de *StCDPK7* río arriba del gen reportero *GUS*. Construcción utilizada para generar plantas de papas transgénicas *promStCDPK7::GUS*.

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 reguladores de la transcripción más importantes (Ibraheem et al. 2010). Para verificar que la secuencia promotora no se solape con las regiones regulatorias de otros genes vecinos se analizó el entorno genómico (50 kb) de *StCDPK7* en el cromosoma 11 (Fig. C2.3).



**Fig.C2.3** Localización cromosómica de *StCDPK7* en el cromosoma 11 deacuerdo al Spud DB Genome **Browser.** Se muestran las 50 kb que rodean al gen. La imagen es una adaptación de la captura de pantalla. En rojo se indica la secuencia promotora clonada (2.273 pb).

La numeración de los genes *CDPK* en el genoma de papa no coincide con la de las cinco isoformas descriptas anteriormente. Por este motivo, en la base de datos de PGSC, *StCDPK7* se denomina CDPK3, que no hace referencia a la *StCDPK3* previamente caracterizada en

nuestro laboratorio (Grandellis et al. 2012). La región de 50 kb contiene otros seis genes además de *StCDPK7* (PGSC0003DMG400000994), (Fig. C2.3). El gen más cercano río arriba, que codifica para una proteína de unión, se encuentra a 8 kb en orientación cabeza-cabeza. Esto sugiere que la secuencia promotora a analizar sólo regularía la expresión de *StCDPK7*. A su vez, la secuencia más cercana río abajo, que codifica una proteína con repeticiones de pentatricopéptido (PPR), se ubica a 3 kb del codón de terminación, en orientación cabezacola. En consecuencia, no habría solapamientos entre el promotor de *PRR* y la secuencia del gen *StCDPK7*.

Se realizó el análisis *in silico* de los elementos reguladores en *cis* presentes en la secuencia promotora de *StCDPK7*. Los elementos encontrados se agruparon de acuerdo a su función (Tabla C2.2). Llamativamente, el promotor de *StCDPK7* presenta un gran número de elementos relacionados con la expresión en raíces, elementos presentes en los promotores de proteínas de reserva y de respuesta a citoquininas. También se encontraron elementos relacionados con defensa, por ejemplo el sitio de unión a WRKY71, identificado en arroz como un modulador transcripcional de la proteína 14-3-3, y de GF14b, inductor de la vía del JA y supresor de genes relacionados con la vía del SA (Liu et al. 2016). Las proteínas WRKY se unen específicamente a TGAC que contiene elementos de W box dentro del gen *PR-10* (Eulgem et al. 1999). El elemento WBOXATNPR1, hace referencia a la W-box que se encuentra en el promotor del gen *NPR1* en Arabidopsis, es reconocido específicamente por los FTs WRKY inducibles por SA (Yu et al. 2001). Los clúster de sitios de unión de WRKY pueden actuar como elementos reguladores negativos para la expresión inducible de AtWRKY18 (Chen & Chen 2002). Además presenta sitios WBOXNTERF3 de unión al represor transcripcional ERF3 que se induce por daño mecánico (Nishiuchi et al. 2004).

Tabla C2.2 Elementos reguladores en cis presentes en el promotor de StCDPK7

ELEMENTO	Nro. de ELEMENTOS	SECUENCIA	FUNCIÓN/TIPO DE ELEMENTO	FUNCIÓN
DOFCOREZM	33	AAAG	S000265	Metabolismo del carbono
CACTFTPPCA1	26	YACT	S000449	Metabolismo del Carbono
ARR1AT	30	NGATT	S000454	Modulador de citoquininas
CAATBOX1	23	CAAT	S000028	Presente en proteínas de
<b>EBOXBNNAPA</b>	20	CANNTG	S000144	reserva
GT1CONSENSUS	23	GRWAAW	S000198	Elementos de luz
MYCCONSENSUSAT	20	CANNTG	S000407	Respuesta a frío
ROOTMOTIFTAPOX1	18	ATATT	S000098	Expresión en raíces
WRKY71OS	15	TGAC	S000447	Defensa
WBOXATNPR1	11	TTGAC	S000390	Defensa
POLLEN1LELAT52	14	AGAAA	S000245	Desarrollo de polen y
GTGANTG10	13	GTGA	S000378	anteras
WBOXNTERF3	10	TGACY	S000457	Daño mecánico
GATABOX	9	GATA	S000039	GATA box
TATABOX5	8	TTATTT	S000203	TATA box

Los elementos se ordenaron por el número de repeticiones.

#### Análisis de expresión de StCDPK7

Según los datos de *RNASeq* disponibles en la base de datos de PGSC, el gen *StCDPK7* (PGSC0003DMT400002592) se expresa fuertemente en hojas tratadas con los elicitores, BABA, BTH o inoculadas con *P. infestans* (Fig. C1.4b). A su vez se detectó expresión en raíces, callos, tubérculos, tallos, flores, hojas y carpelos (valores FPKM > 5) sugiriendo que la expresión de esta quinasa es bastante ubicua, lo cual coincide con los resultadosde las RT-PCRs realizadas en hojas y estolones tuberizantes (Fig. C1.3c).

Se evaluó la expresión de StCDPK7 en hojas, pecíolos, tallos, raíces, estolones, estolones tuberizantes y mini-tubérculos obtenidos de plantas de invernadero por RT-qPCR (Fig. C2.4). Los valores obtenidos para cada órgano fueron normalizados con respecto a los niveles de StGAPDH. La expresión de StCDPK7 fue significativamente mayor (P < 0.05) en estolones tuberizantes, raíces y mini-tubérculos en comparación con hojas, tallos y estolones (Fig. C2.4) lo que correlaciona con los elementos reguladores relacionados con el metabolismo del carbono, expresión en raíces y elementos presentes en los promotores de proteínas de reserva, encontrados en su región promotora (Tabla C2.2).

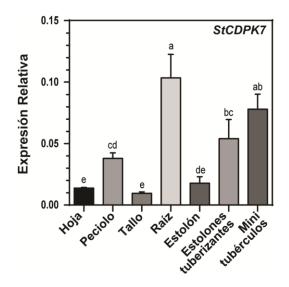
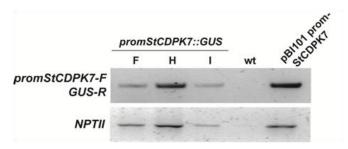


Fig. C2.4 Expresión relativa de StCDPK7 en distintos órganos de papa obtenidos de plantas de dos meses de edad cultivadas en tierra. En los ensayos de RT-qPCR se utilizó GAPDH como gen de referencia. Se graficaron las medias ± SEM de 3 réplicas biológicas, cada una con sus 3 réplicas técnicas, por órgano. Se analizó a través de ANOVA de un factor y se aplicó Tukey's HSD test. Diferentes letras (a-e) por encima de las barras indican diferencias significativas en los niveles de transcripción entre los órganos (P < 0,05).

#### Producción de líneas transgénicas promStCDPK7::GUS

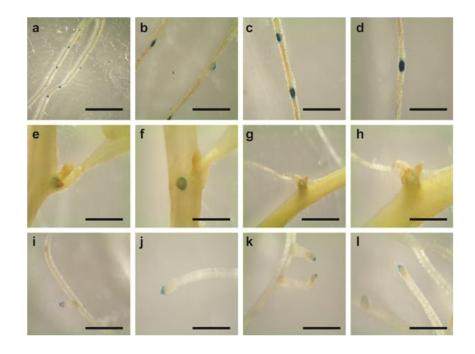
A fin de llevar a cabo un análisis espacio-temporal de la expresión de *StCDPK7* durante el ciclo de vida vegetativo de la papa, se generaron líneas portadoras del promotor de *StCDPK7* fusionado al gen reportero GUS (Fig. C2.2). Para ello se introdujo la construcción en la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404. A continuación, se transformaron entrenudos del cultivar Desiree y los eventos de transformación fueron seleccionados con kanamicina. Se generaron 9 líneas independientes y se chequeó la presencia del constructo a través de ensayos de PCR (Fig. C2.5) utilizando ADN genómico de cada línea como templado y oligonucleótidos

específicos (Tabla MyM2) que amplifican el extremo 3´ del promotor de StCDPK7 y parte de la región N-terminal del gen *GUS* (gel superior) y oligonucleótidos específicos del gen de la *Neomicina fosfotransferasa* (*NPTII*) (gel inferior). Como se observa en la Fig. C2.5, se confirmó la presencia del transgén en las líneas F, H e I (positivas para ambos amplicones). La var Desiree (wt) fue utilizada como control negativo y el plásmido pBI101-promStCDPK7 como control positivo.



**Fig. C2.5 Detección del transgén en las líneas obtenidas.** Ensayos de PCR, utilizando como templado ADN genómico de las líneas F, H e I, del wt (control negativo), y el plásmido pBI101 conteniendo el promotor (control positivo). Gel superior: los oligonucleótidos amplifican el fragmento comprendido entre el extremo 3´ de la secuencia promotora de StCDPK7y el extremo 5´ del gen *GUS*. Gel inferior: los oligonucleótidos amplifican el gen *NPTII* de resistencia a kanamicina.

Las plantas *promStCDPK7::GUS* se lograron generar casi al final de mi período de beca Doctoral por lo que aquí se presenta un análisis preliminar de las líneas cultivadas *in vitro* en condiciones de multiplicación durante 20 días. Luego de incubar con el Buffer X-Gluc se observó actividad GUS en las líneas H e I (Fig. C2.6). La coloración se encuentra restringida a los puntos de desarrollo de las raíces laterales (Fig. C2.6a-d) y alrededor de las raíces adventicias que crecen en los nudos de los tallos (Fig. C2.6e-h). En la línea I (Fig. C2.6i-l) se puede observar coloración en los *tips* de las raíces laterales, ya sea caliptra y meristema apical de raíz. Estos resultados condicen con los elementos reguladores en *cis* de expresión en raíces, hallados en el promotor (Tabla C2.2) y con la expresión mayoritaria en raíces detectada en los ensayos de RT-qPCR de tejidos (Fig C2.4). No se observa coloración cuando el mismo ensayo se realiza con plantas transformadas con el vector pBI101 vacío (Santin et al. 2016).



**Fig. C2.6 Actividad GUS de las plantas** *in vitro promStCDPK7::GUS.* **a-h** Línea H, **a-d** Punto de generación de raíces laterales. **e-h** Raíces adventicias de tallo. **i-l** Línea I, *tips* de raíces laterales. Barra graduada en 4 mm (a y g), en 2 mm (b, c, d, e, f, h, i, j, k y l)

En los ensayos de RT-qPCR la expresión relativa fue variable, se detectó el transcripto en todos los órganos de la planta indicando una expresión ubicua, sin embargo los resultados de las plantas *promStCDPK7::GUS* sugieren una expresión muy específica y restringida. Resta completar este análisis en plantas cultivadas *in vitro*, en condiciones de tuberización, y en tierra.

#### Análisis de la localización subcelular de StCDPK7

#### a) Expresión transitoria de StCDPK7<sup>1-157aa</sup>:GFP en N. benthamiana por biobalística

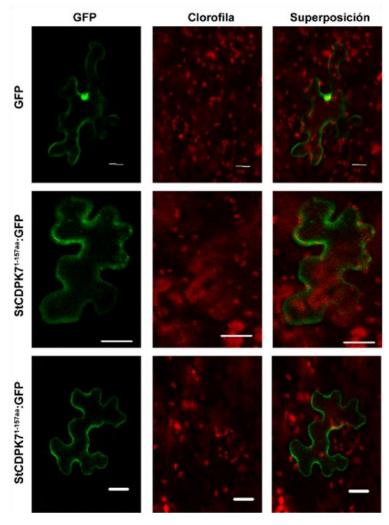
Como hemos mencionado anteriormente (capítulo 1), los dominios NTV de las CDPKs generalmente presentan una G en la posición 2 y una C en las posiciones 4 o 5, las cuales son posibles sitios de miristoilación co-traduccional y posterior palmitoilación reversible (Asano et al. 2005). Las predicciones realizadas para esta isoforma indican una baja probabilidad de ser acilada (Tabla C1.2), sin embargo diferentes programas predijeron la presencia de un péptido de tránsito a cloroplastos (Tabla C1.3). Hasta el momento no se ha descripto una CDPK con localización en cloroplastos. Con el fin de confirmar si esta secuencia efectivamente dirige la proteína a cloroplasto, se clonó un fragmento de 540 pb que abarca el NTV y parte del KD en el vector binario pCAMBIA1302 obteniendo de este modo la proteína de fusión StCDPK7<sup>1-157aa</sup>:GFP bajo el control del promotor constitutivo 35S (Fig.

C2.7). Se eligió la región N-terminal que presenta el *score* más alto de acuerdo al programa *ChloroP 1.1*.



**Fig.C2.7** Esquema de clonado de la región N-terminal de StCDPK7 río arriba del gen reportero GFP. Se clonó un fragmento de 540 pb, correspondientes al NTV y KD. Se indican los 43 aa que comprenden el péptido señal de tránsito a cloroplasto predicho por el programa *ChloroP 1.1*.

No fue posible obtener clones de *A. tumefaciens* transformantes utilizando las cepas GV3101, LBA4404 o EHA105. Por lo tanto se realizaron ensayos de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* mediadas por biobalística, a través de partículas de oro. Luego de dos días, la proteína de fusión a GFP expresada en células epidérmicas se visualizó en el microscopio confocal Zeiss LSM Meta 510.



**Fig. C2.8 Localización subcelular de StCDPK7.** Imágenes de microscopia confocal de epidermis de hojas de *N. benthamiana* expresando GFP o la proteína de fusiónStCDPK7<sup>1-157aa</sup>:GFP. Primera fila,

control de GFP libre. Segunda y tercer fila, fluorescencia de StCDPK7<sup>1-157aa</sup>:GFP en células epidérmicas. GFP se muestra en verde, la autofluorescencia de la clorofila, utilizada como control de localización plastídica, en rojo. Las imágenes son proyecciones máximas de 15 a 30 marcos. Barras graduadas en 20 µm.

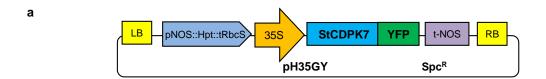
Se observó que la proteína de fusión StCDPK7<sup>1-157aa</sup>:GFP presenta localización citosólica en las células epidérmicas transformadas. No se observó co-localización con la autofluorescencia de los cloroplastos (Fig. C2.8)

#### b) Expresión transitoria de StCDPK7:YPF en N. benthamiana mediada por A. tumefaciens

Para corroborar este resultado, se clonó la CDS completa de StCDPK7 en el vector pCAMBIA1302. Como en el caso anterior, no fue posible obtener clones de *A. tumefaciens* transformantes. Con el fin de realizar ensayos de transformación transitoria mediada por *A. tumefaciens*, se clonó la secuencia completa de la proteína, por recombinación homóloga a partir del vector de entrada pENTR 2B, en el plásmido pH35GY (Fig. C2.9a). De este modo se obtuvo la proteína completa fusionada a YFP en el extremo C-terminal. A los dos días post agroinfiltración con la cepa GV3101 transformada (DO=0,2), se procedió a observar las hojas en el microscopio confocal Olympus FV300/BX61. Las células epidérmicas muestran una localización citosólica/nuclear de StCDPK7:YFP y no se observó co-localización con la fluorescencia de los cloroplastos (Fig. C2.9b).

Para confirmar que la fluorescencia observada proceda de la proteína de fusión StCDPK7:YFP y no de YFP libre, se realizaron en simultáneo western blots con el anticuerpo (AC) anti-GFP a partir de extractos de proteínas totales de hojas agroinfiltradas con las dos construcciones y la cepa GV3101 (control negativo, C-) (Fig. C2.10). La banda revelada fue muy tenue pero sólo se detectó StCDPK7:YFP (94 kDa) en las hojas agroinfiltradas con la proteína de fusión mientras que en los controles se detectó una banda de menor tamaño correspondiente a YFP:YFP (56 kDa).

La localización citosólica/nuclear de StCDPK7:YFP coincide con los análisis *in silico* en los programas de miristoilación y palmitoilación (capítulo 1), los cuales indican que es una proteína no acilada. Al menos en estas condiciones experimentales, StCDPK7 no está dirigida a cloroplastos.



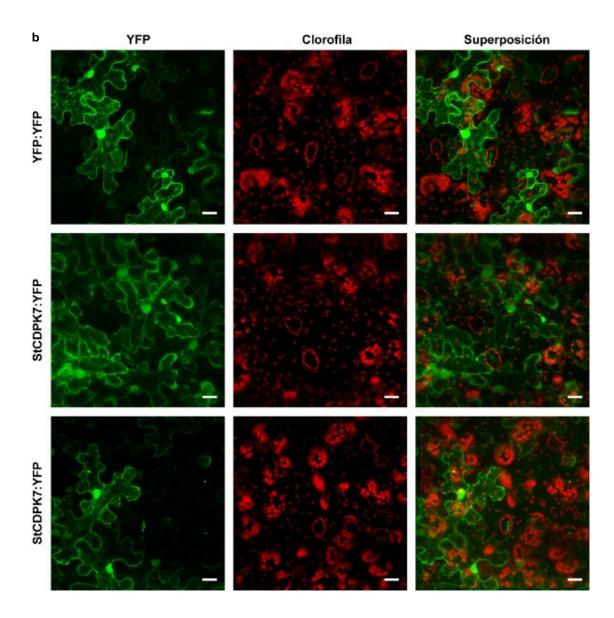


Fig. C2.9 Localización subcelular de StCDPK7 en células epidérmicas de *N. benthamiana*. a Esquema de clonado de StCDPK7 fusionada al gen reportero YFP. Se clonó la CDS completa. b Imágenes confocales de las células epidérmicas de *N. benthamiana*, expresando YFP:YPF, control (primera fila) y la proteína de fusión StCDPK7:YFP (segunda y tercera fila). La fluorescencia de YFP se muestra en verde, la autofluorescencia de la clorofila, localización plastídica, en rojo. Las imágenes son proyecciones máximas de 15 a 30 marcos. Barras graduadas en 20 μm.

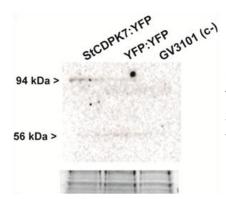


Fig. C2.10 Western blot de extractos de proteínas totales de hojas (50 μg) expresando transitoriamente StCDPK7:YFP o YFP:YFP. Se confirmó la presencia de la proteína fusión StCDPK7:YFP (94 KDa) y de YFP:YFP (56 kDa). Panel superior: western blot revelado con el AC anti-GFP (1:2.000). Panel inferior: SDS-PAGE teñido con Coomassie Brilliant Blue.

#### **DISCUSIÓN**

La decisión de focalizarnos en StCDPK7 surgió del análisis de datos de *RNAseq*, disponibles en la base de datos del PGSC, que mostraban su inducción en respuesta a la infección por el patógeno hemibiotrófico *P. infestans*, y de la predicción *in silico* de un péptido señal de tránsito a cloroplasto en su extremo N-terminal. El clonado de la CDS de StCDPK7 y análisis de homología de secuencias indicó que sus ortólogos más cercanos en tabaco y Arabidopsis, son NtCDPK2/3 y AtCPK1, que desempeñan un papel importante en las respuestas de defensa desencadenadas por elicitores fúngicos (Romeis et al. 2001; Coca & San Segundo 2010). Además, StCDPK7 pertenece al mismo grupo que StCDPK5, cuya sobreexpresión confiere a la planta de papa resistencia a la infección con *P. infestans* (Kobayashi et al. 2012).

Con el fin de caracterizar el patrón de expresión de *StCDPK7* se llevó a cabo un análisis exhaustivo de su secuencia promotora y de su perfil de expresión en tejidos. El análisis de datos de *RNAseq* y los ensayos de expresión descriptos en el capítulo 1 sugieren que StCDPK7 presenta una expresión ubicua al igual que StCDPK1, 2 y 3 descriptas previamente en papa. A su vez, los ensayos de RT-qPCR desarrollados en este capítulo indican que StCDPK7 presenta mayores niveles de expresión relativa en raíces, estolones tuberizantes y mini tubérculos (Fig. C2.4), en concordancia con los elementos reguladores en *cis* encontrados en su promotor (Tabla C2.2).

La generación de plantas transgénicas, conteniendo la secuencia promotora de StCDPK7 fusionada al gen reportero GUS, permite complementar el análisis de los niveles de expresión dando una idea de la expresión espacio-temporal del gen. La detección de la actividad GUS es muy sensible, pudiéndose detectar a nivel de unas pocas células. En trabajos previos realizados en el laboratorio con plantas promStCDPK1/2 o 3::GUS se observó que la expresión de StCDPK1 está fuertemente asociada al tejido vascular en hojas, tallos, raíces y estadios de tuberización (Santin et al. 2016), que StCDPK2 se expresa en la lámina foliar y en los tips de las raíces (Santin et al. IPMB2015) y que StCDPK3 presenta una expresión ubicua concentrándose en zonas de activo crecimiento (Grandellis et al. 2012). En el caso de StCDPK7, la actividad GUS quedó exclusivamente restringida a los puntos de inicio y a los tips de raíces laterales, y a la región que circunda el desarrollo de raíces adventicias en

tallo, indicando una expresión muy específica. La formación de raíces laterales involucra la estimulación de células maduras del periciclo para proliferar y re-diferenciarse y así crear un nuevo órgano. La organización y diferenciación celular en el primordio de raíces laterales precede a la aparición del meristema lateral de la raíz y muestra un patrón de expresión de genes diferencial que es aparente después de las primeras divisiones del periciclo (Nawy et al. 2005). Es importante analizar en más detalle la expresión de *StCDPK7* en este proceso de desarrollo. Dado que estas plantas se obtuvieron recientemente, se deben repetir estos resultados y queda pendiente analizar otros estadios de crecimiento y complementar el estudio con cortes histológicos.

El clonado de StCDPK7, permitió comprobar que efectivamente posee todos los dominios y subdominios característicos de las CDPKs (Talevich et al. 2011). Al comparar su secuencia con otros miembros de la familia CDPK, se observa que los dominios KD, AD y CLD están altamente conservados y presentan una estructura proteica muy similar sugiriendo que estuvieron sujetos a una fuerte presión de selección. Sin embargo, su NTV presenta una región desordenada de baja complejidad, característica de regiones de interacción proteínaproteína. Los dominios NTV de las CDPKs han sido involucrados en determinar la localización de cada isoforma y su interacción con proteínas blanco. La localización subcelular es crucial para la función fisiológica de las CDPKs ya que determina con cuales proteínas podrían interactuar. Muchas CDPKs están asociadas a membranas y otras presentan una localización citosólica/nuclear (Lu & Hrabak 2002; Dammann et al. 2003; Simeunovic et al. 2016a). La asociación a membranas está mayormente determinada por modificaciones co- o posttraduccionales tales como miristoilación y palmitoilación, cuyos consensos se encuentran en el NTV de las proteínas. En trabajos previos con fusiones a GFP se determinó que StCDPK1 se localiza en MP y que esta localización depende tanto de miristoilación como de palmitoilación ya que la mutación de cualquiera de estos sitios provoca que la proteína de fusión se localice en el citosol (Raíces et al. 2003). A su vez, fusiones StCDPK5:GFP se localizan en MP (Asai et al. 2013), en este caso sólo la palmitoilación es suficiente ya que de acuerdo a programas de predicción StCDPK5 no se miristoila (Tabla C1.2). Si se intercambia el NTV de StCDPK5 con el de SICDPK2 de tomate (ortólogo de StCDPK6) la proteína quimérica modifica su ubicación al trans-Golgi donde se localiza SICDPK2 (Asai et al. 2013). Estos ejemplos resaltan el papel fundamental que tiene el NTV en la localización subcelular de las proteínas.

En el caso particular de StCDPK7, las predicciones *in silico*, indican que no se miristoila ni palmitoila, pero detectan, en la región N-terminal, la presencia de un péptido señal de tránsito a cloroplasto. Sin embargo, los ensayos de expresión transitoria en *N. benthamiana*, ya sea usando el extremo N-terminal o la proteína completa fusionada a GFP o YPF, muestran que StCDPK7 presenta una localización citosólica/nuclear, consistente con el hecho de ser una proteína no acilada. No se evidencia la localización en cloroplastos. Se ha demostrado que la N-acilación de proteínas es capaz de anular los péptidos dirigidos a

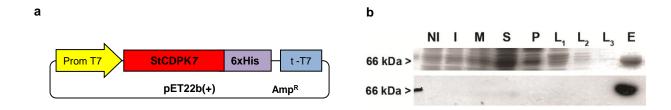
cloroplasto; de hecho, la N-acilación artificial de las proteínas localizadas en el cloroplasto inhibe su importación (Stael et al., 2011). Debido a que los resultados se obtuvieron bajo condiciones de crecimiento estándar, no podemos descartar que StCDPK7 podría modificar su localización en una condición de estrés como se informó para McCPK1 de *Mesembryanthemum crystallinum* (Chehab et al. 2004). De hecho, los primeros aa de StCDPK7 (MGNTCVGPS) son idénticos a los de AtCPK1 y NtCDPK2 y se encontró que NtCDPK2 está asociada a extractos particulados en condiciones de estrés (Romeis et al. 2001), mientras que AtCPK1 se encuentra dualmente localizada en cuerpos lipídicos y peroxisomas (Coca & San Segundo 2010). Para completar los estudios de localización de StCDPK7, a futuro se repetirán las agroinfiltraciones en *N. benthamiana* y se someterán las plantas a infección con *P. infestans*.

### CAPÍTULO 3: Caracterización bioquímica de StCDPK7:6xHis

La CDS de *StCDPK7* presenta todos los dominios propios de las CDPKs (Fig C2.1); sin embargo es necesario comprobar que codifica una CDPK activa. De hecho se reportó que StCDPK6, su homólogo más cercano en papa, no posee actividad quinasa (Asai et al. 2013). Se decidió obtener la StCDPK7 recombinante en bacterias.

#### Expresión, purificación y actividad de StCDPK7:6xHis

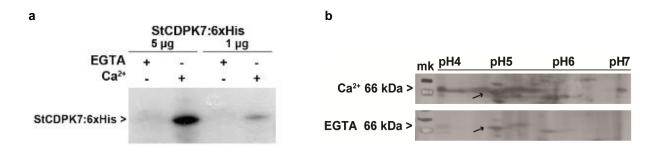
Se clonó la CDS completa de StCDPK7 en el vector de expresión pET22 b(+) (Fig. C3.1a) utilizando las enzimas de restricción *Ndel* y *Xhol*. El vector está diseñado para obtener la proteína etiquetada con seis histidinas en el extremo C- terminal (StCDPK7:6xHis) lo que permite su purificación por cromatografía de afinidad en una columna de níquel-agarosa. Se transformaron bacterias *E.coli* SHuffle (Lobstein et al. 2012) con el plásmido recombinante y se indujo la expresión de la proteína con IPTG (1mM). El cultivo inducido (I) se sembró en la matriz Ni-Shepharose -IMAC, que se eluyó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los pasos de purificación se analizaron por SDS-PAGE (Fig.C3.1b, panel superior) y western blot con el AC anti-polihistidina (anti-His) (Fig.C3.1b, panel inferior) confirmándose la obtención de la proteína StCDPK7:6xHis del tamaño esperado (66 kDa).



**Fig. C3.1 Expresión y purificación de StCDPK7:6xHis.** a Esquema de clonado en el vector de expresiónpET22b(+). **b** Alícuotas (50 μg) de los pasos de producción y purificación de la enzima recombinante se analizaron por SDS-PAGE (10%): cultivo no inducido (NI), cultivo inducido (I), fracción de membrana (M), fracción soluble (S), percolado (P) lavados (L) y eluido (E). Panel superior: tinción con Coomasie Blue. Panel inferior: western blot revelado con el AC anti-His (1:5000). Las flechas señalan la banda de PM esperado.

La enzima dializada se utilizó en ensayos de autofosforilación (Fig. C3.2) y de actividad quinasa de proteínas (Fig. C3.4). En el ensayo de autofosforilación, StCDPK7:6xHis (1 o 5  $\mu$ g) se incubó con 5  $\mu$ M ATP ( $\gamma^{32}$ P) y 10 mM magnesio (Mg²+) en presencia de 1 mM EGTA o 25  $\mu$ M Ca²+. El ensayo en gel (Fig. C3.2a) demuestra que la enzima es capaz de autofosforilarse y que esta reacción es dependiente de Ca²+. A continuación se analizó la autofosforilación de StCDPK7:6xHis por electroforesis bidimensional (2D) y se reveló con ProQ-Diamond, fluoróforo capaz de discriminar entre proteínas fosforiladas y no-fosforiladas. El pl de la enzima es 5,2; al realizar la reacción de autofosforilación en presencia de Ca²+ se observa una

banda que representa los distintos grados de fosforilación de la enzima (Fig. C3.2b). Los mismos migran hacia pH más ácidos debido a las cargas negativas de los grupos fosfatos. Es muy probable que StCDPK7 se autofosforile en múltiples sitios. Cuando se realiza la reacción con EGTA, los estados de fosforilación se reducen y la proteína no migra hacia pH más ácidos. Dada la gran sensibilidad del reactivo ProQ-Diamond se detectan otras proteínas fosforiladas en el gel.



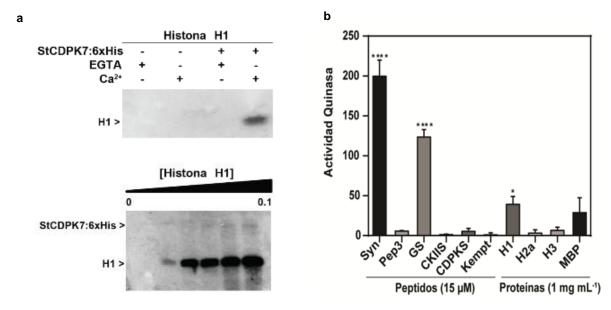
**Fig. C3.2. Autofosforilación de StCDPK7:6xHis. a** SDS-PAGE de la enzima autofosforilada (5 y 1 μg) en presencia de 1 mM EGTA o 25 μM  $\text{Ca}^2$ . **b** Electroforesis bidimensional de StCDPK7:6xHis. Se incubó la proteína en presencia de 10 mM EGTA o 25 μM  $\text{Ca}^{2+}$  con ATP frío. Las muestras se sembraron en tiras comerciales de 7 cm, pH 4-7. Se reveló con ProQ-Diamond. Las flechas señalan la banda de PM esperado.

Como fuera mencionado en el capítulo 2, StCDPK7 comparte alta identidad de secuencia con NtCDPK2 de tabaco (Romeis et al. 2001) y con AtCPK1 de Arabidopsis (Coca & San Segundo 2010), incluso en el NTV donde las tres proteínas presentan potenciales motivos PEST (Fig. C3.3). En particular, comparte los residuos S-18 y T-65, los cuales demostraron ser sitios de autofosforilación en ambas proteínas (Romeis et al. 2001; Witte et al. 2010). La fosforilación, el recambio y la actividad enzimática deNtCDPK2 es inducida por estrés (Romeis et al. 2001). Se demostró que en NtCDPK2, S-40 y T-65 son fosforilados en menos de 2 min, post estrés; S-40 es blanco de fosforilación de una PK, río arriba en la vía de señalización y se requiere la localización de NtCDPK2 en membrana para su fosforilación (Witte et al. 2010). StCDPK7 alberga un residuo fosfomimético, ácido glutámico (E), en lugar de S-40, y un residuo S en la posición 41 (Fig. C3.3). Por otra parte, AtCPK1 presenta sitios de autofosforilación adicionales (Hegeman et al. 2006), y S-40 se sustituye por isoleucina (I).



Fig. C3.3 Alineamiento de la región N-terminal de StCDPK7 (resaltado en negrita), AtCPK1 y NtCDPK2. La glicina (G) en la posición 2 y la cisteína (C) en la posición 5 se destacan en negrita. Los residuos de serina (S) y treonina (T) idénticos están sombreados en negro. La flecha negra indica la posición de S-40 en NtCDPK2.

Se probó la capacidad de StCDPK7:6xHis (0,2 μg) de fosforilar Histona (H1) en presencia de Ca<sup>2+</sup> o EGTA (Fig. C3.4a, panel superior). Se confirma que la actividad quinasa es dependiente de Ca<sup>2+</sup>, ya que se detecta la banda fosforilada (21 kDa) correspondiente a H1 sólo en presencia del catión. Se realizó otro ensayo de fosforilación en presencia Ca<sup>2+</sup> utilizando concentraciones crecientes de H1 (Fig. C3.4a, panel inferior). Es interesante observar que a mayor concentración de sustrato se detecta la autofosforilación de la enzima (Fig. C3.4a panel inferior).



**Fig. C3.4 Actividad quinasa de StCDPK7:6xHis a** Ensayo de fosforilación de Histona 1 (H1) en geles. Se incubaron 0,2 μg de enzima con H1 (0,1 mg.mL<sup>-1</sup>) en presencia de 25 μM Ca<sup>2+</sup> o 1 mM EGTA (panel superior). Se incubaron diferentes concentraciones de H1 (0, 2,  $5.10^{-3}$ ,  $1,25.10^{-2}$ ,  $2,5.10^{-2}$ ,  $5.10^{-2}$  y 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>) con StCDPK7:6xHis en presencia de Ca<sup>2+</sup> 25 μM (panel inferior). **b** Ensayos de Actividad Quinasa (μmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>) de StCDPK7:6xHis realizados en presencia de 25 μM Ca<sup>2+</sup> utilizando distintos peptidos y proteínas como sustratos: Syntide-2 (Syn), Peptido 3 derivado de PP2A (Pep3),

derivado de Glucógeno Sintasa (GS), Sustrato de la Proteína Kinasa dependiente de CaM (CDPKS), kemptido (Kempt), Sustrato de la Casein Kinasa II (CKIIS), Proteína Básica de Mielina (MBP), Histona 1 (H1), Histona 2a (H2a) e Histona 3 (H3). Se graficaron las Medias  $\pm$  SEM de tres ensayos independientes con tres replicas técnicas cada uno. *Student's t test* fue aplicado utilizando kemptido como control negativo (\*P < 0,05, \*\*\*\*P < 0,0001).

La actividad quinasa se define como  $\mu$ mol.min<sup>-1</sup> de ATP $\gamma$ P<sup>32</sup> incorporado por mg de proteína. Con el fin de identificar el sustrato óptimo de la quinasa, se estudió la capacidad de la misma de fosforilar distintos sustratos comerciales, tanto péptidos como proteínas (Fig. C3.4b). Los sustratos óptimos de StCDPK7:6xHis, son los péptidos Syntide-2 (Syn), Glucógeno Sintasa (GS) (P < 0,0001) en comparación con el kemptido, el cual no es fosforilable por CDPKs. Se observa que StCDPK7:6xHis es incapaz de fosforilar al Peptido 3 derivado de la PP2A (Pep3), el Sustrato de la Proteína Kinasa Dependiente de CaM (CDPKS) y el Sustrato de la Caseín Kinasa II (CKIIS). Entre las proteínas, StCDPK7:6xHis puede fosforilar a H1 (P < 0,05) que es rica en lisinas; sin embargo, la Proteína Básica de Mielina (MBP), las histonas H2a, ligeramente rica en lisinas; y H3, rica en argininas, son pobres aceptores. Se demuestra de este modo que StCDPK7:6xHis fosforila en forma selectiva diferentes proteínas.

# Dependencia de Ca<sup>2+</sup> de StCDPK7:6xHis. Efecto de quelantes de Ca<sup>2+</sup> y antagonistas de CaM

Se comprobó que la actividad quinasa de StCDPK7:6xHis es dependiente de Ca<sup>2+</sup> (Figs. C3.1, C3.2 y C3.4) y al realizar la curva de Ca<sup>2+</sup>, usando Syn como sustrato, se determinó que 25 μM Ca<sup>2+</sup> es la concentración requerida para alcanzar la actividad máxima (Fig. C3.5a). Para conocer la enzima en profundidad también se estudió cuáles son los agentes capaces de inhibirla. El EGTA secuestra Ca<sup>2+</sup> inactivando a la enzima de forma indirecta. A partir de la curva de inhibición de EGTA (Fig. C3.5b) se obtuvo el Ki para EGTA: 0,44 ± 0,07 mM. Se define como la concentración de EGTA necesaria para reducir la actividad a la mitad de la V<sub>máx</sub>. Además, se comparó la acción de dos quelantes específicos de Ca<sup>2+</sup>, EGTA y BAPTA. La estructura del BAPTA es similar a la del EGTA, la mayor diferencia se debe a un cambio de un grupo amino alifático en el EGTA por un grupo amino aromático en el BAPTA. Esta es una característica importante porque el amino alifático del EGTA tiene un pK<sub>a</sub>s entre 8,5 y 9,5; mientras que el del BAPTA es de 5,97 y 6,36. Este pK<sub>a</sub> más bajo, lo hace insensible a las pequeñas fluctuaciones de pH, lo que hace que sea más rápido uniendo Ca<sup>2+</sup> (Chung et al. 2016). En nuestros ensayos de inhibición, bajo las condiciones estándares de reacción, no hubo diferencias significativas entre la acción del EGTA y el BAPTA (Fig. C3.5c) a las

La dependencia de  $Ca^{2+}$  se confirmó adicionalmente utilizando Syn como sustrato, en presencia de quelantes de  $Ca^{2-}$  y/o antagonistas de CaM (Fig. C3.5d). La actividad de StCDPK7:6xHis se inhibe significativamente (\*\*\*\*P < 0,0001 y \*P < 0,05) en presencia de todos los antagonistas de CaM, excepto KN-62. Este es un inhibidor de las PKs dependientes de  $Ca^{2+}$ /CaM II, se une al sitio de unión de la CaM. Pero no inhibe la actividad de la enzima

concentraciones utilizadas.

cuando ésta está fosforilada. Posiblemente no afecte la actividad de StCDPK7:6xHis, ya que ésta se encuentra fosforilada en presencia de Ca<sup>2+</sup> y no presenta un sitio de unión a CaM. A su vez el compuesto 48/80, inhibidor de fosfolipasa C sólo inhibió a concentraciones elevadas (10 µg.mL<sup>-1</sup>).

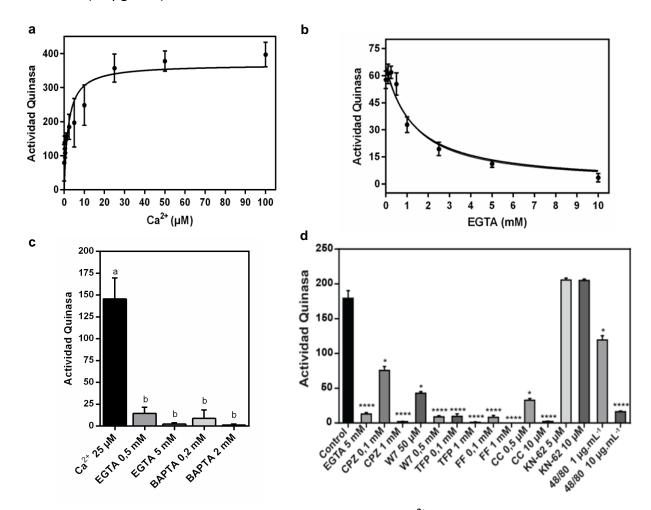
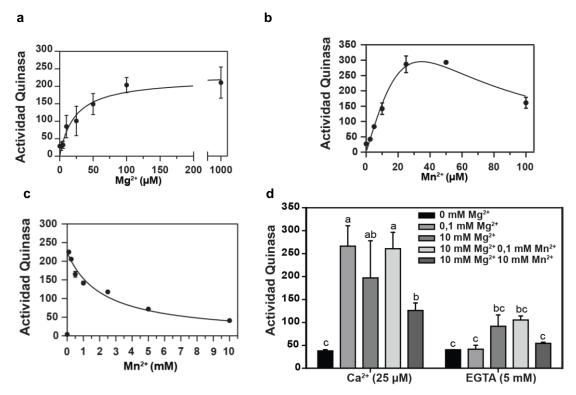


Fig. C3.5 Inhibición de la actividad StCDPK7 por quelantes de Ca<sup>2+</sup> y antagonistas de CaM. Todos los ensayos se llevaron a cabo utilizando 15 μM Syn, 50 μM de ATPyP<sup>32</sup> y 0,2 μg de enzima. **a** Curva de concentración de Ca<sup>2+</sup>, Actividad Quinasa (µmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>Proteína). **b** Curva de concentración de EGTA. c Comparación del efecto de 2 quelantes con afinidad diferencial por Ca<sup>2+</sup>, EGTA y BAPTA. Se graficaron las medias ± SEM, ANOVA de dos factores y posterior Tukey's HSD test. d Se probó la Actividad Quinasa de StCDPK7:6xHis en presencia de Ca<sup>2+</sup> (control positivo), quelantes de Ca<sup>2+</sup> o antagonistas de CaM: Clorpromazina (CPZ), derivados del ácido naftaleno - sulfónico W7 (W7), Trifluoperazina (TFP), Flufenazina (FF), Cloruro de Calmidazolio (CC), (1-[N,O-bis(5isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine) (KN-62), 48/80 Triclorhidrato (48/80). Se graficaron las medias ± SEM, de tres ensayos independientes cada uno, con tres repeticiones técnicas. Se realizó un Student's t test (\*\*\*\*P < 0,0001, \*P < 0,05)

### Cofactores del Complejo ATP-Me<sup>2+</sup>. Preferencia de Magnesio y Manganeso

Las quinasas pueden utilizar diversos iones metálicos divalentes para facilitar la actividad fosfotransferasa. El Mg<sup>2+</sup> es el ion metal divalente más abundante en la célula, se cree que es

el ión de coordinación para quinasas. Sin embargo otros metales, tales como el manganeso ( $Mn^{2+}$ ), son adecuados para la catálisis. Ambos,  $Mg^{2+}y$   $Mn^{2+}$ , se probaron como cofactores ( $Me^{2+}$ -ATP) en presencia de 25  $\mu$ M  $Ca^{2+}$  (Fig. C3.6).  $Mg^{2+}$  es necesario para la actividad. La quinasa muestra actividad máxima a concentraciones de  $Mg^{2+}$  de 0,1 a 10 mM (Fig. C3.6a y d).

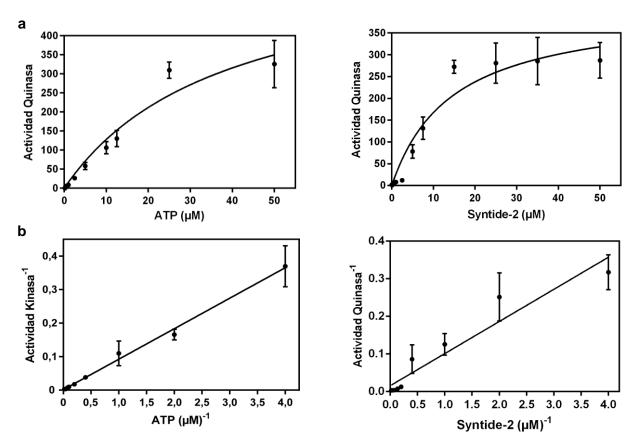


**Fig. C3.6 Requerimiento de co-factores de StCDPK7:6xHis.** Todos los ensayos se llevaron a cabo utilizando 15 μM Syn y 50 μM de ATPγ $P^{32}$  como sustratos aceptor y donor. **a** y **b** Curvas de concentración de cofactores,  $Mg^{2+}$  (panel superior),  $Mn^{2+}$  (paneles central e inferior). **c** Actividad Quinasa de StCDPK7:6xHis (μmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> Proteína) en presencia o ausencia de Ca<sup>2+</sup> bajo diferentes concentraciones de cofactores. Se graficaron las medias  $\pm$  SEM, de tres ensayos independientes cada uno, con tres repeticiones técnicas. Se realizó un ANOVA de un factor y posterior *Tukey's HSD test*. Diferentes letras (a-c) por encima de las barras indican diferencias significativas entre los ensayos (P < 0.05).

Por el contrario, la concentración óptima de  $\rm Mn^{2+}$  se restringe a 25  $\mu M$  (Fig. C3.6b). Concentraciones más altas inhiben fuertemente la actividad quinasa (Fig. C3.6c). Cuando se realizó el ensayo de quinasa en presencia de 10 mM  $\rm Mn^{2+}$  y 10 mM  $\rm Mg^{2+}$ , se reduce la actividad de StCDPK7:6xHis (Fig. C3.6d). En presencia de EGTA y 0,1 mM  $\rm Mg^{2+}$  casi no se detecta actividad alguna. Sin embargo, se observa una ligera actividad cuando se incluyó 10 mM  $\rm Mg^{2+}$  en la reacción (Fig. C3.6d, panel de la derecha).

## Determinación de los parámetros cinéticos (Vmáx y Km) de la proteína recombinante StCDPK7:6xHis

Se realizaron los ensayos de actividad quinasa, utilizando ATP, como sustrato donor, y el péptido comercial Syn, como sustrato aceptor de grupos fosfatos. A partir de las curvas de concentración (Fig. C3.7a), se puede observar que la cinética de reacción se ajusta al modelo *Michaelis-Mentem* para ambos sustratos.



**Fig. C3.7** Actividad de StCDPK7:6xHis con sustratos dadores y aceptores de grupos fosfatos. a-b Curvas de concentración de ATP y Syn, Actividad Quinasa (μmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> Proteína) con sus respectivas regresiones lineales, para obtener el Km y V<sub>máx</sub>. El análisis de los datos y los gráficos se realizaron a través del programa Graph Pad Prism v6.01, a partir de la regresión linear *Lineweaver-Burk*.

Realizando las regresiones lineales de cada curva (Fig. C3.7b), se obtienen la  $V_{m\acute{a}x}$  de reacción, calculando la inversa de la ordenada al origen, y el Km, concentración del sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la  $V_{m\acute{a}x}$ . La pendiente de la recta es igual a Km. $V_{m\acute{a}x}^{-1}$ , por lo tanto a partir de ello se obtiene el Km. En este caso se utilizó el paquete estadístico Graph Pad Prism v6.01, para obtener los parámetros que se detallan en la Tabla C3.1. Nuestros resultados indican que el Km para ATP y Syn es de 14,75 ± 2,95  $\mu$ M y 8,17 ± 1,48  $\mu$ M respectivamente. Alcanza una  $V_{m\acute{a}x}$  similar para ambos sustratos: con Syn (0,29 ± 0,02  $\mu$ mol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>),

## Comparación de los parámetros cinéticos, actividad quinasa y autofosforilación deStCDPK1, 2, 3 y 7

Se compararon los valores de Km y  $V_{m\acute{a}x}$  (Tabla C3.1) obtenidos para StCDPK7:6xHis (grupo I) con los de las isoformas ya caracterizadas en nuestro laboratorio, StCDPK1/2/3:6xHis, que pertenecen al grupo II (Grandellis et al. 2012). Se observa que StCDPK1/2/7:6xHis muestran afinidad similar por ATP, pero StCDPK7:6xHis alcanza una  $V_{m\acute{a}x}$  mayor que StCDPK1/2/3:6xHis. Por otro lado, la Km para Syn de StCDPK7:6xHis es similar a StCDPK1:6xHis, tiene menor afinidad que StCDPK2:6xHis y mayor que StCDPK3:6xHis y su  $V_{m\acute{a}x}$  es similar a la mostrada por StCDPK2:6xHis.

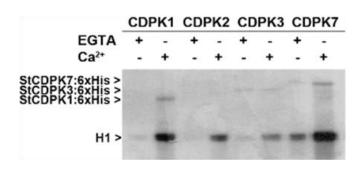
Tabla C3.1 Parámetros cinéticos de las CDPKs

Isoforma CDPK	ATP Sustrato Donor		Syntide-2 Sustratoaceptor		Actividad Máxima
ISOIOIIIIA CDFK	Km (µM)	Vmax µmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup>	Km (µM)	Vmax µmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup>	Ca <sup>2+</sup> (µM)
StCDPK1: 6xHis	19,7 ± 0,03	$0.04 \pm 0.005$	7,74±0,04	$0.05 \pm 0.01$	2,5
StCDPK2:6xHis	$18 \pm 0.03$	$0.1 \pm 0.007$	1,75±0,04	$0.4 \pm 0.05$	0,6
StCDPK3: 6xHis	3,3 ±0,02	0,033 ±0,006	31,2±0,04	0,094±0,01	25
StCDPK7:6xHis	14,76 ± 2,9	$0,325 \pm 0,024$	8,17 ± 1,48	$0,287 \pm 0,019$	25

Comparación de los Km,  $V_{m\acute{a}x}$  utilizando ATP y Syn como sustratos; y de la concentración óptima de  $Ca^{2+}$  a la cual las 4 isoformas alcanzan su actividad máxima.

StCDPK3:6xHis y 7 comparten la misma concentración óptima de  $Ca^{2+}$  (25  $\mu$ M) a la cual alcanzan la actividad máxima. En cambio, StCDPK1:6XHis y StCDPK2, presentan mayor afinidad por  $Ca^{2+}$ , 2,5 y 0,6  $\mu$ M, respectivamente.

También se comparó la actividad quinasa de StCDPK7:6xHis con la de las isoformas StCDPK1/2/3:6xHis usando H1 como sustrato en ensayo en gel. StCDPK7:6xHis presenta mayor actividad específica con H1 que StCDPK3:6xHis y StCDPK2:6xHis (Fig. C3.8). Además se observa que la autofosforilación de StCDPK7:6xHis y StCDPK1:6xHis es estrictamente dependiente de Ca<sup>2+</sup>, mientras que la autofosforilación de StCDPK3:6xHis no depende de Ca<sup>2+</sup> (Fig. C3.8) como se ha observado anteriormente (Grandellis et al. 2016). En estas condiciones, la autofosforilación de StCDPK2:6xHis no es evidente.



**Fig. C3.8 Ensayo de fosforilación en gel de las 4 isoformas de CDPKs** utilizando H1 como sustrato (21 kDa). Las reacciones se realizaron con 200 ng de proteínas, 1 mg.mL<sup>-1</sup> de H1, en presencia y ausencia de Ca<sup>2+</sup>. Se observa la autofosforilación de las quinasas, StCDPK1:6xHis (59 kDa), StCDPK3:6xHis (63 kDa) y StCDPK7:6xHis (66 kDa). Bajo estas condiciones no se detecta la autofosforilación de StCDPK2:6xHis.

### DISCUSIÓN

La expansión de la familia CDPK sugiere que las diferentes isoformas podrían realizar funciones específicas y posiblemente tengan como blancos de acción a proteínas específicas. Esto puede deberse a su patrón de expresión en tejidos, su localización subcelular, su afinidad por Ca<sup>2+</sup>, sus características bioquímicas y sus parámetros cinéticos. En Arabidopsis, las CDPKs pueden clasificarse en tres tipos: CPKs estrictamente dependientes de Ca<sup>2+</sup> que en general abarca a los miembros de los grupo I y II, CPKs estimuladas con Ca<sup>2+</sup> (con una actividad basal significativa en ausencia de Ca<sup>2+</sup>) y CPKs insensibles a Ca<sup>2+</sup> (Ronzier et al. 2014). En trabajos anteriores se demostró que la actividad de StCDPK1/2/3, pertenecientes al grupo II, era dependiente de Ca<sup>2+</sup> (Giammaria et al. 2011; Grandellis et al. 2012). En este capítulo caracterizamos a StCDPK7 recombinante y podemos concluir que la proteína StCDPK7:6xHis es una quinasa activa y que tanto la autofosforilación como la actividad quinasa es dependiente de Ca<sup>2+</sup>. StCDPK7 pertenece al grupo I y contiene cuatro sitios EFhand en su CLD por lo cual era de esperar que su actividad fuese dependiente de Ca<sup>2+</sup>. Asimismo determinamos que StCDPK7:6xHis puede utilizar ya sea, Mg<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup>, como cofactores de ATP para catalizar la reacción de fosforilación. A concentraciones micromolares, Mn<sup>2+</sup> es más eficiente y se logra la mayor actividad de la enzima; sin embargo a altas concentraciones (en el intervalo milimolar) actúa como inhibidor. Un resultado similar se observó para una CDPK de tomate que fosforila la sacarosa sintasa (Anguenot et al. 2006). StCDPK7:6xHis se inhibe con altas concentraciones de Mn<sup>2+</sup> y no recupera la actividad aun agregando altas concentraciones de Mg<sup>2+</sup>, indicando que el Mg<sup>2+</sup> no desplaza al Mn<sup>2+</sup>. La concentración intracelular de Mn<sup>2+</sup> se encuentra en el rango micromolar, mientras que la concentración de Mg<sup>2+</sup> es del rango milimolar. Por lo tanto, Mn<sup>2+</sup> podría formar el complejo ATP:Me<sup>2+</sup> y participar en la actividad quinasa de StCDPK7 en condiciones fisiológicas. Al igual que otras CDPKs, StCDPK7:6xHis tiene mayor afinidad por Syn, GS, y H1 a la hora de

fosforilar. Se determinaron los parámetros cinéticos para Syn y ATP. Los Km obtenidos fueron similares a los de StCDPK1:6xHis y las  $V_{máx}$  a las de StCDPK2:6xHis, mientras que los requerimientos de  $Ca^{2+}$  para desarrollar la máxima actividad son similares a los de StCDPK3:6xHis.

Al igual que StCDPK7:6xHis, la autofosforilación de StCDPK1:6xHis y 2 es dependiente de Ca<sup>2+</sup>; sin embargo la autofosforilación de StCDPK3:6xHis es independiente de Ca<sup>2+</sup> (Grandellis et al. 2016). En el ensayo de 2D se observan múltiples spots cuando StCDPK7:6xHis se autofosforila en presencia de Ca<sup>2+</sup> lo que sugiere que hay más de un sitio de autofosforilación. Si bien no hemos identificado los residuos de StCDPK7:6xHis que podrían sufrir autofosforilación, la comparación con sus ortólogos de tabaco y Arabidopsis reveló que comparte los residuos S-18, T-65 y S-97, y el entorno correspondiente, que demostraron ser autofosforilados en esas proteínas (Witte et al. 2010; Hegeman et al. 2006). Además se identificaron residuos fosforilados propios de cada proteína. La fosforilación puede activar señales proteolíticas latentes de PEST (Rechsteiner & Rogers 1996; García-Alai et al. 2007). En tabaco, las isoformas NtCDPK2 y 3, que son fosforiladas en respuesta al estrés biótico, poseen sitios PESTs en sus NTVs y se identificó que una de las fosforilaciones ocurre en estos sitios (Witte et al. 2010). Es posible sugerir que en StCDPK7 ocurra algo similar. Los datos de la literatura indican que hay sitios de autofosforilación conservados pero que además cada ortólogo desarrolló variantes de fosforilación diferentes que podrían permitir el ajuste fino de la actividad y la estabilidad de la proteína. Los patrones de autofosforilación dentro de la región N-terminal de StCDPK7, podrían ser importantes para regular la estabilidad de la proteína, dirigir interacciones proteicas específicas, y/o su localización celular afectando de este modo la función fisiológica.

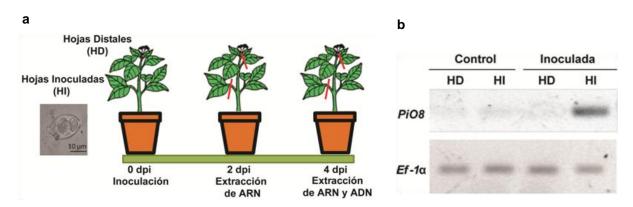
### **CAPÍTULO 4: Rol en defensa**

Muchos trabajos comprueban, analizan e intentan dilucidar la relación existente entre las CDPKs y los estreses bióticos (Romeis & Herde 2014; Asai et al. 2013; Blanco et al. 2008). Los sensores de Ca<sup>2+</sup> tienen una función dual en la propagación de la señal iniciada en respuesta a patógenos y herbívoros. Participan, tanto en la rápida propagación de la señal célula a célula, como en su translocación desde sitios locales de infección hasta distales que resulta en la activación de la SAR (Romeis & Herde 2014). Es necesario ubicar las isoformas CDPKs en vías reguladoras e identificar blancos específicos, para dilucidar su modo de acción.

Datos mencionados en capítulos previos sugieren que StCDPK7 podría participar en la respuesta defensiva de la planta. De acuerdo a datos de *RNASeq*, la expresión de *StCDPK7* se induce ante la infección por *P. infestans* (capítulo 1) y su secuencia aminoacídica presenta alta homología con NtCDPK2 y AtCPK1 (capítulo 2), ambas involucradas en respuesta a estrés biótico (Romeis et al. 2001; Coca & San Segundo 2010). En este capítulo, quisimos estudiar el papel de StCDPK7 en la interacción papa - *P. infestans*.

## Regulación de la expresión del gen StCDPK7 frente a la infección de P. infestans

Se inocularon plantas de papa en maceta, de 4 semanas de edad, con el patógeno hemibiotrófico *P. infestans*. Los ensayos de inoculación se realizaron según el esquema de la Fig. C4.1a. Las hojas inferiores fueron inoculadas (HI) con 10 μL de suspensión de zoosporangios (50 zs.μL<sup>-1</sup>), según Huang et al. (2005). Se cosecharon las HI y hojas distales (HD) a los 2 y 4 días post infección (dpi), y se extrajo ARN total. Para confirmar la presencia de *P. infestans* en las infecciones localizadas se realizaron PCRs diagnósticas (Judelson & Tooley 2000) (Fig. C4.1b), a partir de ADN genómico extraído de las HI 4 dpi; los oligonucleótidos utilizados y las reacciones se realizaron según Llorente et al. (2010).



**Fig. C4.1 Ensayos de infección en plantas var. Desiree. a** Esquema de inoculación. **b** PCR diagnóstica, demuestra la presencia de *P. infestans* en las hojas inoculadas.

Se realizaron ensayos de RT-qPCR (Fig. C4.2) amplificando los genes StCDPK1 y 7, StPR-1b que codifica unaa proteína relacionada con patogénesis y con la vía del SA, y StPAL1 (van Loon & van Strien 1999). StPR-1b y StPAL1 son genes marcadores de procesos defensivos, inducidos en respuesta a infecciones de patógenos biotróficos (Arseneault et al. 2014). Las proteínas PR-1b y PAL1 forman parte de la SAR mediada por SA (Liu et al. 2016). Los datos se normalizaron al gen  $EF-1\alpha$  (Nicot et al. 2005) y a las plantas control inoculadas con agua (Livak & Schmittgen 2001).

Como se observa en la Fig. C4.2, los niveles transcripcionales de *StCDPK7* en las HI a 2 dpi no difieren de las plantas control. Sin embargo, la expresión de *StCDPK7* aumenta 3,5 veces en las HD a 2 dpi y este aumento persiste hasta los 4 dpi. Por el contrario, la expresión de *StCDPK1* no mostró diferencias significativas con el control en ninguna de las tres situaciones (HI y HD a 2dpi o HD a 4 dpi, Fig. C4.2) correlacionado con los datos de *RNAseq* disponibles en PGSC (Fig. C1.4b). Por otro lado la expresión de *StPR-1b* se induce fuertemente (casi 10 veces) en las HD a los 2dpi.

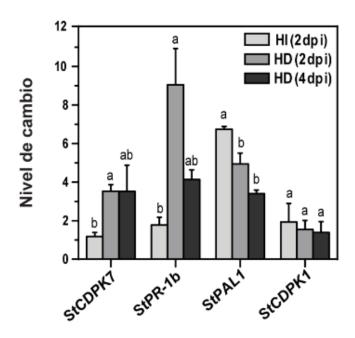


Fig. C4.2 Ensayos de RT-qPCR de hojas de plantas de papa infectadas con el patógeno *P. infestans* a 2 y 4 dpi. Se analizó la expresión de los genes StCDPK7/1, StPR-1b y StPAL1. Los datos fueron analizados usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen 2001). Se graficaron las Medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas por condición. El análisis estadístico se realizó por ANOVA de dos factores y posterior Tukey's HSD test. Diferentes letras (a-b) por encima de las barras indican diferencias significativas en los niveles de transcripción entre las condiciones (P < 0,05)

Es conocida la acumulación de transcriptos *PALs* alrededor de los sitios de infección (Fritzemeier et al. 1987). Una búsqueda en el genoma de papa nos permitió identificar nueve genes que posiblemente codifiquen proteínas PALs. Mientras que tres genes codifican secuencias truncas, los otros seis (*StPAL1-6*) codifican proteínas con los cuatro

dominios PAL característicos y conservan el sitio catalítico en el dominio MIO (Ritter & Schulz 2004). De acuerdo al genoma de *S. phureja*, los genes *StPAL1-6* se distribuyen en 3 cromosomas. *StPAL1* y 2 se encuentran separados sólo por 17,5 kb (en orientación opuesta) en el cromosoma 9; *StPAL3* y 4 se localizan en el cromosoma 10 (a 45,6 Mb de distancia uno del otro), mientras que *StPAL5* y 6 están a 15,3 Mb de distancia en el cromosoma 5. A nivel aminoacídico, StPAL1 a 5 comparten 79-97% de identidad. Se diseñaron oligonucleótidos que amplifican exclusivamente *StPAL1* (Tabla M&M2). A 2 dpi, la expresión de *StPAL1* aumentó 6,9 veces en HI, donde se produce la infección local, y 5 veces en HD, mostrando la activación de la respuesta de defensa. Mientras que, a 4 dpi, la expresión de *StPAL1* en HD fue 3,5 veces mayor que en los controles (Fig. C4.2).

## Evaluación de la capacidad de StCDPK7 de fosforilar sustratos de CDPKs identificados en otras especies

Se ha sugerido 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 se encuentra altamente conservada como para poder conferir especificidad por sus sustratos. Alineamientos de secuencias de las StCDPKs en estudio, con CDPKs de otras especies, han revelado altos porcentajes de identidad en las regiones N-terminales por lo que posiblemente fosforilen sustratos similares y cumplan funciones semejantes. Por esto, se decidió ensayar la capacidad de StCDPK7:6xHis de fosforilar *in vitro* sustratos de CDPKs caracterizados en otras especies. Esta estrategia fue empleada con éxito para identificar al FT StRSG como sustrato de StCDPK3 (Grandellis et al. 2016).

En trabajos previos realizados en protoplastos de maíz, se reportó que AtCPK1 es capaz de fosforilar a una proteína PAL en situaciones de estrés (Cheng et al. 2001; Allwood et al. 2002). Se decidió utilizar como sustrato de StCDPK7:6xHis a las proteínas PAL de tabaco, NtPAL1-4, (Reichert et al. 2009). Estas presentan alta identidad de secuencia con las PAL de papa (84-91%). Las PAL de tabaco se dividen en 2 subgrupos, el subgrupo I está compuesto por PAL1 y 4, y el II, por PAL2 y 3 (Reichert et al. 2009). El alineamiento de las regiones Nterminales de las NtPALs (Fig. C4.3), muestra que los sitios de fosforilación (S y T) predichos por el programa *PhosphoNet* se conservan intra grupos.

NtPAL1	MASNGHVNGGENFELCKKSADPLNWEMAAE <mark>S</mark> LRG <b>S</b> HLDEVKKMV <mark>S</mark> EFRKPMVKLGGES
NtPAL4	MASNGHVNGGENFELCKKS <mark>S</mark> ATDPLNWEMAAE <mark>S</mark> LRG <b>S</b> HLDEVKKMV <mark>S</mark> EFRKPMVKLGGET
NtPAL2	-MAGVAQNGHQEMDFCMKVDPLNWEMAAD <mark>S</mark> LKG <b>S</b> HLDEVKKMVAEFRKPVVKLGGET
NtPAL3	-MAGVAQNGHQEMDFCVKVDPLNWEMAAD <mark>S</mark> LKG <b>S</b> HLDEVKKMVAEFRKPVVKLGGET
	· ** · · · · · * * · ** · · ** · · · ·
NtPAL1	LTVAQVAAIAVRDK <b>s</b> angvkvel <b>s</b> eearagvkas <b>s</b> dwvmdsmnkgtd <b>s</b> ygvt <b>i</b> gfgat <b>s</b> h
NtPAL4	LTVAQVAAIAVRDK <mark>s</mark> angvkvel <mark>s</mark> eearagvkas <b>s</b> dwvmdsmnkgtd <b>s</b> ygvt <b>t</b> gfgat <b>s</b> h
NtPAL4 NtPAL2	
	LTVAQVAAIAVRDK <mark>s</mark> angvkvel <mark>s</mark> eearagvkas <mark>s</mark> dwvmdsmnkgtdsygvt <b>i</b> gfgatsh

**Fig. C4.3 Alineamiento de las regiones N-Terminal de NtPALs 1-4.** En negro se encuentran los residuos fosforilables de Serina (S) y Treonina (T), según el programa *PhosphoNet*.

Además, se determinó la capacidad de StCDPK7:6xHis de fosforilar proteínas involucradas en respuesta a estímulos abióticos, tales como la proteína de *shock* térmico de Arabidopsis (AtHSP1) y el fragmento C-terminal de la H<sup>+</sup>-ATPasa. En la Tabla C4.1 se indican las proteínas recombinantes usadas en los ensayos de fosforilación. Los plásmidos de expresión fueron provistos por diferentes grupos de investigación.

Tabla C4.1 Proteínas recombinantes solicitadas a diferentes grupos de investigación.

Sustrato	Etiqueta	CDPK	Función	Especie	Referencia
AtHSP1	GST	AtCPK10	Proteína de <i>shock</i> térmico	A. thaliana	(Zou et al. 2010)
NpPMA2 C-term	GST	OsCDPK	H <sup>+</sup> -ATPasa	N. plumbaginifolia	(Jelich-Ottmann et al. 2001)
NtPAL1-4	6xHis	AtCPK1	Fenilalanina-amonio liasa	N. tabacum	(Reichert et al. 2009)

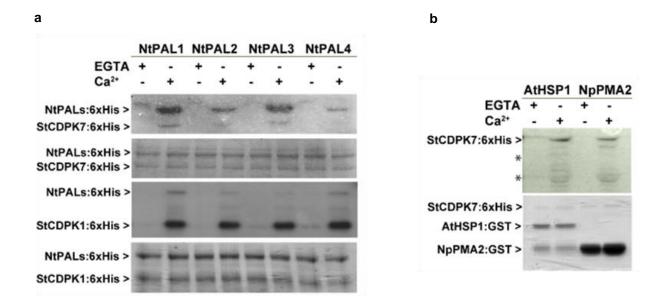
Se indica el sustrato, la etiqueta, la función y la especie a la que pertenece. La cita corresponde al grupo que caracterizó cada proteína recombinante. Se menciona la isoforma de CDPK para la que se demostró la fosforilación.

AtCPK10, perteneciente al grupo III, fosforila a AtHSP1 que desempeña un rol importante en la regulación de los movimientos estomáticos mediados por ABA y Ca<sup>2+</sup>. AtHSP1 se encuentra localizada en citoplasma y núcleo, sin embargo, ensayos de complementación de fluorescencia bimolar (BiFC) muestran que la interacción entre AtCPK10 y AtHSP1 se produce en la MP sugiriendo que AtCPK10 puede reclutar a AtHSP1 a la MP y formar un complejo (Zou et al. 2010). En ensayos de doble híbrido se demostró la interacción de HSP1 con otra isoforma del grupo III, AtCPK32, y en menor grado con AtCPK1/11 y 4 del grupo I; sin embargo las isoformas AtCPK23 y 24 del grupo II no interaccionaron.

Las H<sup>+</sup>-ATPasas son responsables de la formación de gradiente electroquímico de H<sup>+</sup> a través de la MP que proporciona la fuerza motriz para la absorción de nutrientes y el mantenimiento de la turgencia celular (Morsomme & Boutry 2000). Se sabe que el C-

Terminal de la enzima actúa como autoinhibidor. El clivado o el truncamiento del dominio C-terminal dan lugar a un aumento en la actividad de H<sup>+-</sup>ATPasa (Palmgren et al. 1991; Regenberg et al. 1995). En arroz, una CDPK de 55-kDa, no caracterizada en la familia, fosforila el dominio C-terminal de la H+-ATPase PMA2 (Ookura et al. 2005) que es muy similar a la PMA2 de *N. plumbaginifolia* (Jelich-Ottmann et al. 2001).

Se expresaron las proteínas recombinantes AtHSP1, PMA2 y NtPALs; aquellas 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 ACs anti-GST o anti-polihistidina (dato no mostrado). El ensayo de fosforilación se hizo en presencia de 25  $\mu$ M Ca²+ o 1 mM EGTA usando 4  $\mu$ g de cada sustrato purificado y 125 ng de enzima; las muestras se analizaron por SDS-PAGE 10% y posterior revelado por autorradiografía (Fig. C4.4).



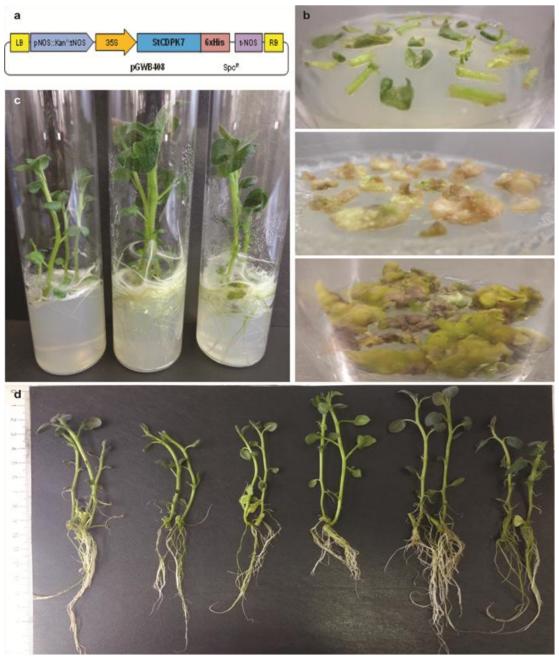
**Fig. C4.4 Evaluación de la capacidad de StCDPK7 de fosforilar sustratos de CDPKs a** Ensayo de fosforilación *in vitro* de NtPAL 1-4 (77 kDa) en presencia y ausencia de Ca<sup>2+</sup>, usando StCDPK7:6xHis (66 kDa, panel superior) o StCPK1:6xHis (60 kDa, panel inferior) como fuente de enzima. Se muestra en cada caso la tinción del gel con Coomasie Brilliant Blue. **b** Ensayo de fosforilación *in vitro* de AtHSP1 (40 kDa) y el dominio C-terminal de la NpPMA2 (25 kDa) en presencia y ausencia de Ca<sup>2+</sup> usando StCDPK7:6xHis como enzima. (\*) Ausencia de fosforilación de AtHSP1 y NpPMA2. Panel inferior, SDS-PAGE teñido con Coomassie Brilliant Blue.

Como puede observarse en el panel superior de la Fig. C4.4a, StCDPK7:6xHis puede fosforilar las 4 NtPALs (77 kDa). StCDPK7:6xHis presentó mayor afinidad por NtPAL1:6xHis y 3 (Fig. C4.4a, panel superior). Se observa que tanto la actividad enzimática, como la autofosforilación de StCDPK7:6xHis son dependientes de Ca<sup>2+</sup> como fue observado en el capítulo 3 de esta Tesis. Cuando el mismo ensayo se realizó usando la enzima

StCDPK1:6xHis, (panel intermedio) se observó que ésta sólo fosforila muy débilmente las NtPALs (imagen tomada de la Tesis doctoral de F. Santin, 2015) sugiriendo que diferentes CDPKs tienen como blanco de fosforilación diferentes proteínas. De hecho, AtCPK1, y no otras CDPKs estrechamente relacionadas, es capaz de fosforilar una proteína PAL recombinante (Cheng et al. 2001). Por otro lado, StCDPK7:6xHis fue incapaz de fosforilar a AtHSP1:GST (40 KDa), a NpPMA2:GST, 25 kDa (Fig. C4.4b) o a StPIN4:6xHis (Santin et al. 2016). Por lo tanto la quinasa es capaz de fosforilar diferencialmente proteínas con alta similitud, e interactúa con proteínas que están involucradas en la respuesta a estrés biótico y no con aquellas vinculadas al estrés abiótico.

#### Líneas sobreexpresantes de StCDPK7

Para comprender la función de StCDPK7 en la vía de señalización desencadenada en respuesta al estrés biótico, nos propusimos obtener plantas transgénicas de papa que sobreexpresen esta isoforma. Hojas y entrenudos de plantas de papa var. Desiree fueron transformadas con la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404, portando el vector binario pGWB408 conteniendo la CDS de StCDPK7 fusionada a 6xHis, bajo el promotor 35S (Fig. C4.6 a y b).



**Fig. C4.6 Plantas transgénicas** *35S::StCDPK7:6xHis.* **a** Esquema de clonado. **a** Explantos (panel superior), callos (panel del medio) y callos verdes desarrollados (panel inferior). **c** – **d** Plantas cultivadas *in vitro* en MS 2% de 20 días. **d** Se muestran en el siguiente orden: var. Desiree (wt), líneas A, B, C, D y E.

Se obtuvieron 5 líneas independientes (Fig. C4.6 c y d), se extrajo el ADN genómico de las mismas y se confirmó la presencia del transgén por ensayos de PCR utilizando oligonucleótidos que amplifiquen el gen *NPTII*, y los oligonucleótidos 35S-F y tNOS-R, que amplifican la secuencia *StCDPK7:6xHis* completa. (Fig. C4.7). Como se observa en la Fig. C4.6d, *a priori* las líneas generadas no presentaron diferencias fenotípicas con las notransformadas.

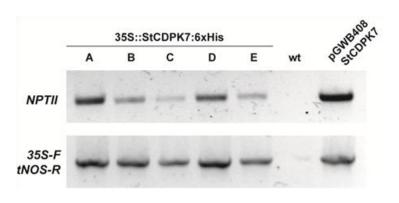
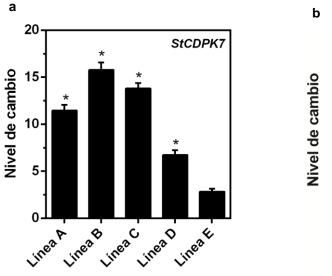
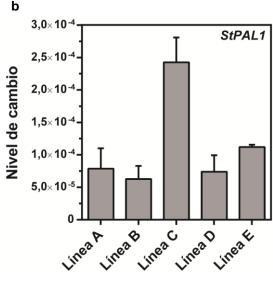


Fig. C4.7 Chequeo de las plantas transgénicas por PCR. Se usó ADN genómico de cada línea transgénica, de plantas sin transformar (wt, control negativo) ADN plasmídico pGWB408 conteniendo el transgén (control positivo). Se usaron oligonucleótidos específicos que amplifican el gen NPTII (panel superior) y oligonucleótidos que hibridan con la secuencia

#### Análisis de expresión de las plantas 35S::StCDPK7:6xHis

Para confirmar los niveles de transcripto se realizaron ensayos de RT-qPCR a partir de RNA total de plantas *in vitro* de las 5 líneas transgénicas y de la var. Desiree (wt). Los datos se normalizaron con respecto a la expresión del gen de referencia *EF-1* $\alpha$  (Nicot et al. 2005). Se calcularon los niveles de cambio de *StCDPK7* y *StPAL1* en las líneas transgénicas, respecto de los niveles de los transcriptos en las plantas wt, de acuerdo al método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen 2001). Las líneas A, B, C y D presentaron un aumento de 7 a 16 veces en la expresión del transcripto en comparación con las plantas wt mientras que en la línea E sólo se observó un leve aumento (Fig. C4.8a). Interesantemente, la expresión de *StPAL1* en las líneas transgénicas se ve regulada negativamente (nivel de cambio < 1), en comparación con plantas wt (Fig. C4.8b). Según los datos de *RNASeq* de la base de datos del PGSC, la expresión de *StPAL1* (PGSC0003DMT400055489) es ubicua en todos los tejidos de la planta (FPKM > 50), salvo en estambres (FPKM~2) y aumenta en condiciones de estrés. La sobreexpresión de *StCDPK7* podría actuar como un regulador negativo de la expresión de *StPAL1*.





C4.8 Fig. Ensayos de RT-qPCR de plantas in vitro de las líneas 35S::StCDPK7:6xHis (A-E). Se analizó la

expresión de los genes *StCDPK7* (a) y *StPAL1* (b). Los datos se compararon con los niveles de transcripto de plantas var. Desiree, utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen 2001). Se graficaron las Medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas por línea. *Student's t test* fue aplicado, comparando los niveles con el wt (\*P < 0,05). Se utilizó *EF-1* $\alpha$  (Nicot et al. 2005) como gen de referencia.

Por último, a partir de extractos de proteínas totales de plantas *in vitro*, se intentó confirmar la producción de la proteína StCDPK7:6xHis. Se realizó un western blot revelado con el AC anti-His, pero en ninguna línea se pudo detectar la banda de 66 kDa correspondiente a la proteína transgénica (Fig. C4.9, el \* indica el PM esperado de StCDPK7:6xHis). En cambio se observó una banda de 37 kDa intensa en las líneas C y D, y muy tenue en las otras líneas que no se encuentra presente en las plantas wt. No se puede descartar que la banda de 37 kDa corresponda a un producto de degradación de la proteína transgénica.

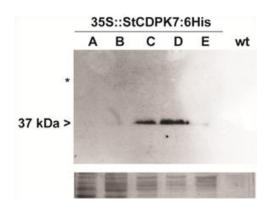


Fig. C4.9 Western blot de extractos de proteínas totales de plantas cultivadas *in vitro* Panel superior: revelado con el AC anti-His (1:7.000); (\*) indica la posición de la banda esperada (66 kDa). Panel inferior, membrana de nitrocelulosa teñida con Rojo Ponceau.

# Evaluación de resistencia/tolerancia de líneas 35S::StCDPK7:6xHis a la infección con *P. infestans* (ensayos preliminares)

Aunque no fue posible evidenciar la proteína transgénica en las plantas 35S::StCDPK7:6xHis crecidas en condiciones estándar de cultivo in vitro, se decidió realizar un primer paneo para evaluar la tolerancia o susceptibilidad a la infección por *P. infestans*. Las plantas transgénicas crecidas in vitro, fueron inoculadas según Huang et al. (2005). Se cosecharon las plantas enteras a los 2 dpi, para realizar ensayos de RT-qPCR. Las muestras se procesaron, como en la primera sección de este capítulo. Se analizaron los valores de expresión de las plantas 35S::StCDPK7:6xHis y wt inoculadas, comparándolos con los valores de los controles no inoculados. Los datos se normalizaron al gen de referencia EF-1α (Nicot et al. 2005). Los genes StCDPK7, StPAL1 y StPR-1b se indujeron ante la infección por *P. infestans*, tanto en las plantas transgénicas como en las wt. Durante la infección, no hubo diferencias significativas, entre las líneas y las wt (Fig. C4.10).

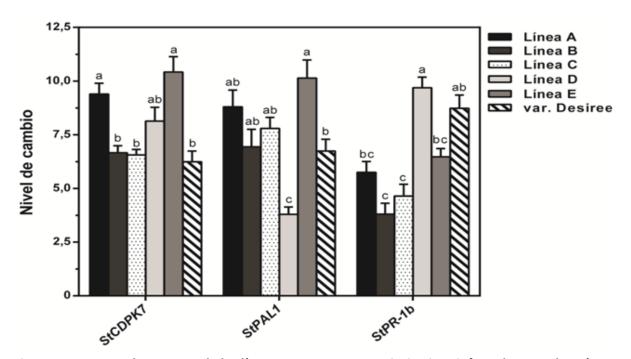


Fig. C4.10 Ensayos de RT-qPCR de las líneas 35S::StCDPK7:6xHis, in vitro, infectadas con el patógeno P. infestans, 2 dpi. Se midió la expresión de los genes StCDPK7, StPAL1 y StPR-1b. Los datos fueron analizados usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen 2001). Se graficaron las Medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas por tratamiento. El análisis estadístico se realizó por ANOVA de dos factores y posterior Tukey's HSD test. Diferentes letras (a-c) por encima de las barras indican diferencias significativas en los niveles de transcripción entre las líneas (P < 0,05)

A los 5 dpi se evidenció el crecimiento y esporulación del oomycete en todas las líneas (Fig. C4.11). Bajo estas condiciones de infección, no se observaron diferencias en el desarrollo del patógeno entre las líneas y las plantas wt. Por los datos obtenidos hasta el momento, la sobreexpresión de StCDPK7 no conferiría mayor resistencia, tolerancia o susceptibilidad a *P. infestans*. Sin embargo, la sobreexpresión de StCDPK7 reguló negativamente los niveles de transcripción de *StPAL1* (Fig. C4.8b). En trigo, los genotipos resistentes al hongo *Tilletia indica* presentan niveles significativamente mayores de ARNm de *PAL*, que aquellos que son susceptibles (Purwar et al. 2013). La sobreexpresión de *StCDPK7* podría causar susceptibilidad a *P. infestans*, a través de la reducción de los ARNm de *PAL*.

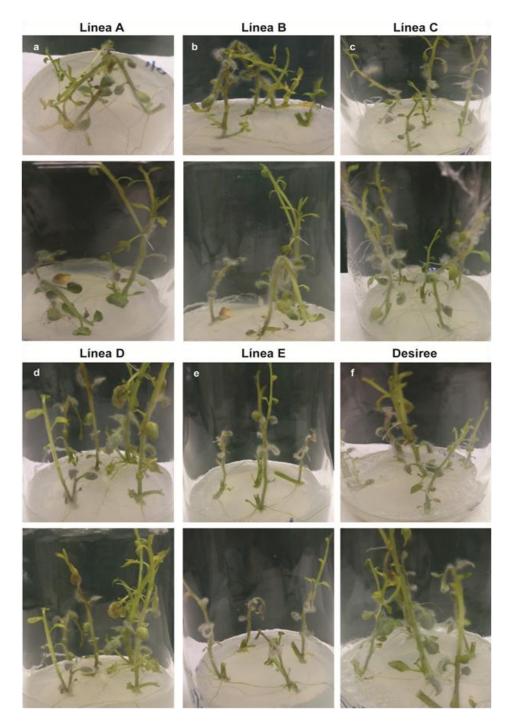


Fig. C4.11 Cultivos in vitro de líneas transgénicas 35S::StCDPK7:6xHis y var. Desiree inoculadas con *P. infestans* a los 5 dpi. a - e Líneas A-E. f Plantas var. Desiree.

# **DISCUSIÓN**

Los datos obtenidos en este capítulo indican que la expresión de *StCDPK7* se induce en HD ante la infección por *P. infestans* y que esta PK es capaz de fosforilar a las PAL de tabaco en forma dependiente de Ca<sup>2+</sup>. Las PALs son reguladores positivos de la señalización de defensa dependiente de SA (Chen et al. 2009). Tras la infección por *P. infestans*, la expresión *StPAL1* se indujo en HI (~ 7 veces) y HD (~ 5 veces) a 2 dpi, y disminuyó lentamente a 4 dpi. Esta

inducción concuerda con el aumento de actividad PAL observado en cultivos de células de papa tratados con elicitores de una raza incompatible de P. infestans (Blanco et al. 2008). PAL es una enzima soluble, sin anclaje a membrana, ni dominios de membrana. Sin embargo, estudios de fraccionamiento bioquímico y expresión transitoria demostraron que NtPAL1 se encuentra tanto en el citosol como asociada con membranas de RE, mientras que NtPAL2 muestra localización citosólica (Achnine et al. 2004). Por lo tanto, estas proteínas podrían ser blanco de StCDPK7 ya que compartirían una misma localización citosólica. Se ha reportado que la fosforilación de proteínas y el Ca<sup>2+</sup> son necesarios para la actividad PAL ya que el pretratamiento con inhibidores de quinasa y antagonistas del Ca<sup>2+</sup> eliminó el aumento de actividad PAL observado (Blanco et al. 2008). En cultivos celulares de Petroselinum hortense, la actividad PAL se regula en función de una velocidad variable de síntesis y una velocidad de degradación aproximadamente constante de la enzima (Hahlbrock et al. 1981). En células de arvejas expuestas a estrés biótico, se sugirió que la fosforilación de PAL, mediada por una CDPK, podría modular el recambio (turnover) de la proteína, o dirigir la enzima a las membranas ya que varios de los componentes río abajo de la vía fenilpropanoide se localizan en el RE (Cheng et al. 2001). Nuestros resultados indican que StCDPK7:6xHis fosforila a StPAL1:6xHis in vitro, ambas proteínas comparten una localización citosólica y ambos genes están regulados por la infección por P. infestans. Es tentador especular que la fosforilación de StPAL1, mediada por StCDPK7, podría modular la actividad o la localización de PAL. En el futuro es necesario determinar la interacción in vivo de StCDPK7 y PAL.

Se demostró que otras CDPKs de papa participan en la respuesta de la planta a la infección por *P. infestans,* posiblemente regulando a distintas proteínas según su localización subcelular. StCDPK5, localizada en la MP fosforila específicamente a StRBOH, regulando así la producción de ROS (Kobayashi et al. 2007). El intercambio del NTV de StCDPK5 por el de SICDPK2 de tomate, dirige a la proteína quimérica, NTV<sup>SICDPK2</sup>:StCDPK5 a la red trans-Golgi donde SICDPK2 normalmente reside. Esta construcción elimina la interacción *in vivo* y la activación de StRBOHB (Asai et al. 2013). Por otro lado, ensayos de fosforilación *in vivo*, realizados en células de papa tratadas con componentes de pared celular derivados de *P. infestans,* demostraron que una CDPK de 57 kDa fosforila el co-activador transcripcional StMBF1 (Zanetti et al. 2003) y que una CDPK de 50 kDa podría modular la actividad de PAL y de peroxidasas (Blanco et al. 2008). Es posible que las diferentes CDPKs participen en la respuesta defensiva decodificando diferentes señales de Ca<sup>2+</sup>, resta saber si las CDPK interactúan entre sí para impulsar la propagación de la señal de defensa que conduce a la resistencia de las plantas.

En la papa, la sobreexpresión de StCDPK5 confiriere resistencia a la infección por el hemibiotrófico *P. infestans*, pero aumentó la susceptibilidad a *Alternaria solani*, un patógeno necrotrófico (Kobayashi et al. 2012). La sobreexpresión de AtCPK1 en Arabidopsis aumentó la resistencia contra patógenos (Coca & San Segundo 2010) y el ensayo de VIGS en *N. benthamiana* muestra que NtCDPK2 juega un papel esencial en la respuesta defensiva de las

plantas (Romeis et al. 2001). En condiciones estándares, las líneas transgénicas 35S::StCDPK7:6xHis presentan hasta 15 veces más de transcripto. Nuestros datos indican que la sobreexpresión de StCDPK7, causa una reducción en los niveles de transcripto StPAL1 sugiriendo que StCDPK7 podría regular FTs involucrados en la expresión de PAL. Se debe comprobar si los niveles de la proteína o la actividad PAL se encuentran afectados. Se ha reportado que cultivares o genotipos susceptibles a ciertos patógenos producen menores niveles de transcriptos de PAL que aquellos resistentes o que poseen mayor grado de tolerancia (Purwar et al. 2013; Liu et al. 2016). Plantas transgénicas de tabaco cuya expresión de PAL está suprimida, anula la SAR tanto en HI como en HD y esta inhibición se asocia con una menor acumulación de SA (Howles et al. 1996). Si la sobreexpresión de StCDPK7 se traduce en una reducción de la actividad PAL, es probable que las líneas transgénicas sean más susceptibles a la infección. Sin embargo, cuando las líneas transgénicas fueron desafiadas con P. infestans, la sobreexpresión de StCDPK7 no impidió la inducción de StPAL1. P. infestans sigue siendo una amenaza importante para la papa, y el control del tizón tardío se basa en el uso abusivo de fungicidas, que aumentan los costos de producción y tienen un impacto negativo en el medio ambiente. StCDPK7, así como sus ortólogos en otras especies de plantas, podría ser un actor relevante en la interacción planta-patógeno. Nuestros datos con las líneas 35S::StCDPK7:6xHis aún son preliminares y deben completarse (ver perspectivas futuras) para determinar si la manipulación de StCDPK7 es una herramienta biotecnológica adecuada para incrementar la resistencia a patógenos en cultivos de papa.

# CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

- ✓ La familia CDPK de papa está compuesta al menos por 26 miembros, divididos en los cuatro grupos previamente definidos en otras especies de plantas. Además se identificaron 3 proteínas relacionadas con las CDPKs (CRKs) y una CDPK-like. El análisis filogenético, la estructura génica y el patrón de *splicing* sugieren que estas enzimas tuvieron un origen evolutivo común.
- ✓ El análisis de datos de *RNAseq* disponibles en la base de datos del PGSC, indicó que la expresión de algunas CDPKs se induce frente a estreses bióticos. La presencia de elementos reguladores en *cis* asociados a respuestas defensivas en sus promotores correlacionó con los datos de inducción. Se decidió estudiar en profundidad a StCDPK7 perteneciente al grupo I.
- ✓ StCDPK7 codifica un monomero de 66 kDa con 4 sitios de unión al Ca<sup>2+</sup>. Programas *in silico* determinaron que presenta un péptido de tránsito a cloroplasto y dos motivos PEST en su NTV. El análisis de homología de secuencias indicó que sus ortólogos más cercanos en tabaco y Arabidopsis, son NtCDPK2/3 y AtCPK1, que desempeñan un papel importante en las respuestas de defensa desencadenadas por elicitores fúngicos (Romeis et al. 2001; Coca & San Segundo 2010).
- ✓ Ensayos de RT-qPCR sugieren que la expresión de *StCDPK7* es ubicua y es significativamente mayor en raíces, tubérculos y estolones tuberizantes. Su secuencia promotora contiene elementos reguladores asociados a raíces y proteínas de reserva. Se generaron plantas *promStCDPK7::GUS*, la tinción histoquímica reveló una expresión restringida al sitio de inicio y *tips* de raíces laterales y a raíces adventicias del tallo.
- ✓ La expresión transitoria de StCDPK7<sup>1-157aa</sup>:GFP o StCDPK7:YFP en *N. benthamiana*, indica que tiene una localización citosólica, aunque programas *in silico* predijeron la presencia de un péptido señal de translocación a cloroplasto en su NTV.
- ✓ La obtención de la proteína recombinante StCDPK7:6xHis permitió la caracterización de sus constantes cinéticas, sus requerimientos de Ca²+, Mg²+ y Mn²+. Se demostró que StCDPK7:6xHis es una PK activa, dependiente de Ca²+ y capaz de autofosforilarse en múltiples residuos. StCDPK7 recombinante es capaz de fosforilar *in vitro* a las enzimas NtPALs de manera específica.
- ✓ La expresión de *StCDPK7* se induce en hojas distales ante la infección del patógeno *P. infestans*.

- ✓ Se generaron plantas *35S::StCDPK7:6xHis*. Se confirmó la presencia del transgén y el aumento del transcripto, pero no se logró detectar la proteína transgénica del tamaño esperado.
- ✓ La expresión de *StPAL1* está reducida en las plantas *35S::StCDPK7:6xHis* en condiciones estándar de cultivo.

Parte de los resultados de esta tesis conforman el manuscrito "Characterization of StCDPK7, a member of the potato calcium-dependent protein kinase family that is induced upon infection with *Phytophthora infestans*" por Fantino et al., que fue enviado para su publicación a Plant Cell Reports en enero último.

Quedan aún varios interrogantes sin responder: ¿Qué ocurre con la localización subcelular de StCDPK7 en condiciones de estrés? ¿StCDPK7 y StPAL1 interaccionan *in vivo*? ¿StCDPK7 brinda o no tolerancia a *P. infestans*?

Las líneas GUS fueron obtenidas recientemente y debe completarse el análisis de las mismas. Puede utilizarse esta herramienta para determinar si la expresión de *StCDPK7* se induce frente a la infección. Nuestros datos con las líneas *35S::StCDPK7:6xHis* aún son preliminares y para poder completar este análisis se debe confirmar si la proteína StCDPK7:6xHis se expresa en las líneas transgénicas. Además se deben repetir los ensayos en estas líneas cultivadas en tierra para poder medir severidad. Proponemos realizar otros ensayos adicionales tales como cuantificación de ROS y determinación de la actividad de las enzimas involucradas en la producción de ROS; Peroxidasa, Superoxido Dismutasa, Glutation Reductasa, Ascorbato Peroxidasa y Catalasa, así como ensayos de actividad PAL.

Los resultados presentados en esta Tesis abren varias perspectivas sobre las posibles funciones asociadas a StCDPK7. El oomycete *P. infestans*, causante del tizón tardío de la papa, ocasiona cuantiosos daños al cultivo en condiciones de alta humedad y bajas temperaturas. Por el momento la única solución para controlarlo es el uso de agroquímicos. Una variante es la generación de plantas resistentes. La caracterización de las plantas sobreexpresantes y los ensayos de infección con *P. infestans*, en estas plantas y en controles sin transformar, permitirán determinar si la manipulación biotecnológica de StCDPK7 puede conferir resistencia al oomycete.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

# Cepas bacterianas Escherichia coli

#### Condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa de *E. coli* DH10B o DH5 $\alpha$  para los clonados. Para la producción de proteínas recombinantes se emplearon las cepas BL21 Shuffle y BL21 Rosetta 2. Los cultivos líquidos se crecieron a 37°C en medio LB (peptona de triptona 10 g.L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 5 g.L<sup>-1</sup>, y NaCl 5 g.L<sup>-1</sup>) 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 suplementa con antibióticos de acuerdo a la resistencia otorgada por cada plásmido y en las siguientes concentraciones: ampicilina 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, kanamicina 50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>.

# 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  $DO_{600nm}$ = 0,4. El cultivo se incubó a 4°C durante 5 min y se centrifugó a 1900 x g durante 5 min 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 min a 4°C y el precipitado se resuspendió en 4 mL de solución TFB II fría. Se incubó en hielo durante 15 min, se separaron alícuotas de 50  $\mu$ L en tubos *eppendorf* 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	CaCl₂ 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 µL 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 h con agitación. Se sembraron placas de LB sólido con el antibiótico correspondiente.

# Agrobacterium tumefaciens Condiciones de cultivo

Se utilizaron las cepas GV3101 y LBA4404.

Сера	Resistencia Plásmido Ti	Resistencia cromosómica
GV3101	Gentamicina (50 μg.mL <sup>-1</sup> )	Rifampicina (50 μg.mL <sup>-1</sup> )
LBA4404	Estreptomicina (100 μg.mL <sup>-1</sup> )	Rifampicina (50 μg.mL <sup>-1</sup> )

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

# Transformación de células competentes de A. tumefaciens por electroporación

#### Preparación de células electro-competentes de A. 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 repitió este paso 3 veces. Se generaron alícuotas de 50  $\mu$ L de Glicerol 10% 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  $\mu$ L 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 (tamaños de vidrio 1- 2mm). Se ajustó el *Gene Pulser* a 2.5 KV y el CAP a 25  $\mu$ FD. 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 h. Se sembró en medio selectivo (conteniendo Kanamicina y Rifampicina) y se incubó a 28°C durante 48 h.

## Material vegetal

Se utilizaron plantas de papa *S. tuberosum* L var Spunta (libres de virus, Diagnósticos Vegetales, Mar del Plata), *S. tuberosum* L var. Desiree y plantas de S. phureja (papa yema de huevo, INTA, Balcarce). Durante el transcurso de esta tesis se obtuvieron plantas de papa *S. tuberosum* L var. Desiree que sobreexpresan la isoforma StCDPK7 etiquetada con 6 histidinas en el C-terminal de la proteína y plantas que expresan el gen reportero *uidA* que codifica la enzima B-glucuronidasa (*GUS*) río abajo de la secuencia promotora StCDPK7.

Se utilizaron plantas de *Nicotiana benthamiana* cultivadas en tierra durante 3-4 semanas para los ensayos de agroinfiltración y biobalística.

#### **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 días largos (DL) 16 h luz - 8 h oscuridad.

#### Medio de multiplicación

Sales MS (Murashige y Skooq, 1962), sacarosa 2% p/v, pH 5,7 (+/-  $7 \text{ g.L}^{-1}$  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 DL y temperatura entre 20-25°C. Las plantas propagadas en invernadero se procesaron cuando tenían entre 3 y 4 semanas 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.

# Cultivo de P. infestans

Los aislamientos de P. infestans, raza R2R3R6R7R9, mating type A2 (Andreu et al. 2006) y Pi-60 se crecieron en el medio RSA a 19  $\pm$  1°C, en oscuridad. Se repicaron cada 15 días. El inóculo se indujo como fue descripto en Llorente et al. (2010): a cultivos de 15 días, se adiciona 4 mL de agua Milliq autoclavada y se incuba por 1 h a 4°C en oscuridad. Pasado ese tiempo se observó en microscopio y cuantificó la suspensión de esporangios. Para las plantas de tierra, se ajustó la concentración a 50 esporangios. $\mu L^{-1}$ , para los ensayos de plantas in vitro, 25 esporangios. $\mu L^{-1}$  (Huang et al. 2005).

Aislamientos: R2R3R6R7R9, mating type A2 fue gentilmente cedido por la Dr. Adriana Andreu (Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Nacional de Mar del Plata). El aislamiento Pi-60 fue gentilmente cedido por la Lic. Natalia Norero (Laboratorio de Agrobiotecnología, INTA EEA Balcarce).

*Medio RSA* (*rye sucrose agar*): 60 g de grano de centeno germinado  $L^{-1}$ , sacarosa 2% p/v (+/- 15 g  $L^{-1}$  agar).

# Ensayos de infección

En plantas var Desiree crecidas en tierra, de 4 semanas de edad, se utilizó el aislamiento R2R3R6R7R9. Se inocularon la tercera y cuarta hojas (contando desde la base) en la cara abaxial con gotas equidistantes de 10  $\mu$ L de suspensión de esporangios. Las plantas control se inocularon con 10  $\mu$ L de agua. Las plantas se cubrieron con bolsas de polietileno transparentes por un día. Se mantuvieron en cuarto de cultivo a 20°C con fotoperiodo de DL. Las hojas inoculadas (HI) y distales (HD) (5<sup>ta</sup> y 6<sup>ta</sup>) se cosecharon a los 2 y 4 días post infección (2 dpi y 4 dpi). Se almacenaron en nitrógeno líquido. Se realizaron tres ensayos independientes y tres plantas por condición (inoculada-2dpi, control-2dpi, inoculada-4dpi y

control-4dpi).

Los ensayos de plantas *in vitro* se realizaron con el aislamiento Pi-60. Se utilizaron plantas *35S::StCDPK7:6xHis* y var Desiree, de 2 semanas de edad, cultivadas en medio MS 2%, 5 plantas por frasco. Se inocularon las hojas con 10 µL de suspensión de esporangios. Las plantas control se inocularon con 10 µL de agua Se mantuvieron en cuarto de cultivo a 20°C con fotoperiodo DL. Se cosecharon a los 2 dpi y se almacenaron en nitrógeno líquido. A los 5 dpi se manifestó el crecimiento del patógeno y se tomaron fotografías. Se realizaron tres ensayos independientes y tres frascos por condición para cada línea y var Desiree (inoculada-2dpi, control-2dpi, inoculada-5dpi y control-5dpi).

# Metodología del ADN recombinante

#### Clonados realizados en esta tesis

Secuencia codificante de StCDPK7 en el plásmido pZERrO

Secuencia codificante de *StCDPK7* en el plásmido pENTR2B y posterior recombinación con los vectores pGWB408 y pH35GY.

Secuencia *EYFP* en el plásmido pH35GY por recombinación con el vector pENTR/D-TOPO-EYFP, cedido por el Dr. Wengier.

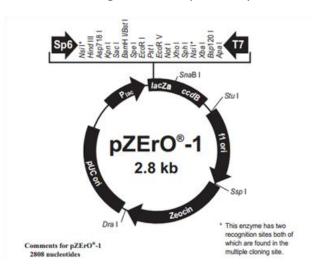
Promotor de StCDPK7 en el plásmido pZErO y posteriormente en pBI101.

Secuencia codificante de StCDPK7 en el plásmido pET-22b(+)

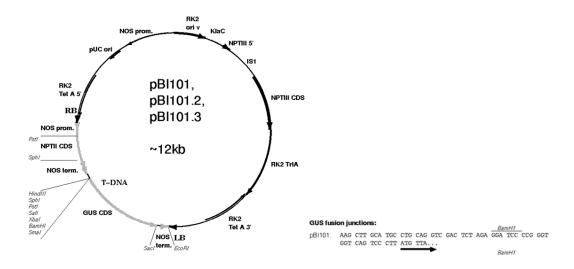
Secuencia codificante de StCDPK7 y StCDPK7 (1-540 pb) en el plásmido pCAMBIA1302.

#### **Plásmidos**

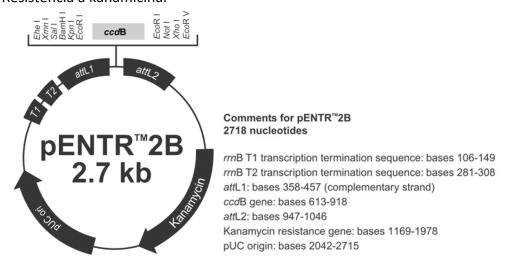
**pZErO-1** (Thermo Fisher): vector de clonado para productos de PCR amplificados con *Phusion.* Resistencia a kanamicina. Fue gentilmente provisto por la Dra. Segretin.



**pBI101** (Clontech Laboratories): vector binario que posee origen de replicación *E. coli* y *A. tumefaciens* con resistencia a kanamicina, tanto en bacteria como en planta. Contienen el marco de lectura para el gen uidA que codifica para la enzima  $\beta$ -Glucuronidasa; permite generar fusiones al gen reportero *GUS*.

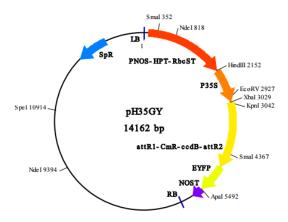


**pENTR 2B** (Thermo Fisher): vector de "Entrada", perteneciente al sistema Gateway. Resistencia a kanamicina.

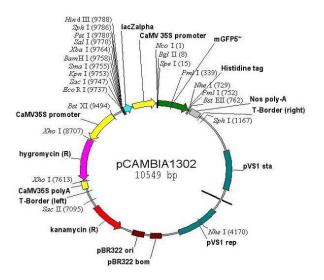


**pGWB408** (Tsuyoshi Nakagawa): vector binario que posee origen de replicación *E. coli y A. tumefaciens* con resistencia a espectinomicina y kanamicina, en planta. Este plásmido permite clonar la secuencia de interés bajo el promotor 35S quedando la secuencia codificante en fusión con 6xHis, en el C-terminal. Fue gentilmente provisto por el Dr. Nakagawa de Shimane University, Japón (Nakagawa et al. 2009).

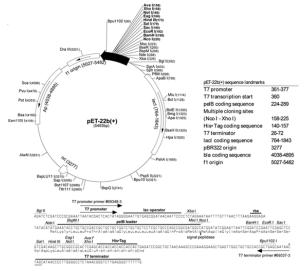
**pG35HY** (Funakoshi): vector binario que posee origen de replicación *E. coli y A. tumefaciens* con resistencia a espectinomicina e higromicina, en planta. Este plásmido permite clonar la secuencia de interés bajo el promotor 35S quedando la secuencia codificante en fusión con EYFP, en el C-terminal. Fue gentilmente provisto por el Dr. Diego Wengier.



**pCAMBIA1302** (Axybio): vector binario que posee origen de replicación *E. coli y A. tumefaciens* con resistencia a kanamicina e higromicina, en planta. Este plásmido permite clonar la secuencia de interés bajo el promotor 35S quedando la secuencia codificante en fusión con mGFP5 y una etiqueta de 6xHis, en el C-terminal.



**pET -22b(+)** (Novagen): Vector de expresión en *E. coli*. Permite clonar la secuencia de interés bajo el promotor T7 quedando la secuencia codificante en fusión con 6xHis, en el C-terminal. Resistencia a ampicilina.



# Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Tabla MyM1 Oligonucleótidos utilizados para las PCR semicuantitativas

Gen/Secuencia	Nombres	Primers (5'-3')
Calcium dependent protein kingse C	C+CDDVC	St6-F: CACTGCTTCCACCACTAATG
Calcium-dependent protein kinase 6	StCDPK6	St6-R: GCACTACCTACCCTCTTCA
Calcium dependent protein kingse 7	StCDPK7	St7-F: ATGGAATCTTTCAATCAATG
Calcium-dependent protein kinase 7	SICDPR/	St7-R: CACAGAATCAGTCCTAAGTC
Calcium-dependent protein kinase 8	StCDPK8	St8-F: CCAAAGGGTATAGAACATTC
Carciam-dependent protein kindse 8	SICDPRO	St8-R: CTAAGCATTCTCTTGACATG
Calcium-dependent protein kinase 9	StCDPK9	St9-F:TTGAGTCTTCAGACCATAGG
Carciam-dependent protein kindse 9	SICDFRS	St9-R:GTGTAGCGATTGACTTGCAC
Calcium-dependent protein kinase 10	StCDPK10	St10-F: CCAACCTAATGATGATGATC
calciani-dependent protein kindse 10	Stedi Kio	St10-R: CTAACATCTTCCATTGGTCT
Calcium-dependent protein kinase 11	StCDPK11	St11-F: GGCTAACAATGGGTTCTTAC
calciani-dependent protein kindse 11	Stedi KII	St11-R: GACGTTCTCCTAACATGAGT
Calcium-dependent protein kinase 12	StCDPK12	St12-F: CCCTGAATATCATCCAATTC
calciani-dependent protein kindse 12	Stedi K12	St12-R: CCAATTCTTTATCAAGATCA
Calcium-dependent protein kinase 13	StCDPK13	St13-F: ACAAGGAGAATCACATGCAG
calciani-dependent protein kindse 15	Stedi Kis	St13-R: CCTCTTCCTAGTTCTTTACC
Calcium-dependent protein kinase 14	StCDPK14	St14-F: AGGCTCTGATTCTAATAATG
calciant dependent protein kindse 14	Stedi Ki4	St14-R: CGTCCTAAAACAGTATCAAC
Calcium-dependent protein kinase 15	StCDPK15	St15-F: GGGTTCTTGCAATCAGTAAC
calciant dependent protein kindse 15	Stedi Kis	St15-R: GCTCGATACTCGCTTAACAT
Calcium-dependent protein kinase 16	StCDPK16	St16-F: GATGGATTCTTTAGCTCGTC
carerain dependent protein kindse 10	Stebi Kio	St16-R: GTGATCATTTCTTCCTGTTT
Calcium-dependent protein kinase 17	StCDPK17	St17-F: GGAGAGGGAATCTAGAGAGG
Carefalli dependent protein kindse 17		St17-R: CAATATTTTGCCTAGAGTGT
Calcium-dependent protein kinase 18	StCDPK18	St18-F: AACTTGAGACACCATATTCC
		St18-R: CCTAGTTTCTTCCCAAGAGT
Calcium-dependent protein kinase 19	StCDPK19	St19-F: ACATGGCACAAGTTGTAGC
		St19-R:GCATATTGTAGCCCTGTTAC
Calcium-dependent protein kinase 20	StCDPK20	St20-F: ATGTCTGTACAAAATGCAAG
		St20-R: CTAACTCCTTCCCAAACTCA
Calcium-dependent protein kinase 21	StCDPK21	St21-F: GCCATGTCCTCTACCTCCAC
		St21-R: GATATCCACAGCTGTTCGGA
Calcium-dependent protein kinase 22	StCDPK22	St22-F: TCTTGAGACCCTTTTAGCTG
		St22-R: CCTAACTCATACGTTGCCTC
Calcium-dependent protein kinase 23	StCDPK23	St23-F: GCTGTGTGAAACCGGGTAAA
	<del></del>	St23-R: CCGAGCTCACGACCCAAATC
Calcium-dependent protein kinase 24	StCDPK24	St24-F: ATTGTTATGGGAAATTGCTG
, ,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,		St24-R: CTCCTCTTCCTAGCTCACAA
Calcium-dependent protein kinase 26	StCDPK26	St26-F:ATCAAAATGGGCAATATATG
		St26-R:CTTCCCAATTGTAAACTTCT

Gen/ Sequencia	Nombre	Nro de acceso ª/ Referencia	Oligonucleotidos (5'-3')	Vector
Pathogenesis related protein 1b	StPR -1b	AY050221	StPR1b -F: GCCCAAAATTCACCCCAAGAC StPR1b -R: CTGCACCGGAATGAATCAAGT	
Phenylalanine ammonia -lyase 1	StPAL1	KC631948.1	StPAL -F: GGTGTTACTACTGGATTTGGTGC StPAL -R: CCTAACAAGCATAGCTGCCC	
Elongation factor 1 alpha	StEF -1a	AB061263.1	StEF -1a-F: ATTGGAAACGGATATGCTCCA StEF -1a-R: TCCTTACCTGAACGCCTGTCA	
Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase	StGAPDH	NM_001288415.1	StGAPDH - F: GAAGGACTGGAGGTGGA StGAPDH -R: GACACAGAACATCAGCAGT	
Calcium -dependent protein kinase 7	StCDPK7	KJ830932.1	StCDPK7 -F: GTCGCCGGATGATAGTGCT StCDPK7 -R: GGCTTTTTGGGCTTTTTCGG	
Calcium -dependent protein kinase 1	StCDPK1	NM_001288393.1	StCDPK1 -F: CCTCAAGTGGGAGTGATGG StCDPK1 -R: CCTCAAATGCCTTACCCAAA	
Calcium -dependent protein kinase 7 promoter	pStCDPK7		St7PromSall -F: GAG GTCGAC TGGCCTTGTGGGTAGACAATAAGTCG St7PromBamHl -R: CTC GGATCC TTTGTTCCTCTATTAACCCCCCTAAATCC	pZEro -1 pBl101
Calcium -dependent protein kinase 7	StCDPK7	KJ830932.1	St7Ndel -F: GGC <b>CATATG</b> GGGAACACTTGTGTAGGACCAAG St7Xhol -R: GCC <b>CTCGAG</b> TAGTTTTAGTGCTTCTCTGAATOCAATGCTG	pZEro -1 pET -22b(+)
Calcium -dependent protein kinase 7			St7Ncol -F: ACA CCATGG GGAACACTTGTGTAGGACCAAG St7Bglil - R: TTT AGATCT ATAACATGAGGATGTCCTGCCAAGTGG	pCAMBIA13 02
Calcium -dependent protein kinase 7			St7BamHI -F: AGG <b>GGATCC</b> GATGGGGAACACTTGTGTAGGACC St7XhoI - R: GCC <b>CTCGAG</b> TGTAGTTTTAGTGCTTCTCTGAATCCAATGC	pENTR 2B pGWB408 pH35GY
Neomycin phosphotransferase	NPTII		NPTII -F: GAACAAGATGGATTGCACGC NPTII -R: GAAGAACTCGTCAAGAAGGC	pBl101 pGWB408
35S promoter	355		35S-F: ATCTCCACTGACGTAAGGGA	pGWB408
Terminator sequence	t-NOS		I-NOS: IGAI AAI CAI CGCAAGACCG	StCDPK7
B-glucuronidase	GUS		GUS-R: GGTTGGGGTTTCTACAGG	pstCDPK7
Calcium -dependent protein kinases	R5/R4		R5-F: GATTTTGGGCTGTCCGTGTTCATT R4-R: GAGCATCCTTGG	
Ubiquitin	Ubi		Ubi - F: ATGGACATCTTTGTGAGAC Ubi - R: ACCACCACGGAGACGGAG	
P. infestans (ITS) of ribosomal DNA	Pi08	(Judelson & Tooley 2000)	PiO8 -3-3F: CAATTCGCCACCTTCTTCGA PiO8 -3-3R: GCCTTCCTGCCCTCAAGAAC	
lane.				

Base de datos del NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/). En negrita se indican los sitios de las enzimas de restricción.

# 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 h con agitación a 37°C. Se centrifugaron 4 mL del cultivo y el precipitado se resuspendió en 200  $\mu$ L de solución 1 (Tris-HCl 50mM pH 8, EDTA 10 mM). Se agregaron 300  $\mu$ L de solución 2 (NaOH 200 mM, SDS 1 %), se mezcló por inversión y se incubó a 4° durante 5 min. Se agregaron 300  $\mu$ L de solución 3 (acetato de potasio 3 M, pH 5,5), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. 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  $\mu$ l 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  $\mu$ L de etanol 70%, se secó y se resuspendió en 20  $\mu$ L 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 hs a 37°C. El resultado de estas reacciones fue visualizado en electroforesis en geles de agarosa (1-2%) conteniendo 0,5 µg.mL<sup>-1</sup> 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 10-20 µL. Se utilizaron 3 U de la enzima ligasa en todos los casos y el tiempo de incubación varió de 1 h a 25°C o 16 h a 4°C.

#### Cuantificación del ADN y ARN

Se obtuvieron las concentraciones utilizando el equipo Nanodrop. Se corroboraron las relaciones de Absorbancia 260/280 y 260/230. La primera (1,8-2) permite evaluar la contaminación por proteínas. La segunda (1,8-2,2), la contaminación con compuestos fenólicos.

## Metodología del ARN

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

Plantas de *S. tuberosum* L var. Desiree, fueron propagadas en macetas o *in vitro*. Se cosecharon muestras de hojas, pecíolos, tallo, raíces, yemas axilares, estolones y minitubérculos o planta entera, de 4 y 3 semanas de edad. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C. Se extrajo el ARN utilizando el reactivo de TRIzol (Invitrogen) agregando 1 mL cada 50 mg de tejido de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ARN se cuantificó por Nanodrop.

#### Determinación de la calidad del ARN

Se resolvieron alícuotas de 200 ng del ARN adicionado con 3  $\mu$ l de buffer de siembra en geles de agarosa 1,5%, buffer TAE 1X adicionados con 10  $\mu$ l de formamida. La presencia de bandas ribosomales definidas indicaron la integridad del ARN.

#### **Tratamiento con DNAsa**

Se partió de 1  $\mu$ g de ARN purificado y se agregó 1  $\mu$ L de *buffer Dnasa* (Promega), 1  $\mu$ L de la enzima *Dnasa RQ1 ARNse free* (Promega), y se llevó a volumen final 10  $\mu$ L. Se incubó la reacción a 37°C durante 30 min. Se adicionó 1  $\mu$ L de la solución *Stop Dnase* (Promega), y se incubó nuevamente a 65°C durante 10 min.

#### Síntesis de ADNc

Al tratamiento con *DNAsa* (10  $\mu$ L de reacción) se agregó una mezcla de deoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 500  $\mu$ M de cada uno) y 0,5  $\mu$ g de oligodT. Se incubó la reacción a 65°C durante 5 min, luego se enfrió en hielo por 1 min. Se agregó *First Strand Buffer* 1X

(Promega), 0,1M DTT, 40 unidades de *RNAseOUT* y 200 U de la enzima M-MLV-Transcriptasa Reversa (Promega). El volumen final de reacción fue de 20 μL. Se incubó la reacción a 42°C durante 60 min, seguido de 15 min a 70°C para inactivar la transcriptasa reversa. Todos los pasos de incubación se realizaron en un ciclador MiniCyclerTM MJ Research. Se almacenó a -20°C hasta su uso.

#### **PCRs** cuantitativas

Las reacciones de qPCR del Cap. 2 se realizaron en el ciclador *Mastercycler Eppendorf Realplex* utilizando la mezcla *KAPA SYBR Green Master Mixture* (Kapa Biosystems). Para la expresión de *StCDPK7*, se utilizaron los oligonucleótidos CDPK7-FP y CDPK7-RP (Tabla MyM2) y las reacciones se llevaron a cabo a 95°C durante 2 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 seg; 60°C por 1 min. Como gen de referencia se utilizó *GAPDH* (Tabla MyM2), las reacciones se llevaron a cabo a 95°C durante 2 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 seg; 56°C 15 seg y 72°C por 20 seg, usando los oligonucleótidos GAPDH FP y GAPDH RP.

Para las qPCRs del Cap. 4, las reacciones se realizaron en el equipo *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*, utilizando la mix *FastStart Universal SYBR Green Master Rox* (Roche). Se utilizó como gen de referencia *EF-1* $\alpha$  (Nicot et al. 2005). Las reacciones de PCR se realizaron a 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 seg; 56°C por 15 seg y 60°C por 1 min. A los genes *StCDPK7*, *StPAL1* y *StPR-1b*, se les realizaron las curvas estándares para evaluar las Eficiencias y optimizar las condiciones de reacción. La especificidad de las reacciones de PCR se verificó a través del análisis de las curvas de *melting*. Los datos se analizaron mediante el método de  $2^{-(Ct gene of interest -Ct GAPDH)}$ , para los ensayos de tejido y líneas 35S::StCDPK7:6xHis (Figs. C2.4 y C4.8) (Yang et al. 2013). Los datos del Cap. 4 se analizaron utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen 2001). Se graficaron las Medias  $\pm$  SEM, posterior análisis de ANOVA de un factor y se aplicó el test HSD de Tuckey.

## Metodología 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 min a 10000 x g. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se mantuvo a 4°C hasta la electroforesis.

#### Cuantificación de proteínas totales

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

# Expresión y purificación de proteínas recombinantes

# Purificación de proteínas recombinantes de fusión a GST en los plásmidos pGEX-4t-AtHSP1 y pGEX-4t-NpPMA2

A partir de un cultivo bacteriano *starter* de 3 mL se inoculó un cultivo de 500 mL de LB - ampicilina y se incubó a 30° hasta una DO de 0.4. Se indujo con 1mM de IPTG y se incubó 4 h. Posteriormente se centrifugó durante 15 min a 4000 x g. Se resuspendió el *pellet* en 5 mL de PBS 1X frío y se sonicó en hielo 6 veces durante 15 seg cada vez. Luego se agregó 0.01% concentración final de Tritón, y se incubó con agitación durante 30 min para favorecer la solubilización. Se centrifugó durante 15 min a 10000 rpm a 4°C y el sobrenadante se incubó durante 1 h con 500 μl de resina Glutathione Sepharose® 4B Reduced glutathione (GSH 4B 50%, *GE HealthCare*). Se realizaron 4 lavados con 2 mL de PBS 1X cada vez, centrifugando 5 min a 500 x g a 4°C. Posteriormente se eluyó 4 veces, utilizando 100 μL de *buffer* de elución e incubando el *buffer* con la resina 30 min a 4°C cada vez. Las fracciones fueron dializadas con el *Buffer* de enzimas durante 4 hs. Este último paso es fundamental para obtener la enzima activa. Los eluidos fueron cuantificados mediante el método de Bradford utilizando una curva patrón de BSA y visualizados a través de SDS-PAGE y teñidos con Coomassie Brilliant Blue. Se almacenaron a -20°C.

Buffer fosfato (PBS1X): 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na $_2$ HPO $_4$ , pH 7.3 Buffer de elución: 10 mM GSH, 50 mM Tris-HCl pH 8 (10X) Buffer de enzimas: 20 mM Tris HCl, pH 7,5, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA , 1 mM DTT y 50% glicerol

**Purificación de proteínas recombinantes de fusión a His** en los plásmidos pET22 b(+)-StCDPK1/2/3/7 y pET-15b-NtPAL1/2/3/4

A partir de un cultivo bacteriano *starter* de 5 mL se inoculó un cultivo de 1000 mL de LB-ampicilina y se incubó a 30°C hasta una DO de 0.5. Se realizó el protocolo de purificación en condiciones nativas. Se indujo con 1mM de IPTG y se incubó 4 h. Posteriormente se centrifugó durante 15 min a 4000 x g. El *pellet* se resuspendió en 4 mL de buffer de lisis. Se agregó 1 mg.mL<sup>-1</sup> de lisozima y se incubó 30 min a 4°C. Se sonicó 6 veces durante 10 seg cada vez. Se centrifugó el sobrenadante durante 10 min a 10000 rpm a 4°C. Se puso en contacto el sobrenadante obtenido con 1 mL de resina de Ni agarosa (QIAGEN) en agitación durante 1 h a 4°C. Luego de recoger el percolado 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 por 4 h contra buffer 20 mM Tris-HCl pH 7,5, y posteriormente con el *Buffer* de enzimas durante 4 h más. Los eluidos fueron cuantificados mediante el método de Bradford utilizando una curva patrón de BSA y visualizados a través de SDS-PAGE y teñidos con Coomassie Brilliant Blue. Se almacenaron a -20°C.

Buffer de lisis: 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8. Buffer de lavado: 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8. Buffer de Elución: 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8, inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail*-Sigma CNP9599) 10 μL.mL<sup>-1</sup> de *buffer* de elución, 5% glicerol.

### Ensayo de western blot

Extractos proteicos (0,3-100 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, 10% metanol durante 1 h a 4 mA/cm². 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 10 min cada uno. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 h. El revelado fue utilizando placas sensibles de Amersham *Hyperfilm ECL* (GE Healthcare) o a partir del equipo GeneGnome-XRQ-NM (Syngene). El sustrato utilizado es de la marca Bio-lumina (Productos Biológicos-UNQ).

## Anticuerpos utilizados:

- -Anti-Goat (1:4000) igGH- HRP cat sc-2056 0.5% BSA
- -Anti-GST (1:1000) 5 mg.mL<sup>-1</sup> 27-4577-01 0.5% BSA
- -Anti-His- anticuerpo monoclonal comercial (QIAGEN) 0.5% BSA (1:7000)
- -Anti rabbit anti Fc-IgGs-HRP (Invitrogen) 0.5% BSA
- -Anti-GFP (1:2000) 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> Ana Spec Inc Fremont cat. 29779 0.5% BSA

TBS 10X: 0,25M Tris-HCl pH 8, 9% p/v NaCl.

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

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

# **Ensayos de actividad CDPK**

Se realizaron ensayos de actividad quinasa utilizando ATP  $[\gamma^{32}P]$  para evaluar actividad quinasa de StCDPK7:6xHis, concentración óptima de Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> o Mg<sup>2+</sup>, fosforilación de diferentes sustratos, efecto de inhibidores de la actividad quinasa y autofosforilación.

Las determinaciones de actividad guinasa se realizaron de acuerdo a Macintosh y col. (1996). El volumen final de reacción fue de 60 µL y se usaron 200 ng de enzima. La mezcla de reacción se compuso de 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM β-mercaptoetanol (BME), 50 μM ATP frío y ATP [y<sup>32</sup>P] (1x 10<sup>6</sup> cpm/ensayo; 3000 Ci/mmol, New England Biolabs). Los ensayos se realizaron en presencia de  $CaCl_2$  (25 o 100  $\mu M$  final) o EGTA (1 o 5mM). Se hicieron curvas de Ca<sup>2+</sup>, EGTA, Mn<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> y se evaluó la capacidad de Clorpromazina, Trifluoperazina y Flufenazina (0,1 y 1 mM), de EGTA (5mM) y BAPTA (0,2 y 2 mM), de (1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine) (5 y 10 μM), derivados del ácido naftaleno - sulfónico W7 (50 y 500 μM), Cloruro de Calmidazolio (0,5 y 10 μM) y de Triclorhidrato 48/80 (1 y 10 mg.mL<sup>-1</sup>) de inhibir la actividad de StCDPK7:6xHis. Asimismo se determinó la capacidad de fosforilar distintos péptidos (15 μΜ) y proteínas (1 mg.mL<sup>-1</sup>): Syntide-2 (Syn); Péptido 3 derivado de PP2A (Pep3); (GS) derivado de glucógeno sintasa; Sustrato de la Proteína Kinasa Dependiente de Calmodulina (CDPKS); kemptide (Kempt); Sustrato de la Casein Kinasa II (CKIIS); Proteína Básica de Mielina (MBP), H1, Histona 2a (H2a) e Histona 3 (H3). En todos los casos las reacciones se incubaron 30 min a 30 °C. Se detuvieron con la extracción de 40 µl de mezcla de reacción que se colocaron

sobre cuadraditos ( $2\text{cm}^2$ ) de papel de fosfocelulosa Whatman P81 cargado positivamente, lo cual favorece el pegado de péptidos con grupos fosfatos. Los papeles fueron inmersos en  $H_3PO_4$  75 mM y fueron lavados (x3) durante 10 min. El último lavado se realiza con acetona durante 1 min. 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 tres blancos con  $Ca^{2+}$  y con EGTA, sin fuente enzimática. Se graficaron las Medias  $\pm$  SEM, los datos mostrados son de tres ensayos con tres réplicas técnicas cada uno.

# Ensayos de Autofosforilación y de Fosforilación de Sustratos en geles

Se utilizaron 125-200 ng de StCDPK1/2/3 o 7:6xHis en ensayos de fosforilación de sustratos y 1-5 µg en ensayos de autofosforilación según se indica en las figuras.

Se utilizó como aceptor de fosfatos a la proteína H1 (1 mg.mL $^{-1}$ ) o a las proteínas recombinantes NtPAL1-4:6xHis, AtHSP1:GST y NpPMA2:GST. El volumen final de reacción fue 40 µL y la mezcla se compuso de 25 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl $_2$ , 25 µM CaCl $_2$  o 1 mM EGTA, 0,1% Tritón X-100, 10 mM BME, 4 µg de cada sustrato recombinante y 5 µM ATP suplementado con [ATP $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP (5000 Ci/mmol, 10 a 20 Ci por reacción). Se incubó a 30°C durante 5 min. Luego los tubos se colocaron en hielo y se agregó buffer de siembra 5X, se incubó a 100°C durante 5 min y se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) con geles de 10 o 12%. Se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se expusieron en placas autorradiográficas (*Amersham Hyperfilm*, *GE Healthcare*) durante una noche a temperatura ambiente.

#### **Electroforesis Geles 2D**

#### Ensayos de autofosforilación usando ATP frio

StCDPK7:6xHis (50  $\mu$ g) se incubó 1 h a 30°C con una mezcla de reacción conteniendo 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 25  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, 10 mM ATP, 10 mM BME. El volumen final de reacción fue de 100  $\mu$ 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 h se centrifugó durante 30 min a 10000 x g. El pellet fue lavado dos veces con 500 μL 100% acetona, 0,07% BME y luego se centrifugó 5 min a 10000 x g. Se secó brevemente el pellet en estufa a 37°C y se resuspendió en 106,8 μL de buffer IEF (Buffer de isoelectroenfoque). Se adicionaron 0,66 μL IPG Buffer pH 4-7 (GE Healthcare), 10 μL BpB (Azul de bromofenol saturado), 0,06 M DTT. Se resuspendió la muestra con la ayuda de un vortex y se incubó 30 min a 37°C. Luego se centrifugó 15 min a 10000 x g y se procedió a la hidratación pasiva del strip (reswelling). Para esto se adicionaron los 125 μL 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 Srip Cover Fluid (GE Healthcare). Se incubó durante 16-20 h a 30°C. Se realizó el isoelectroenfoque utilizando el equipo Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing (GE). El programa utilizado para el isoelectroenfoque consistió en 3 ciclos: 500 V 30 min, 1000 V 30 min, 5000

V, 1 h 40 min. Una vez concluido el programa se realizó un cuarto ciclo a 5000 V hasta completar un total de 8700 V. Luego, los *strips* se incubaron en buffer de equilibrio suplementado con 10 mg.mL<sup>-1</sup> de DTT durante 15 min, en agitación, seguido de otra incubación en buffer de equilibrio suplementado con 45 mg.mL<sup>-1</sup> de iodoacetamida durante 15 min 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 μL de BpB 0,5% SDS. Las condiciones de la corrida fueron: 15 mA por gel durante 15 min, luego se aumentó a 30 mA por gel. Posteriormente se realizó una tinción con ProQ (Invitrogen). El ProQ (Invitrogen) es una tinción específica de fosfoproteínas, consiste en un fluoróforo que posee un máximo de excitación/emisión de 555/580 nm. La detección de la señal se realizó en un Typhoon™ 9400 Variable Mode Imager (GE Healthcare)

Buffer de isoelectroenfoque (IEF): 0,84 g urea, 0,3 g tiourea, 0,4 mL CHAPS 2%, en volumen final 2 mL.

Buffer de equilibrio: 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M Urea, 30% glicerol, 2% SDS, 4-8 μl BpB Buffer de corrida: 0,025 M Tris, 0,19 Glicina, pH 8,3 SDS 0,15%

# Transformación mediada por Agrobacterium tumefaciens

Plantas de 3 semanas, propagadas *in vitro*, de la variedad *Solanum tuberosum* L. var Desiree fueron seleccionadas para la transformación mediada por *A. tumefaciens*. En cada placa de Petri se colocaron aproximadamente 15 entrenudos. Se inoculó con una dilución 1/100 del cultivo (DO=0,8), en medio líquido de infección (MI). Como inóculo se usó *A. tumefaciens* LBA4404, portando los vectores pBI101-promStCDPK7 o pGWB408-StCDPK7. Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con agitación y luego se traspasaron a frascos conteniendo medio sólido inductor de callos (MIC), en ausencia de cefotaxima. Los frascos sellados con *parafilm*, se mantuvieron en oscuridad a 28°C por 48 hs. Pasado ese tiempo, los explantos se lavaron con cefotaxima (1 g.L<sup>-1</sup>) y se colocaron en frascos conteniendo el MIC sólido. Se incubaron en cámara de crecimiento con un fotoperiodo de DL, y se repicaron cada dos semanas, hasta la aparición de callos verdes (30-45 días). Los callos fueron transferidos a medio inductor de brotes (MID), repicados cada dos semanas hasta el surgimiento de los brotes (40-60 días). Cuando los brotes regenerantes alcanzaban una longitud de 1-2 cm se transfirieron al medio de enraizamiento (ME). Para asegurarse de obtener líneas independientes, se escindió un brote por callo.

*Medio de Infección (MI):* MS sal y vitaminas, libre de fitohormonas, suplementado con sacarosa (20 g.L<sup>-1</sup>) y Acetosiringona (10 mg.L<sup>-1</sup>).

*Medio Inductor de Callo (MIC):* MS sal y vitaminas, 8 g.L<sup>-1</sup> agar, suplementado con 20 g.L<sup>-1</sup> de glucosa, 5 mg.L<sup>-1</sup> ácido 1-naftalenacético, Sigma: N-0640 (NAA), 0,1 mg.L<sup>-1</sup> 6-bencilaminopurina (BAP), Sigma: B-3408, 250 mg.L<sup>-1</sup> cefotaxima, 50 mg.L<sup>-1</sup> Kanamicina. *Medio Inductor de Brotes (MIB):* MS sal y vitaminas, 8 g. L<sup>-1</sup> agar, suplementado con 20 g.L<sup>-1</sup> de glucosa, 2.2 mg L<sup>-1</sup> *trans*-Zeatín Ribósido (ZR) Sigma: Z3541, 0.02 mg. L<sup>-1</sup> NAA, 0.15 mg. L<sup>-1</sup> GA3, 250 mg. L<sup>-1</sup> cefotaxima, 50 mg. L<sup>-1</sup> Kanamicina

*Medio de Enraizamiento (ME):* MS sal y vitaminas,  $8 \text{ g.L}^{-1}$  agar, suplementada con  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de glucosa,  $250 \text{ mg. L}^{-1}$  cefotaxima,  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  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<sup>-1</sup>. El compuesto se disuelve en dimetilsulfóxido (DMSO) y luego en agua. Se utilizó una concentración stock de 10 mg mL<sup>-1</sup>. 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<sup>-1</sup> de la solución *stock* se preparó en agua destilada con una concentración final de 250 mg.mL<sup>-1</sup>. La solución se esterilizó por filtración.

*Ácido 3-Indol-Acético (AIA, PhytoTechnology Laboratories):* Hormona tipo auxina. Se utilizaron 50 mg.mL<sup>-1</sup> disueltos en etanol. Se preparó una solución *stock* de 0,87mg.mL<sup>-1</sup>. 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<sup>-1</sup>. La solución stock se preparó disolviendo la hormona en etanol 100% (17,57 mg 10 mL<sup>-1</sup>). La solución se esterilizó por filtración.

Kanamicina (Sigma): antibiótico utilizado a una concentración final de 50 mg.L<sup>-1</sup>. Se disolvió en agua y se esterilizó por filtración. Se almacena a -20°C.

# Extracción de ADN genómico de plantas transgénicas

El tejido foliar (100-200 mg) proveniente de plantas *in vitro* se trituró en un tubo *eppendorf* con un vástago, se adiciona *buffer* de extracción (350  $\mu$ L) y se incuba 10 min a 65°C. Se agregan 100  $\mu$ L de solución III, se mezcla por inversión y se coloca a 4°C. Se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm a 4°C y el sobrenadante se trasvasa a un nuevo tubo. Se agregó 1 volumen de isopropanol, se centrifugó durante 15 min a 12000 rpm a 4°C. Se agregó 500  $\mu$ L de etanol 80% y se centrifugó durante 5 min. El *pellet* fue resuspendido en 35  $\mu$ L 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 (Tabla MyM2) en el caso de las líneas StCDPK7pro::GUS y CDPK7FP y pGWB408rev (Tabla MyM2) en el caso de las líneas sobreexpresantes.

# Transformación transitoria de hojas de *N. benthamiana* mediada por *A. tumefaciens*

Hojas de plantas de *N. benthamiana* de 3-4 semanas fueron infiltradas con la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 transformadas con 35S::CDPK7:YFP o 35S::YFP:YFP. Las bacterias se cultivaron toda la noche, se precipitaron y el *pellet* se resuspendió en el *Buffer* (10mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES-K: pH 5,6) ajustando la absorbancia a 0,2. Al menos seis hojas de plantas independientes fueron agroinfiltradas con cada construcción y con la cepa GV3101 (control negativo). Las plantas se mantuvieron en cuartos de cultivo a 25°C con fotoperiodo de DL.

# Ensayos de bombardeo en hojas de N. benthamiana

A 50  $\mu$ L de partículas de oro (50 mg.mL<sup>-1</sup> en glicerol 50%) se le adicionaron 8  $\mu$ L de los vectores pCAMBIA1302-StCDPK7<sup>1-540pb</sup> o pCAMBIA1302 (1  $\mu$ g. $\mu$ L<sup>-1</sup>), 50  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> 2,5 M y 20  $\mu$ L de espermidina 0,1 M. En cada paso se agitó la muestra. Se lavó con 200  $\mu$ L de etanol 100%, se centrifugó a 3.000 rpm por 1 min a 4°C, este paso se repitió 5 veces. Se resuspendió en 50  $\mu$ L de etanol 100% y se mantuvo en hielo hasta el momento de los disparos. Se bombardearon hojas de plantas de *N. benthamiana*, de 3-4 semanas, utilizando el equipo *He Biolistic Particle Delivery System, PDS-1000 Model* (Bio-Rad). Las hojas se incubaron a 25°C con fotoperiodo de DL, en placas de Petri conteniendo papel de filtro y medio MS 2%. Al menos 2 hojas de plantas independientes fueron bombardeadas con cada construcción.

# Microscopia Confocal

Después de dos días, se visualizaron las proteínas de fusión YFP o GFP expresadas en células epidérmicas. Se observaron señales de YFP en el microscopio confocal Olympus FV300/BX61 (excitación a 488 nm y emisión a 535 nm) utilizando el objetivo de 60X con aceite. Las señales GFP se visualizaron en el microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta (excitación a 488 nm, emisión a 505-530 nm) se utilizó el objetivo *plan-Apochromat* 20 X/0,8. En ambos casos, la autofluorescencia de clorofila se visualizó a 660 nm. Todas las imágenes se procesaron utilizando el programa Fiji (Schindelin et al., 2012)

# Ensayo de tinción GUS (actividad β-glucuronidasa)

El ensayo se realizó en plantas de líneas de promStCDPK7::GUS crecidas *in vitro*. La solución de revelado, de acuerdo al protocolo desarrollado por McCabe et al. (1988), consistió en 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,2, 2 mM X-GLUC (ácido 5- bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónico). Se incubó 16 hs en oscuridad a 37°C. Luego se destiñó con sucesivos lavados con etanol 70% de 1 h cada uno, hasta alcanzar la decoloración total. Las fotos se tomaron en la lupa Leica.

#### Bioinformática

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

Las bases de datos del SPUD DB del Potato Genomics Resource de la Michigan State University (http://potato.plantbiology.msu.edu/index.shtml) permitieron identificar los genes correspondientes a la familia CDPK, brindando el número de acceso del gen, transcripto o proteína (DMG, DMT o DMP) con su correspondiente localización cromosómica y datos de *RNAseq* (valores FPKM) obtenidos de diferentes tejidos o de plantas cultivadas en diferentes condiciones.

- Análisis Filogenético: MEGA 6, Molecular Evolutionar Genetic Analysis (Tamura et al. 2013), http://en.bio-soft.net/tree/MEGA.html
- Análisis de secuencias y Predicción de estructura de las proteínas se obtuvieron: PROSITE (Sigrist et al. 2013) y SMART Simple Modular Architecture Research, -Pfam (pfam.xfam.org) y PredictProtein https://www.predictprotein.org
- Comparación de secuencias: TargetAlign (http://www.leonxie.com/targetAlign) (Xie & Zhang 2010) y BLAST http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi Basic Local Alignment Search

#### Tool

- Expasy SIB Bioinformatics Resource Portal http://expasy.org/: Translate tools, Compute MW/pI tool (Gasteiger. 2005)
- Predicciones de peptido señal: TargetP 1.1 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/), ChloroP 1.1 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/), y Wolf P Sort (http://psort.hgc.jp/).
- *Predicción de Miristoilación:* NMT The MYR Predictor (Podell & Gribskov 2004), (http://mendel.imp.ac.at/myristate/cgi-bin/myr\_pred.cgi), Myristoylator (Bologna et al. 2004)
- Predicción de palmitoilación: CSS-Palm Palmitoylation Site Prediction (Ren et al. 2008)
- Predicción de sitios potenciales de clivaje (proteolíticos): epestfind EMBOSS Explorer, emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/ emboss/epestfind (Rechsteiner & Rogers 1996)
- Predicción de sitios de fosforilación: NetPhos 2.0 (Blom et al. 1999)
- *Diseño de oligonucleótidos se usó OligoCalc:* Oligonucleotide Properties Calculator: http://www.basic.northWestern.edu/biotools/oligocalc.html
- Gráficos y análisis estadístico: PRISMA GraphPad v6.01
- Búsqueda de elementos reguladores en promotores: PLACE (Higo 1998), PlantCARE (Lescot et al. 2002), FIMO (Grant et al. 2011)
- Análisis de imagenes de microscopia: Fiji software (https://fiji.sc/) (Schindelin et al. 2012)

# **BIBLIOGRAFÍA**

- Abuqamar, S. et al., 2009. Crosstalk between biotic and abiotic stress responses in tomato is mediated by the AIM1 transcription factor. *Plant Journal*, 58(2), pp.347–360.
- Achnine, L. et al., 2004. Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell*, 16(November), pp.3098–3109.
- Allen, G.J., Muir, S.R. & Sanders, D., 1995. Release of Ca2+ from individual plant vacuoles by both InsP3 and cyclic ADP-ribose. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5211), pp.735–737.
- Allwood, E.G. et al., 2002. Regulation of CDPKs, including identification of PAL kinase, in biotically stressed cells of French bean. *Plant molecular biology*, 49(5), pp.533–544.
- Anguenot, R. et al., 2006. Protein phosphorylation and membrane association of sucrose synthase in developing tomato fruit. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale*, 44(5–6), pp.294–300. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16806956.
- Arseneault, T. et al., 2014. Long-Term Induction of Defense Gene Expression in Potato by Pseudomonas sp. LBUM223 and Streptomyces scabies. *Phytopathology*, 104(9), pp.926–32. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24601985.
- Asai, S. et al., 2013. The variable domain of a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK) confers subcellular localization and substrate recognition for NADPH oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 288(20), pp.14332–14340.
- Asano, T. et al., 2005. Genome-wide identification of the rice calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase gene families: Comprehensive analysis of the CDPKs gene family in rice. *Plant and Cell Physiology*, 46(2), pp.356–366.
- Aversano, R. et al., 2015. The Solanum commersonii Genome Sequence Provides Insights into Adaptation to Stress Conditions and Genome Evolution of Wild Potato Relatives. *The Plant cell*, 27(4), pp.954–68. Available at: http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.114.135954%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.g ov/pubmed/25873387%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4 558694.
- Batistic, O. et al., 2010. CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 61(2), pp.211–222.
- Batistic, O. & Kudla, J., 2012. Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochimica et biophysica acta*, 1820(8), pp.1283–1293.
- Benetka, W. et al., 2008. Experimental testing of predicted myristoylation targets involved in asymmetric cell division and calcium-dependent signalling. *Cell Cycle*, 7(23), pp.3709–3719.
- Berendzen, K.W. et al., 2012. Screening for in planta protein-protein interactions combining bimolecular fluorescence complementation with flow cytometry. *Plant methods*, 8(1), p.25.
- Blanco, F.A., Zanetti, M.E. & Daleo, G.R., 2008. Calcium-dependent protein kinases are involved in potato signal transduction in response to elicitors from the oomycete Phytophthora infestans. *Journal of Phytopathology*, 156(1), pp.53–61.
- Blatt, M.R., Thiel, G. & Trentham, D.R., 1990. Reversible inactivation of K+ channels of Vicia stomatal guard cells following the photolysis of caged inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature*, 346(6286), pp.766–769.
- Blom, N., Gammeltoft, S. & Brunak, S., 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of molecular biology*, 294(5), pp.1351–1362. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10600390.
- Bologna, G. et al., 2004. N-terminal myristoylation predictions by ensembles of neural networks. *Proteomics*, 4(6), pp.1626–1632.
- Boudsocq, M. et al., 2012. Characterization of Arabidopsis calcium-dependent protein kinases:

- activated or not by calcium? *The Biochemical journal*, 447(2), pp.291–299. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22827269.
- Boudsocq, M. et al., 2010. Differential innate immune signalling via Ca(2+) sensor protein kinases. *Nature*, 464(7287), pp.418–422.
- Boudsocq, M. & Sheen, J., 2013. CDPKs in immune and stress signaling. *Trends in plant science*, 18(1), pp.30–40. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3534830%7B&%7Dtool=pmcentrez %7B&%7Drendertype=abstract.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248–254. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051.
- Brandt, B. et al., 2012. Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26), pp.10593–10598.
- Cai, H. et al., 2015. Genome-wide identification and expression analysis of calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase genes in Capsicum annuum. *Frontiers in plant science*, 6(September), p.737. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4584942&tool=pmcentrez&render type=abstract.
- Camoni, L., Harper, J.F. & Palmgren, M.G., 1998. 14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK). *FEBS letters*, 430(3), pp.381–384.
- Chakravarthy, S. et al., 2003. The tomato transcription factor Pti4 regulates defense-related gene expression via GCC box and non-GCC box cis elements. *The Plant cell*, 15(12), pp.3033–3050.
- Champion, A. et al., 2004. AtSGP1, AtSGP2 and MAP4K alpha are nucleolar plant proteins that can complement fission yeast mutants lacking a functional SIN pathway. *Journal of cell science*, 117(Pt 18), pp.4265–4275.
- Chehab, E.W. et al., 2004. Autophosphorylation and subcellular localization dynamics of a salt- and water deficit-induced calcium-dependent protein kinase from ice plant. *Plant physiology*, 135(3), pp.1430–1446.
- Chen, C. & Chen, Z., 2002. Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced Arabidopsis transcription factor. *Plant physiology*, 129(2), pp.706–716.
- Chen, F. et al., 2013. The evolutionary history and diverse physiological roles of the grapevine calcium-dependent protein kinase gene family. *PLoS ONE*, 8(12).
- Chen, H. et al., 2010. Roles of arabidopsis WRKY18, WRKY40 and WRKY60 transcription factors in plant responses to abscisic acid and abiotic stress. *BMC plant biology*, 10(1), p.281. Available at: http://www.biomedcentral.com/1471-2229/10/281.
- Chen, Z. et al., 2009. Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant signaling & behavior*, 4(6), pp.493–496.
- Cheng, S. et al., 2002. Update on Calcium Signaling through Protein Kinases . The Arabidopsis Calcium-Dependent Protein Kinase Gene Family 1. *Plant Physiology*, 129(June), pp.469–485.
- Cheng, S.H. et al., 2001. Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active Arabidopsis CDPK expressed in maize protoplasts. *FEBS Letters*, 503(2–3), pp.185–188.
- Chico, J.M. et al., 2002. A calcium-dependent protein kinase is systemically induced upon wounding in tomato plants. *Plant physiology*, 128(January), pp.256–270.
- Chung, H.J. et al., 2016. EF-Hand Mimicking Calcium Binding Polymer. *Biomacromolecules*, 17(3), pp.1075–1082.
- Coca, M. & San Segundo, B., 2010. AtCPK1 calcium-dependent protein kinase mediates pathogen resistance in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, pp.526–540. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20497373.
- 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, p.36. Available
- http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3355778%7B&%7Dtool=pmcentrez%7B&%7Drendertype=abstract.
- Dammann, C. et al., 2003. Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from Arabidopsis. *Plant Physiol*, 132(4), pp.1840–1848. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&listuids=12913141.
- DeFalco, T.A., Bender, K.W. & Snedden, W.A., 2010. Breaking the code: Ca2+ sensors in plant signalling. *The Biochemical journal*, 425(1), pp.27–40. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20001960.
- Dou, D. & Zhou, J.M., 2012. Phytopathogen effectors subverting host immunity: Different foes, similar battleground. *Cell Host and Microbe*, 12(4), pp.484–495. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2012.09.003.
- Drobak, B.K. & Ferguson, I.B., 1985. Release of Ca2+ from plant hypocotyl microsomes by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Biochemical and biophysical research communications*, 130(3), pp.1241–1246.
- Edel, K.H. & Kudla, J., 2015. Increasing complexity and versatility: how the calcium signaling toolkit was shaped during plant land colonization. *Cell calcium*, 57(3), pp.231–246.
- Eulgem, T. et al., 1999. Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *The EMBO journal*, 18(17), pp.4689–4699.
- Felcher, K.J. et al., 2012. Integration of two diploid potato linkage maps with the potato genome sequence. *PloS one*, 7(4), p.e36347.
- Freymark, G. et al., 2007. Antagonistic control of powdery mildew host cell entry by barley calcium-dependent protein kinases (CDPKs). *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 20(10), pp.1213–1221.
- Fritzemeier, K. et al., 1987. Transient Induction of Phenylalanine Ammonia-Lyase and 4-Coumarate: CoA Ligase mRNAs in Potato Leaves Infected with Virulent or Avirulent Races of Phytophthora infestans., pp.34–41.
- Fry, W.E. et al., 2015. Five Reasons to Consider Phytophthora infestans a Reemerging Pathogen. *Phytopathology*, 105(7), pp.966–981.
- Gao, X. et al., 2013. Bifurcation of Arabidopsis NLR Immune Signaling via Ca2+-Dependent Protein Kinases. *PLoS Pathogens*, 9(1).
- Gao, X., Cox Jr., K. & He, P., 2014. Functions of Calcium-Dependent Protein Kinases in Plant Innate Immunity. *Plants*, 3(1), pp.160–176. Available at: http://www.mdpi.com/2223-7747/3/1/160/.
- Gao, X. & He, P., 2013. Nuclear dynamics of Arabidopsis calcium-dependent protein kinases in effector-triggered immunity © 2013 Landes Bioscience . Do not distribute © 2013 Landes Bioscience . Do not distribute., (April), pp.1–5.
- García-Alai, M.M., Alonso, L.G. & De Prat-Gay, G., 2007. The N-terminal module of HPV16 E7 is an intrinsically disordered domain that confers conformational and recognition plasticity to the oncoprotein. *Biochemistry*, 46(37), pp.10405–10412.
- Gargantini, P.R. et al., 2009. Genomic and functional characterization of StCDPK1. *Plant Molecular Biology*, 70(1–2), pp.153–172.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., B.A., 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*, pp.571–607. Available at: http://web.expasy.org/protparam.
- Giammaria, V. et al., 2011. StCDPK2 expression and activity reveal a highly responsive potato calcium-dependent protein kinase involved in light signalling. *Planta*, 233(3), pp.593–609.
- Gilroy, S., Read, N.D. & Trewavas, A.J., 1990. Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol triphosphate initiates stomatal closure. *Nature*, 346(6286), pp.769–771.
- Grandellis, C. et al., 2016. StCDPK3 Phosphorylates In Vitro Two Transcription Factors Involved in GA and ABA Signaling in Potato: StRSG1 and StABF1. *Plos One*, 11(12), p.e0167389. Available at:

- http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0167389.
- Grandellis, C. et al., 2012. The novel Solanum tuberosum calcium dependent protein kinase, StCDPK3, is expressed in actively growing organs. *Planta*, 236(6), pp.1831–1848.
- Grant, C.E., Bailey, T.L. & Noble, W.S., 2011. FIMO: Scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics*, 27(7), pp.1017–1018.
- 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(11), pp.4525–4543.
- Hahlbrock, K. et al., 1981. Rapid Response of Suspension-cultured Parsley Cells to the Elicitor from Phytophthora megasperma var. sojae: INDUCTION OF THE ENZYMES OF GENERAL PHENYLPROPANOID METABOLISM. *Plant Physiol*, 67(4), pp.768–773. Available at: http://www.plantphysiol.org/cgi/reprint/67/4/768.
- Haldar, K. et al., 2006. Common infection strategies of pathogenic eukaryotes. *Nature reviews. Microbiology*, 4(12), pp.922–931.
- Hamel, L.P., Sheen, J. & S??guin, A., 2014. Ancient signals: Comparative genomics of green plant CDPKs. *Trends in Plant Science*, 19(2).
- Hamilton, J.P. et al., 2011. Single nucleotide polymorphism discovery in elite North American potato germplasm. *BMC genomics*, 12, p.302.
- Harmon, A.C., 2003. Calcium-regulated protein kinases of plants. *Gravitational and space biology bulletin : publication of the American Society for Gravitational and Space Biology*, 16(2), pp.83–90.
- Harmon, A.C. et al., 2001. The CDPK superfamily of protein kinases. *New Phytologist*, 151(1), pp.175–183.
- Harmon, A.C., Yoo, B. & Mccaffery, C., 1994. Pseudosubstrate Inhibition of CDPK, a Protein Kinase with a Calmodulin-Like Domain. *Biochemistry*, 33, pp.7278–7287.
- Harper, J.F., Binder, B.M. & Sussman, M.R., 1993. Calcium and lipid regulation of an Arabidopsis protein kinase expressed in Escherichia coli. *Biochemistry*, 32(13), pp.3282–3290.
- Harper, J.F., Breton, G. & Harmon, A., 2004. Decoding Ca(2+) signals through plant protein kinases. Annual review of plant biology, 55, pp.263–288.
- Harper, J.F. & Harmon, A., 2005. Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(7), pp.555–566.
- Harper, J.F., Huang, J.F. & Lloyd, S.J., 1994. Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry*, 33(23), pp.7267–77. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8003490.
- Hegeman, A.D. et al., 2006. A phyloproteomic characterization of in vitro autophosphorylation in calcium-dependent protein kinases. *Proteomics*, 6(12), pp.3649–3664. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16758442.
- Hettenhausen, C. et al., 2013. Calcium-dependent protein kinases, CDPK4 and CDPK5, affect early steps of jasmonic acid biosynthesis in Nicotiana attenuata. *Plant signaling & behavior*, 8(1), p.e22784.
- Higo, K., 1998. PLACE: a database of plant cis-acting regulatory DNA elements. *Nucleic Acids Research*, 26(1), pp.358–359. Available at: http://nar.oxfordjournals.org/content/26/1/358.long.
- Howles, P.A. et al., 1996. Overexpression of L-Phenylalanine Ammonia-Lyase in Transgenic Tobacco Plants Reveals Control Points for Flux into Phenylpropanoid Biosynthesis. *Plant physiology*, 112(4), pp.1617–1624.
- Hrabak E. M., 2000. Calcium-dependent protein kinases and their relatives. In M Kreis, JC Walker, eds, Advances in Botanical Sciences, Plant Protein Kinases, Vol 32. *Academic Press*, New York, pp 185 223., 32, p.2000.
- Hu, W. et al., 2016. Genome-wide survey and expression analysis of the calcium-dependent protein kinase gene family in cassava. *Molecular Genetics and Genomics*, 291(1), pp.241–253.
- Hu, Y. et al., 2013. Arabidopsis transcription factor WRKY8 functions antagonistically with its interacting partner VQ9 to modulate salinity stress tolerance. *The Plant journal: for cell and*

- molecular biology, 74(5), pp.730-745.
- Hu, Z. et al., 2016. Genome-Wide Identification and Expression Analysis of Calcium-dependent Protein Kinase in Tomato. *Frontiers in Plant Science*, 7(April), pp.1–11. Available at: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.00469.
- Huang, J. et al., 2010. Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant physiology*, 153(4), pp.1526–1538.
- Huang, S. et al., 2005. An Accurate In Vitro Assay for High-Throughput Disease Testing of Phytophthora infestans in Potato. *Plant Disease*, 89(December), pp.1263–1267.
- Huarte M., Capezio S., 2013. Cultivo de papa. In: Agricultura y ganadería pampeanas. 1a edn. EUDEM, Mar del Plata, pp 172-202. , p.2013.
- Ibraheem, O., Botha, C.E.J. & 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(5–6), pp.268–283.
- Ito, T. et al., 2010. Alteration of Substrate Specificity: The Variable N-Terminal Domain of Tobacco Ca2+-Dependent Protein Kinase Is Important for Substrate Recognition. *the Plant Cell Online*, 22(5), pp.1592–1604. Available at: http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.109.073577.
- Jelich-Ottmann, C., Weiler, E.W. & Oecking, C., 2001. Binding of Regulatory 14-3-3 Proteins to the C Terminus of the Plant Plasma Membrane H+-ATPase Involves Part of Its Autoinhibitory Region. *Journal of Biological Chemistry*, 276(43), pp.39852–39857.
- Judelson, H.S. & Blanco, F.A., 2005. The spores of Phytophthora: weapons of the plant destroyer. *Nature reviews. Microbiology*, 3(1), pp.47–58.
- Judelson, H.S. & Tooley, P.W., 2000. Enhanced Polymerase Chain Reaction Methods for Detecting and Quantifying Phytophthora infestans in Plants. *Phytopathology*, 90(10), pp.1112–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18944474.
- Kadota, Y. et al., 2004. Cryptogein-induced initial events in tobacco BY-2 cells: pharmacological characterization of molecular relationship among cytosolic Ca(2+) transients, anion efflux and production of reactive oxygen species. *Plant & cell physiology*, 45(2), pp.160–170.
- Kadota, Y., Shirasu, K. & Zipfel, C., 2015. Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD During Plant Immunity. *Plant & cell physiology*, 56(8), pp.1472–1480.
- Kamoun, S., 2006. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual review of phytopathology*, 44, pp.41–60. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16448329.
- Kanchiswamy, C.N. et al., 2010. Regulation of Arabidopsis defense responses against Spodoptera littoralis by CPK-mediated calcium signaling. *BMC plant biology*, 10, p.97. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3095362%7B&%7Dtool=pmcentrez %7B&%7Drendertype=abstract.
- Kawamoto, N. et al., 2015. Calcium-dependent protein kinases responsible for the phosphorylation of a bZIP transcription factor FD crucial for the florigen complex formation. *Scientific reports*, 5, p.8341. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4321167%7B&%7Dtool=pmcentrez%7B&%7Drendertype=abstract.
- King, S.R.F. et al., 2014. Phytophthora infestans RXLR effector PexRD2 interacts with host MAPKKK ε to suppress plant immune signaling. *The Plant cell*, 26(3), pp.1345–59. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4001388&tool=pmcentrez&render type=abstract.
- Kmiecik, P., Leonardelli, M. & Teige, M., 2016. Novel connections in plant organellar signalling link different stress responses and signalling pathways. *Journal of experimental botany*, 67(13), pp.3793–3807.
- Knight, H. & Knight, M.R., 2000. Imaging spatial and cellular characteristics of low temperature calcium signature after cold acclimation in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, 51(351), pp.1679–1686.
- Kobayashi, M. et al., 2007. Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive

- oxygen species by potato NADPH oxidase. *The Plant cell*, 19(3), pp.1065–1080. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1867354%7B&%7Dtool=pmcentrez%7B&%7Drendertype=abstract.
- Kobayashi, M. et al., 2012. StCDPK5 confers resistance to late blight pathogen but increases susceptibility to early blight pathogen in potato via reactive oxygen species burst. *New Phytologist*, 196(1), pp.223–237.
- Kong, X. et al., 2013. Genome-wide identification and expression analysis of calcium-dependent protein kinase in maize. *BMC genomics*, 14, p.433. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3704972&tool=pmcentrez&render type=abstract.
- Kudla, J., Batistic, O. & Hashimoto, K., 2010. Calcium Signals: The Lead Currency of Plant Information Processing. The Plant Cell, 22(3), pp.541–563. Available at: http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.109.072686.
- Lakatos, L., Hutv??gner, G. & B??nfalvi, Z., 1998. Potato protein kinase StCPK1: A putative evolutionary link between CDPKs and CRKs. *Biochimica et Biophysica Acta Gene Structure and Expression*, 1442(2–3), pp.101–108.
- 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(17), pp.10091–10095.
- Leonhardt, N. et al., 2004. Microarray expression analyses of Arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *The Plant cell*, 16(3), pp.596–615.
- 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(1), pp.325–7. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=99092&tool=pmcentrez&renderty pe=abstract.
- Liu, S. li et al., 2016. Response of phytohormones and correlation of SAR signal pathway genes to the different resistance levels of grapevine against Plasmopara viticola infection. *Plant Physiology and Biochemistry*, 107, pp.56–66.
- Liu, W. et al., 2014. Genome-wide survey and expression analysis of calcium-dependent protein kinase in Gossypium raimondii. *PLoS ONE*, 9(6).
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), pp.402–408. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609.
- Livingstone, K.D. et al., 1999. Genome mapping in capsicum and the evolution of genome structure in the Solanaceae. *Genetics*, 152(3), pp.1183–1202.
- Llop-Tous, I., Dominguez-Puigjaner, E. & Vendrell, M., 2002. Characterization of a strawberry cDNA clone homologous to calcium-dependent protein kinases that is expressed during fruit ripening and affected by low temperature. *Journal of experimental botany*, 53(378), pp.2283–2285.
- Llorente, B. et al., 2010. A quantitative real-time PCR method for in planta monitoring of Phytophthora infestans growth. *Letters in Applied Microbiology*, 51(6), pp.603–610.
- Lobstein, J. et al., 2012. SHuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microbial cell factories*, 11(1), p.56. Available at:
  - http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3526497&tool=pmcentrez&render type=abstract.
- Logemann, E., Parniske, M. & Hahlbrock, K., 1995. Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(13), pp.5905–5909.
- van Loon, L.C. & van Strien, E. a, 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*,

- 55, pp.85–97. Available at: http://igitur-archive.library.uu.nl/bio/2002-0103-100912/UUindex.html.
- Lu, S.X. & Hrabak, E.M., 2002. An Arabidopsis calcium-dependent protein kinase is associated with the endoplasmic reticulum. *Plant physiology*, 128(3), pp.1008–1021.
- Lu, S.X. & Hrabak, E.M., 2013. The myristoylated amino-terminus of an Arabidopsis calcium-dependent protein kinase mediates plasma membrane localization. *Plant Molecular Biology*, 82(3), pp.267–278.
- Ludwig, A.A., Romeis, T. & Jones, J.D.G., 2004. CDPK-mediated signalling pathways: Specificity and cross-talk. *Journal of Experimental Botany*, 55(395), pp.181–188.
- Martín, M.L. & Busconi, L., 2000. Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. *Plant Journal*, 24(4), pp.429–435.
- McAinsh, M.R. et al., 1995. Stimulus-Induced Oscillations in Guard Cell Cytosolic Free Calcium. *The Plant cell*, 7(8), pp.1207–1219.
- Mehlmer, N. et al., 2010. The Ca2+-dependent protein kinase CPK3 is required for MAPK-independent salt-stress acclimation in Arabidopsis. *Plant Journal*, 63(3), pp.484–498.
- Miedema, H. et al., 2001. Calcium uptake by plant cells-channels and pumps acting in concert. *Trends in Plant Science*, 6(11), pp.514–519.
- Mignolet-Spruyt, L. et al., 2016. Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *Journal of experimental botany*, 67(13), pp.3831–3844.
- Milla, M.A.R. et al., 2006. The Arabidopsis AtDi19 gene family encodes a novel type of Cys2/His2 zinc-finger protein implicated in ABA-independent dehydration, high-salinity stress and light signaling pathways. *Plant molecular biology*, 61(1–2), pp.13–30.
- Morsomme, P. & Boutry, M., 2000. The plant plasma membrane H(+)-ATPase: structure, function and regulation. *Biochimica et biophysica acta*, 1465(1–2), pp.1–16.
- Mosciaro, M., 2011. Caracterización de la Producción y Comercialización de Papa en Argentina. Boletín INTA. Área de Economía y Sociología INTA – Balcarce.
- Muñiz García, M.N. et al., 2012. Characterization of StABF1, a stress-responsive bZIP transcription factor from Solanum tuberosum L. that is phosphorylated by StCDPK2 in vitro. *Planta*, 235(4), pp.761–778. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22042328.
- Nakagawa, T., Ishiguro, S. & Kimura, T., 2009. Gateway vectors for plant transformation. *Plant Biotechnology*, 26(3), pp.275–284.
- Navazio, L. et al., 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(15), pp.8693–8698.
- Nawy, T. et al., 2005. Transcriptional Profile of the Arabidopsis Root Quiescent Center. *Science*, 17(July), pp.1908–1925.
- Nicot, N. et al., 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 56(421), pp.2907–2914.
- Nishiuchi, T., Shinshi, H. & Suzuki, K., 2004. Rapid and transient activation of transcription of the ERF3 gene by wounding in tobacco leaves: Possible involvement of NtWRKYs and autorepression. *Journal of Biological Chemistry*, 279(53), pp.55355–55361.
- Ookura, T. et al., 2005. A 55-kDa calcium dependent protein kinase phosphorylated thr residues from the auto-regulatory domain of plasma membrane H+-ATPase in rice. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 39(2), pp.99–104.
- Palmgren, M.G. et al., 1991. Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H+-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 266(30), pp.20470–20475.
- Podell, S. & Gribskov, M., 2004. Predicting N-terminal myristoylation sites in plant proteins. *BMC genomics*, 5(1), p.37.
- Purwar, S. et al., 2013. Expression and in silico characterization of Phenylalanine ammonium lyase against karnal bunt (Tilletia indica) in wheat (Triticum aestivum). *Bioinformation*, 9(20), pp.1013–1018.

  Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&lis

- t\_uids=24497728.
- Qutob, D. et al., 2006. Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. *The Plant cell*, 18(12), pp.3721–3744.
- Raíces, M. et al., 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(5), pp.591–601.
- Raíces M, Gargantini PR, Chinchilla D, et al., 2003. Regulation of CDPK isoforms during tuber development. Plant Mol Biol 52:1011–1024.
- Ray, S. et al., 2007. Expression analysis of calcium-dependent protein kinase gene family during reproductive development and abiotic stress conditions in rice (Oryza sativa L. ssp. indica). *Molecular genetics and genomics : MGG*, 278(5), pp.493–505.
- Rechsteiner, M. & Rogers, S.W., 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(7), pp.267–271.
- Regenberg, B. et al., 1995. C-terminal deletion analysis of plant plasma membrane H(+)-ATPase: yeast as a model system for solute transport across the plant plasma membrane. *Plant Cell*, 7(10), pp.1655–1666.
- Reichert, A.I., He, X.-Z. & Dixon, R. a, 2009. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from tobacco (Nicotiana tabacum): characterization of the four tobacco PAL genes and active heterotetrameric enzymes. *The Biochemical journal*, 424(2), pp.233–242.
- Ren, J. et al., 2008. CSS-Palm 2.0: An updated software for palmitoylation sites prediction. *Protein Engineering, Design and Selection*, 21(11), pp.639–644.
- Resh, M.D., 2006. Palmitoylation of ligands, receptors, and intracellular signaling molecules. *Science's STKE* : signal transduction knowledge environment, 2006(359), p.re14.
- Ritter, H. & Schulz, G.E., 2004. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. *The Plant cell*, 16(12), pp.3426–3436.
- Romeis, T. et al., 2001. Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *The EMBO journal*, 20(20), pp.5556–67. Available at: http://embojnl.embopress.org/content/20/20/5556.abstract.
- 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(March), pp.1–10. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2014.03.002.
- Romeis, T., Piedras, P. & Jones, J.D., 2000. Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *The Plant cell*, 12(5), pp.803–816.
- Ronzier, E. et al., 2014. CPK13, a noncanonical Ca2+-dependent protein kinase, specifically inhibits KAT2 and KAT1 shaker K+ channels and reduces stomatal opening. *Plant physiology*, 166(1), pp.314–26. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25037208.
- Rutschmann, F. et al., 2002. LeCPK1, a Calcium-Dependent Protein Kinase from Tomato. Plasma Membrane Targeting and Biochemical Characterization 1. *Society*, 129(May), pp.156–168.
- Ryals, J. a et al., 1996. Systemic Acquired Resistance. *The Plant cell*, 8(10), pp.1809–1819. Available
  - http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=161316&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.
- Sagi, M. & Fluhr, R., 2006. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant physiology*, 141(2), pp.336–340.
- Sanders, D. et al., 2002. Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant cell*, 14 Suppl, pp.S401–S417.
- Sanders, D., Brownlee, C. & Harper, J., 1999. Communicating with calcium. *The Plant cell*, 11(4), pp.691–706.
- Santin, F. et al., 2016. Solanum tuberosum StCDPK1 is regulated by miR390 at the posttranscriptional level and phosphorylates the auxin efflux carrier StPIN4 in vitro, a potential downstream target in potato development. *Physiologia plantarum*.
- Schindelin, J. et al., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nature Methods,

- 9(7), pp.676–682. Available at: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nmeth.2019.
- Schulz, P., Herde, M. & Romeis, T., 2013. Calcium-dependent protein kinases: hubs in plant stress signaling and development. *Plant physiology*, 163(2), pp.523–530. Available at: http://www.plantphysiol.org/content/early/2013/09/06/pp.113.222539.
- Schumaker, K.S. & Sze, H., 1987. Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca2+ from vacuolar membrane vesicles of oat roots. *The Journal of biological chemistry*, 262(9), pp.3944–3946.
- Schumann, G.L. & D'Arcy, C.J., 2000. Late blight of potato and tomato. *The Plant Health Instructor*, pp.1–10. Available at: http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Oomycetes/Pages/LateBlight.aspx.
- Scrase-Field, S.A.M.G. & Knight, M.R., 2003. Calcium: Just a chemical switch? *Current Opinion in Plant Biology*, 6(5), pp.500–506.
- Serrano, I., Audran, C. & Rivas, S., 2016. Chloroplasts at work during plant innate immunity. *Journal of experimental botany*, 67(13), pp.3845–3854.
- Shapiguzov, A. et al., 2012. ROS-talk how the apoplast, the chloroplast, and the nucleus get the message through. *Frontiers in plant science*, 3, p.292.
- Sigrist, C.J.A. et al., 2013. New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), pp.1–4.
- Simeunovic, A. et al., 2016a. Know where your clients are: subcellular localization and targets of calcium-dependent protein kinases. *Journal of Experimental Botany*, p.erw157. Available at: http://jxb.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/jxb/erw157.
- Simeunovic, A. et al., 2016b. Know where your clients are: subcellular localization and targets of calcium-dependent protein kinases. *Journal of experimental botany*, 67(13), pp.3855–3872. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27117335.
- Stael, S. et al., 2015. Plant innate immunity--sunny side up? Trends in plant science, 20(1), pp.3-11.
- Stael, S. et al., 2011. Protein N-acylation overrides differing targeting signals. *FEBS Letters*, 585(3), pp.517–522. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2011.01.001.
- Sugiyama, K. et al., 2000. A calcium-dependentproteinkinasefunctionsinwoundhealinginVentricariaVentricosa (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 36(6), pp.1145–1152. Available at: http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.2000.00050.x.
- Szczegielniak, J. et al., 2005. A wound-responsive and phospholipid-regulated maize calcium-dependent protein kinase. *Plant physiology*, 139(4), pp.1970–1983.
- Talevich, E., Mirza, A. & Kannan, N., 2011. Structural and evolutionary divergence of eukaryotic protein kinases in Apicomplexa. *BMC evolutionary biology*, 11(1), p.321. Available at: http://www.biomedcentral.com/1471-2148/11/321%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22047078.
- Tamura, K. et al., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), pp.2725–2729.
- Tanaka, K. et al., 2010. Extracellular nucleotides elicit cytosolic free calcium oscillations in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 154(October), pp.705–19. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2949047&tool=pmcentrez&render type=abstract.
- Tang, G.-Q. et al., 2005. Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 44(3), pp.433–446.
- Tanksley, S.D. et al., 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*, 132(4), pp.1141–1160.
- Thomma, B.P.H.J., Nürnberger, T. & Joosten, M.H.A.J., 2011. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant cell*, 23(1), pp.4–15. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21278123.
- de Torres Zabala, M. et al., 2015. Chloroplasts play a central role in plant defence and are targeted by pathogen effectors. *Nature plants*, 1(6), p.15074. Available at:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27250009.
- Ulloa, R.M. et al., 2002. Jasmonic acid affects plant morphology and calcium-dependent protein kinase expression and activity in Solanum tuberosum. *Physiologia plantarum*, 115(3), pp.417–427.
- Valmonte, G.R. et al., 2014. Calcium-dependent protein kinases in plants: Evolution, expression and function. *Plant and Cell Physiology*, 55(3), pp.551–569.
- Wan, B., Lin, Y. & Mou, T., 2007. Expression of rice Ca(2+)-dependent protein kinases (CDPKs) genes under different environmental stresses. *FEBS letters*, 581(6), pp.1179–1189.
- Wang, J. et al., 2015. Cadmium Induces Apoptosis in Freshwater Crab Sinopotamon henanense through Activating Calcium Signal Transduction Pathway. *PloS one*, 10(12), p.e0144392.
- Webb, T.E. et al., 1996. A novel G protein-coupled P2 purinoceptor (P2Y3) activated preferentially by nucleoside diphosphates. *Molecular pharmacology*, 50(2), pp.258–265.
- Whisson, S.C. et al., 2016. The cell biology of late blight disease. *Current opinion in microbiology*, 34, pp.127–135.
- Win, J. et al., 2012. Effector biology of plant-associated organisms: Concepts and perspectives. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 77, pp.235–247.
- Witte, C.P. et al., 2010. Tobacco calcium-dependent protein kinases are differentially phosphorylated in vivo as part of a kinase cascade that regulates stress response. *Journal of Biological Chemistry*, 285(13), pp.9740–9748.
- Xie, F. & Zhang, B., 2010. Target-align: a tool for plant microRNA target identification. *Bioinformatics* (Oxford, England), 26(23), pp.3002–3003.
- Xing, T. et al., 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*, 14(10), pp.1261–1264. Available at: http://dx.doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.10.1261.
- Xu, X. et al., 2011. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*, 475(7355), pp.189–195. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21743474.
- Yamauchi, S. et al., 2010. The consensus motif for N-myristoylation of plant proteins in a wheat germ cell-free translation system. *FEBS Journal*, 277(17), pp.3596–3607.
- Yogendra, K.N. et al., 2015. Transcription factor StWRKY1 regulates phenylpropanoid metabolites conferring late blight resistance in potato. *Journal of Experimental Botany*, 66(22), pp.7377–7389.
- Yoon, G.M. et al., 2006. Calcium-dependent protein kinase isoforms in Petunia have distinct functions in pollen tube growth, including regulating polarity. *The Plant cell*, 18(April), pp.867–878.
- Yoshioka, H. et al., 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(4), pp.321–329.
- Yu, D., Chen, C. & Chen, Z., 2001. Evidence for an Important Role of WRKY DNA Binding Proteins in the Regulation of NPR1 Gene Expression. *The Plant Cell*, 13(July), pp.1527–1539.
- Zanetti, M.E. et al., 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(383), pp.623–632.
- Zhang, X.S. & Choi, J.H., 2001. Molecular evolution of calmodulin-like domain protein kinases (CDPKs) in plants and protists. *Journal of molecular evolution*, 53(3), pp.214–224.
- Zhou, L., Fu, Y. & Yang, Z., 2009. A genome-wide functional characterization of Arabidopsis regulatory calcium sensors in pollen tubes. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51(8), pp.751–761.
- Zhu, S.-Y. et al., 2007. Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *The Plant cell*, 19(10), pp.3019–3036. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2174700%7B&%7Dtool=pmcentrez %7B&%7Drendertype=abstract.
- Zou, J.-J. et al., 2010. Arabidopsis calcium-dependent protein kinase CPK10 functions in abscisic acidand Ca2+-mediated stomatal regulation in response to drought stress. *Plant physiology*, 154(3), pp.1232–43. Available at: http://www.plantphysiol.org/content/154/3/1232.full.

Zulawski, M. et al., 2014. The Arabidopsis Kinome: phylogeny and evolutionary insights into functional diversification. *BMC genomics*, 15, p.548.

# **APÉNDICE**

Apéndice 1. Tabla con los números de acceso de las CDPKs de Arabidopsis, tabaco, tomate y arroz.

Isoforma de CDPK	Número de acceso <sup>a</sup>	Isoforma de CDPK	Número de Acceso <sup>a</sup>
AtCPK1	30680671	NtCDPK3	16215470
AtCPK2	18398950	NtCPK4	AF435451.2
AtCPK4	145340039	NtCPK5	AY971376.1
AtCPK5	145353417	NtCDPK8	HM989873.1
AtCDPK6	145343814	NtCDPK9	HQ141792.1
AtCPK7	145357944	NtCDPK10	HM989874.1
AtCPK9	30685784	NtCDPK11	HQ158609.1
AtCDPK9	836945	NtCDPK12	GQ337420.1
AtCPK11	AY113986.1	NtCDPK13	JN662018.1
AtCPK13	186510945	NtCDPK14	JN662019.1
AtCPK14	145360892	NtCDPK15	JN662020.1
AtCPK15	18415802	NtCDPK16	JN662021.1
AtCPK16	18398551	NtCCaMK2	U70923.1
AtCPK17	30683979	SICPK1	350539855
AtCPK18	334187209	SICDPK1	14029711
AtCPK19	42562872	SICDPK2	350536938
AtCPK20	18404894	OsCDPK1	26224783
AtCPK21	30679856	OsCDPK2	37988775
AtCPK22	18412662	OsCDPK3	33391817
AtCPK23	334186352	OsCDPK4	32970756
AtCPK24	30684978	OsCDPK5	AF194414.2
AtCPK25	18403983	OsCDPK6	32979151
AtCPK26	334187257	OsCDPK7	32976518
AtCPK27	42566303	OsCDPK8	32976633
AtCPK28	334188668	OsCDPK10	32982227
AtCPK29	79607732	OsCDPK11	587499
AtCPK30	145337548	OsCDPK12	AF048691.1
AtCPK31	4809271	OSCDPK13	32971899
AtCPK32	42566006	OsCDPK17	32978432
AtCPK33	186490061	OsCDPK19	32984051
AtCPK34	18419895	OsCDPK21	32988515
NtCDPK1	AF072908.1	OsCDPK23	32975474
NtCDPK2	16215466	OsCDPK24	32987517

CDS utilizadas para realizar el Árbol filogenético (Fig. C1.1). Base de datos del NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/)

Apéndice 2

Apéndice 2. Tabla de Elementos reguladores en cis predichos en las secuencias promotoras de StCDPK8/10/13/14/15/19 y 20, involucrados en expresión de genes de órganos florales.

Asociado a	Elemento regulador en <i>cis<sup>a</sup></i>	Secuencia	Nro	de s de is	sitios sofor	en lo mas (	Nro de sitios en los promotores de isoformas de CDPKs	moto PKs	res
			8	10	10 13	14 15		19	20
	56/59 box LAT(Late Anther Tomato) 56 and LAT59	CAAATTGTGA	2	2	3	3	0	-	4
	52/56 box LAT(Late Anther Tomato)52 and LAT56	AGTGGTTGTAAA	က	4	9	6	<b>~</b>	0	3
	11 G-box	TCCACATACC	7	2	9	7	9	6	7
Polen	Pollen specific ZM13 gene promoter	ACAACCACTATTTCAACCGCAACTACT ACCAC	က	4	က	4	4	က	9
	GTGA motif late pollen gene g10	GTGAC	7	7	က	7	9	က	2
	Q(quantitative)-element ZM13 gene promoter	CGGTCA	4	က	~	7	4	3	3
	Pollen specific activation of lat52 (POLLEN1LELAT52)	TGCACCATA	က	7	7	9	က	4	7
	VOZ-binding sequence found in V-Ppase	CGATAAC	2	7	2	4	9	9	4
	11 G-box sequences	CCACCCACAA	2	2	9	7	9	6	2
	Binding consensus sequence of AGAMOUS	ACCGACAAA	7	-	<b>-</b>	-	<b>-</b>	4	_
Flor	Binding consensus sequence of AGAMOUS MADSdomain	TTTCCTTATTTACAA	0	œ	2	0	2	7	~
	Binding consensus sequence of AGL1(AGAMOUS-like 1)	CTATTCTAATGAGGTATG	က	-	2	0	-	4	2
	CArG consensus sequence found in SOC1 promoter	GTCGGTCACT	2	0	4	2	0	-	0
	CArG2 found in APETALA3 (AP3) gene promoter	ссстсетете	0	7	3	2	7	2	-
Petalos	CArG3 found in APETALA3 (AP3) gene promoter	сстсетет	က	4	3	6	7	4	$\overline{}$
	CArG1 found in APETALA3 (AP3) gene promoter	ACCACGATA	-	4	7	0	7	က	6
Pistilo	CArG3 found in APETALA3 (AP3) gene promoter	CTTTCACTATGAAGTAGC	က	4	က	6	2	4	Ψ.

 $^{\circ}$ Bases de datos: Plant CARE, y el sitio web PLACE. Los motivos convalores p < 0,0001, fueron seleccionados y calculados utilizando la herramienta FIMO de MEME Suite.

# **Apéndice 3**

Apéndice 3. Tabla de Elementos reguladores en cis predichos en las secuencias promotoras de StCDPK6/7/17/18/21 y 25, involucrados en respuestas de estrés biótico.

Arnelados	Elements complete as ples	Commein			de CDPKs	»Ks		
Bonspose	ciemeno regulador en cis	Security	9	1	17	18	21	25
	ASF-1 binding site	TGACG	2	1	9	4	1	4
	Binding site of TGA1	ACGTCATAGA	4	2	7	7	S	m
Salicílico	TCA-1 binding site	TCATCTTCTT	00	2	4	m	6	'n
	Binding with ASF-1	CTGACGTAAGGGATGACGCAC	6	2	m	4	m	7
	OCS element	CGGTTTACGTAATCTCTTACATCA	Э	2	m	m	m	S
	MeJaresponsive element (MeJaRE)	GATACANNAATNTGATG	4	1	9	00	7	7
2007	A 13 bp cis -regulatory element	TGGTAGGTGAGAT	7	6	S	1	7	4
Jasmónico	JERE (jasmonate and elicitor-responsive element)	CTCTTAGACCGCCTTCTTTGAAAG	9	7	1	н	7	7
	T/Gbox	AACGTG	9	2	7	7	m	7
	Core of GCC -box	229229	2	2	0	н	4	-
	HD (homeodomain)	CTAATTGTTTA	0	1	2	2	4	5
	GCC box in "ERE (ethylene responsive element)"	TAAGAGCCGCC	m	-	m	2	4	-
	EIN3 (Eth ylene -insensitive 3) binding site	GGATTCAAGGGGCATGTATCTTGAATCC	9	7	4	7	m	9
	W-box	TGAC	ın (	7	m	4	9	4
Patogenos	111	CTGAAGAAAA	00 (	٠,	7	n c	m·	n.
	HSRE	CAAAIIIIGIA	01	7	n	<b>.</b>	4	n
	Potato silencing element binding factor (SEBF)	YTGTCWC	,	m	7	4	7	m ·
	Core of GCC -box	פררפרר	7	7	0	-	đ.	-
	Core of GCC -box	229229	2	2	0	-	4	-
	G-box binding factor 1 (CrGBF1)	CACGTG	00	7	7	00	7	7
	LSS		4	7	4	9	m	m
Defensa	CORE (coordinate regulatory element for antioxidant def-	-	6	16	16	13	00	23
	W box	CTGACY	4	7	m	7	н	0
	Pt4 (ERF)	GTTAGTT	4	2	0	7	7	m
	AG-motif	AGATCCAA	4	2	0	2	7	7
	Box L	YCYYACCWACC (PAL box)	S	7	m	5	4	9
	ELRE	ATTCTCACCTACCA	4	00	9	7	4	m
	Box P	YTYYMMCMAMCMMC (PALdx)	17	11	+	m	11	27
	W box	TGAC[CT]	S	7	-1	-	9	m
	EIRE	TTGACC	9	7	S	-	7	9
	W box	TTGAC[CT]	S	00	4	2	9	00
	TDBA12 binding site	TGACTTTCTGAC	s	9	4	-	m	9
2000	Stress responsive element (SRE)	TGGTAGGTGAGAT	2	6	2	7	7	4
Elicitores	TacBBF (TAC box binding factor) binding site	ACTCTACAGTACTC	6	-	1	4	m	7
	JERE (jasmonate and elicitor- responsive element)	CTCTTAGACCGCCTTCTTTGAAAG	9	2	1	н	7	7
	W box	CTGACY	4	2	m	7	1	0
	Box A	CCGTCC (PAL box)	4	7	0	7	m	-
	Elicitorresponsive element (EIRE)	GGTCANNNAGTC	S	4	0	7	4	7
	H-box	CCTACCNNNNNNCT	7	00	0	Н	7	4
	AG-motif	AGATCCAA	4	S	0	7	7	7
	TDBA12 binding site	TGACTTTCTGAC	S	9	4	н	m	9
	CLDC	CTCCAACAAACCCTTC (PAI hox )	ox	ď	c	C	o	11

Los elementos característicos del promotor del gen StPAL1 están indicados en negrita. El número de sitios reguladores presentes en el promotor de StCDPK7 se encuentran sombreados en gris. "Bases de datos: Plant CARE, y el sitio web PLACELos motivos con valores p < 0,0001, fueron seleccionados y calculados utilizando la herramienta FIMO de MEME Suite.