



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

**MOVILIZACIÓN DE LA PRINCIPAL PROTEÍNA
DE RESERVA EN TUBÉRCULO DE PATATA
(*Solanum tuberosum* L.) DEPENDIENTE DE SU
ESTATUS DE FOSFORILACIÓN**

Javier Bernal Pampín

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS
NATURALES

SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2019





DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Mobilización de la principal proteína de reserva en tubérculo de patata
(*Solanum tuberosum* L.) dependiente de su estatus de fosforilación

D. Javier Bernal Pampín

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, de de 2019

Fdo.: Javier Bernal Pampín





AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Movilización de la principal proteína de reserva en tubérculo de patata
(*Solanum tuberosum* L.) dependiente de su estatus de fosforilación

D. **José Carlos Zapata Babío**, Catedrático de Genética del Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física

INFORMA:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D. **Javier Bernal Pampín**, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurriré en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.*

En Santiago de Compostela, de de 2019

Fdo.: José Carlos Zapata Babío



DEDICATORIA

Esta Tesis Doctoral no es mía, sino de mis padres, os doy las gracias por permitirme hacer y animarme a terminar un proyecto de esta envergadura, sin vosotros no hubiese sido posible. Mamá, me has criado y educado amándome con locura desde el primer instante de mi vida. Todo lo que puedo hacer es poner en tus manos los logros que con mi limitada capacidad alcance en este mundo. Junto a papá, que descanse en paz, me has enseñado qué significa amar y ser amado.

Papá, el 9 de enero has dejado atrás este mundo, por eso definiendo este trabajo en tu memoria. Aunque todo deje de tener sentido y la noche sea más oscura que nunca, tú siempre estás y estarás a mi lado siendo mi escudo y protector. No comprendo muchas cosas de mi vida, el futuro es incierto, pero me enseñaste que “*Omnia in Bonum*”, o lo que es lo mismo, “todo es para bien”. Así, hago mías un par de estrofas del poema “El Templo Vacío” de Leopoldo Panero que leíste a tus compañeros de instituto en la comida de celebración de tu jubilación.

Lo mejor de mi vida es el dolor. Tú sabes
cómo soy. Tú levantas esta carne que es mía.
Tú esta luz que sonrosa las alas de las aves.
Tú esta noble tristeza que llaman alegría.

Tú me diste la gracia para vivir contigo.
Tú me diste las nubes como el amor humano.
Y al principio del tiempo, Tú me ofreciste el trigo,
con la primera alondra que nació de tu mano.



AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Tesis Doctoral no hubiese sido posible sin la ayuda y colaboración de un enorme equipo humano de trato encomiable. Para empezar, he tenido un excelente director y mentor no sólo en lo profesional, sino también en lo personal. Carlos, me has dado la oportunidad de abordar con éxito una nueva etapa en mi vida. La Tesis Doctoral es como un camino de rosas, resalta por su belleza y encanto, pero a su vez hace mella en el corazón con sus espinas. Como bien me enseñaste, las distintas etapas de la vida llevan consigo “picos y valles” que se suceden. Me has acompañado en todos y cada uno de los problemas que han surgido a lo largo de este proceso, y gracias a ti he dado un paso que me ha servido para madurar y crecer como persona.

Quisiera agradecer también el apoyo recibido por todos y cada uno de mis compañeros con los que he formado parte de un excelente equipo de investigación. María, me has tratado como una madre a un hijo enseñándome como enfrentarme a todas y cada una de las tareas que lleva implícito el trabajo de laboratorio. No solo me has ayudado en mi formación académica, sino que ante los momentos más amargos en los que uno puede pensar en tirar la toalla me decías “no caerá esa breva”, animándome a dar la batalla hasta el final. Ariadna, Raquel y Dani, habéis sido mis compañeros de viaje como doctorandos, siempre recordaré con cariño las anécdotas que hemos vivido en el laboratorio. No olvidaré vuestra especial comprensión en todas y cada una de las fases que he atravesado. Dani, con tu carácter desenfadado has sabido quitar dramatismo a nuestro día a día aportando un toque de humor. Raquel, has sido un ejemplo con tu buena voluntad demostrando que eres una persona que siempre responde cuando uno lo necesita. Ariadna, a ti te recordaré en especial, en esta Tesis Doctoral no solo han brotado patatas sino también una amistad sincera. Ambos tenemos mentalidades completamente distintas, pero hemos sido capaces de entendernos a base de extensas conversaciones que no se han quedado en lo superficial, sino que han profundizado en los valores humanos escuchándonos y aconsejándonos en cada instante.

Por último, quiero decir que hay personas que no nombro pero que como familiares y amigos me han apoyado no sólo ahora, sino en todos y cada uno de los momentos de mi vida. Papá, mamá, hermanos, padrino y demás familia, gracias por quererme y aconsejarme en todo momento. Amigos, me honra que forméis parte de mi historia pudiendo protagonizar cada uno de vosotros un capítulo de la misma.

De todo corazón, gracias a todos



1-DE:	Electroforesis monodimensional
2-DE:	Electroforesis bidimensional
ABA:	Ácido abscísico
BSA:	Seroalbúmina bovina
CI:	Intervalo de confianza
GA:	Ácido giberélico
HF-P:	Ácido fluorhídrico-piridina
IEF:	Isoelectroenfoque
LC:	Cromatografía líquida
MALDI:	Ionización/desorción por láser asistida por matriz
M_r :	Masa molecular relativa
MS:	Espectrometría de masas
pI:	Punto isoeléctrico
PMF:	Huella dactilar de la masa peptídica
PNGasa F:	Enzima péptido-N-glicosidasa F
PR:	Tasa de fosforilación
Pro-Q DPS:	Tinte fluorescente de proteínas fosforiladas Pro-Q Diamond
PTM:	Modificación postraducciona
P ³ DB:	Base de datos de proteínas fosforiladas en plantas
SSP:	Proteína de reserva de semilla seca
TOF:	Tiempo de vuelo
UPGMA:	Método del promedio no ponderado por pares de grupos
VSP:	Proteína de reserva de semilla vegetativa



Las proteínas de reserva de semilla seca (SSPs) presentan isoformas fosforiladas en una gran variedad de especies. La fosforilación de la principal SSP de la judía común desempeña una función clave en su movilización durante la fase de germinación de la semilla. En contraste, se desconoce si las proteínas de reserva de las semillas vegetativas (VSPs) experimentan fosforilaciones. La principal VSP del tubérculo de la patata (*Solanum tuberosum* L.) es la patatina. Este estudio tiene como objetivo la identificación de posibles isoformas de patatina fosforiladas y su implicación en los mecanismos que intervienen en su movilización. Para ello, se elaboró un mapa de alta resolución de las isoformas de patatina del cv. Kennebec, basado en la electroforesis bidimensional (2-DE) y la espectrometría de masas en tándem (MALDI-TOF/TOF MS). La identificación en gel de las isoformas fosforiladas, y su cuantificación, se realizó por medio de la tinción específica de fosfoproteínas y el método de desfosforilación química con ácido fluorhídrico piridina (HF-P). Finalmente, se evaluaron los cambios en el estatus de fosforilación de la patatina a lo largo del ciclo de vida del tubérculo, es decir: endodormancia, rotura de brote, brotación y crecimiento de la planta. Los resultados del estudio revelaron que la patatina comprende múltiples isoformas fosforiladas, lo que supone la primera evidencia de la existencia de fosforilaciones en las VSPs. Además, se detectó un incremento significativo del nivel de fosforilación de la patatina en la transición de los tubérculos desde la etapa de endodormancia a la de brotación, así como un decrecimiento posterior en paralelo con la degradación de la patatina. Las isoformas de patatina del tipo Kuras presentaron los niveles más elevados de fosforilación, siendo preferentemente degradadas después de la brotación del tubérculo. En conclusión, la movilización de la patatina tiene lugar a través de un mecanismo dependiente de su estatus de fosforilación.

Palabras clave: *Solanum tuberosum*; patatina; proteínas de reserva de tejido vegetativo; proteoma fosforilado del tubérculo; electroforesis bidimensional optimizada.



As proteínas de reserva de semente seca (SSPs) presentan isoformas fosforiladas nunha gran variedade de especies. A fosforilación da principal SSP da xudía común desempeña unha función chave na súa mobilización durante a fase de xerminación da semente. En contraste, descoñécese se as proteínas de reserva das sementes vexetativas (VSPs) experimentan fosforilacións. A principal VSP do tubérculo da pataca (*Solanum tuberosum* L.) é a patatina. Este estudo ten como obxectivo a identificación de posibles isoformas de patatina fosforiladas e a súa implicación nos mecanismos que interveñen na súa mobilización. Para iso, elaborouse un mapa de alta resolución das isoformas de patatina do cv. Kennebec, baseado na electroforesis bidimensional (2-DE) e a espectrometría de masas en tándem (MALDI-TOF/TOF MS). A identificación en xel das isoformas fosforiladas, e a súa cuantificación, realizouse por medio da tinción específica de fosfoproteínas e o método de desfosforilación química con ácido fluorhídrico piridina (HF-P). Finalmente, avaliáronse os cambios no estatus de fosforilación da patatina ao longo do ciclo de vida do tubérculo, é dicir: endodormancia, rotura de brote, brotación e crecemento da planta. Os resultados do estudo revelaron que a patatina comprende múltiples isoformas fosforiladas, o que supón a primeira evidencia da existencia de fosforilacións nas VSPs. Ademais, detectouse un incremento significativo do nivel de fosforilación da patatina na transición dos tubérculos dende a etapa de endodormancia á de brotación, así como un decrecemento posterior en paralelo coa degradación da patatina. As isoformas de patatina do tipo Kuras presentaron os niveis máis elevados de fosforilación, sendo preferentemente degradadas despois da brotación do tubérculo. En conclusión, a mobilización da patatina ten lugar a través dun mecanismo dependente do seu estatus de fosforilación.

Palabras chave: *Solanum tuberosum*; patatina; proteínas de reserva de semente vexetativa; proteoma fosforilado do tubérculo; electroforesis bidimensional optimizada.



Seed storage proteins (SSPs) have phosphorylated isoforms in a great variety of species. The phosphorylation of the main SSP of the common bean plays a key role in its mobilization during seed germination. In contrast, the occurrence of phosphorylation in vegetative storage proteins (VSPs) is currently unknown. The patatin is the major VSP in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber. The aim of this study is to identify possible phosphorylated patatin isoforms and assess the involvement of phosphorylation in patatin mobilization. For this purpose, a high-resolution map of the patatin isoforms of cv. Kennebec was developed based on two-dimensional electrophoresis (2-DE) and tandem mass spectrometry (MALDI-TOF / TOF MS). In-gel identification and quantification of the phosphorylated isoforms was carried out by specific staining of phosphoproteins and the chemical dephosphorylation treatment with hydrogen fluoride-pyridine (HF-P). Finally, changes in the phosphorylation status of the patatin were evaluated throughout the following tuber life cycle stages: endodormancy, bud break, sprouting and plant growth. The results of the study revealed that patatin comprises multiple phosphorylated isoforms, which is the first evidence of the existence of phosphorylation in VSPs. In addition, a significant increase in the phosphorylation level of the patatin was detected in the transition of the tubers from the endodormancy to the sprouting stage, as well as a subsequent decrease in parallel with the degradation of the patatin. The Kuras patatin isoforms showed the highest levels of phosphorylation being preferably degraded after tuber sprouting. In conclusion, the mobilization of the patatin takes place through a mechanism dependent on its phosphorylation status.

Key words: *Solanum tuberosum*; patatin; vegetative storage proteins; tuber phosphoproteome; targeted two-dimensional electrophoresis.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Importancia de la patata en el sector alimentario	7
1.2. Proteoma vegetal.....	7
1.2.1 Modificaciones postraduccionales (PTMs).....	9
1.3. Proteoma de la patata	10
1.4. Proteínas de reserva	11
1.4.1. Estructura de la patatina.....	11
1.4.2. Base genética de la patatina	11
1.4.3. Propiedades bioquímicas de la patatina	12
1.4.3.1. Glicosilación en la patatina.....	12
1.4.3.2. Hipótesis de la patatina como proteína fosforilada.....	13
1.5. Movilización de proteínas de reserva de semilla seca	13
1.6. Fosforilación en proteínas de reserva de semilla seca	14
1.6.1. Técnicas proteómicas para el estudio de la fosforilación de las SSPs.....	15
1.6.2. Fosforilación de las SSPs en el desarrollo y la dormancia de la semilla	17
1.6.3. Fosforilación de las SSPs en la germinación de la semilla.....	19
1.7. Ciclo biológico del tubérculo de la patata.....	20
1.8. Movilización de la patatina en el ciclo biológico del tubérculo de la patata	24
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAL Y MÉTODOS	31
3.1. Material biológico y preparación de muestra	33
3.2. Extracción y cuantificación de la proteína.....	34
3.3. Electroforesis bidimensional (2-DE)	35
3.3.1. Protocolo de tinción Pro-Q DPS	36

3.3.2. Protocolo de tinción SYPRO Ruby	36
3.4. Tratamiento de desfosforilación química	37
3.5. Tratamiento de desglicosilación enzimática.....	37
3.6. Análisis de imágenes	37
3.7. Digestión en gel.....	38
3.8. Espectrometría de masas (MS).....	38
3.9. Análisis Estadístico	39
4. RESULTADOS.....	43
4.1. Mapa 2-DE optimizado de las isoformas de patatina.....	45
4.2. Identificación de las isoformas de patatina en los mapas 2-DE optimizados	46
4.3. Glicosilación de las isoformas de patatina en los mapas 2-DE optimizados	48
4.4. Identificación de las isoformas fosforiladas de la patatina en los perfiles 2-DE 2-DE optimizados.....	49
4.5. Cuantificación de la fosforilación de las isoformas de patatina en los perfiles 2-DE optimizados	52
4.6. Perfil 2-DE de las isoformas de patatina en el ciclo de vida del tubérculo.....	58
4.7. Identificación de las isoformas fosforiladas de la patatina en perfiles 2-DE de tubérculos en estado de endodormancia	61
4.8. Fosforilación de las isoformas de patatina en el ciclo de vida del tubérculo	62
4.8.1. Estatus de fosforilación de las isoformas de patatina de tipo Kuras y no-Kuras	67
4.9. Cambios en la abundancia de la patatina en el ciclo biológico del tubérculo	69
5. DISCUSIÓN	71
5.1. Mapa 2-DE optimizado para identificar isoformas de patatina fosforiladas.....	73
5.1.1 Glicosilación de las isoformas de patatina en los mapas 2-DE optimizados	76
5.1.2. Identificación de las isoformas de patatina en los mapas 2-DE optimizados	80

5.2. Perfil 2-DE de las isoformas de patatina en el ciclo de vida del tubérculo	82
5.3. Fosforilación de la patatina en el ciclo de vida del tubérculo.....	85
5.3.1. Estatus de fosforilación de la patatina en tubérculos en estado de endodormancia.....	85
5.3.2. Cambios en el estatus de fosforilación de la patatina en la liberación de la dormancia del tubérculo.....	85
5.3.3. Cambios en el estatus de fosforilación de la patatina en la brotación del tubérculo	86
5.3.4. Cambios en el estatus de fosforilación de la patatina en el crecimiento de la planta.....	87
5.4. Relación entre el estatus de fosforilación y la movilización de la patatina	88
6. CONCLUSIONES	91
7. BIBLIOGRAFÍA	95
8. ANEXOS	115
Anexo I	117
Anexo II.....	124
Anexo III.....	125
Anexo IV.....	133





1. INTRODUCCIÓN



1.1. Importancia de la patata en el sector alimentario

Uno de los cultivos más consumidos en el mundo es el tubérculo de la patata (*Solanum tuberosum* L). En el año 2016 se estimó su producción y superficie de cultivo a nivel mundial en, aproximadamente, 377 millones de toneladas y 19 millones de hectáreas. La patata es el cuarto cultivo más producido en el mundo tras el maíz, el trigo y el arroz. La mayor producción se concentra en los países asiáticos (50,6%) seguido de países europeos (31,2%), americanos (11,3%) africanos (6,5%) y oceánicos (0,4%) (FAOSTAT 2016). Un número de habitantes superior a los mil millones la consumen diariamente, siendo un alimento fundamental en la dieta de países de Sudamérica, África y Asia (CIP 2018). En los países subdesarrollados y en desarrollo, la ingesta per cápita de la patata y sus productos derivados es aproximadamente un 60% inferior con respecto a su consumo promedio en todo el mundo (FAOSTAT 2013). En los países desarrollados los patrones de consumo de la patata cambian en función de si es procesada o no, esto se debe a los hábitos de consumo de comida rápida (Rodríguez-Amado *et al.* 2014). Si se produce un incremento de su consumo, será necesario el desarrollo de nuevas tecnologías que aumenten su rendimiento de cultivo. La patata es una planta de fácil crecimiento y, si se compara con otros cultivos, puede proveer de manera rápida comida muy nutritiva requiriéndose una menor demanda de superficie de cultivo (Mullins *et al.* 2006).

1.2. Proteoma vegetal

El término “proteoma” fue descrito por primera vez por Marc Wilkins en una reunión de Siena en 1994, donde se introdujo la idea de que el proteoma es el cúmulo de proteínas expresadas por el genoma (Bini *et al.* 2007). Una extensión de este concepto es el término “proteómica”, que comprende la identificación y el análisis de la expresión de las proteínas a nivel cuantitativo en unas condiciones determinadas y en un momento dado dentro de un organismo, tejido, célula u orgánulo celular (Tan *et al.* 2013). La proteómica abarca a su vez información sobre la estructura y la función de las proteínas, su localización en el sistema biológico estudiado, así como de las modificaciones e interacciones que experimentan y desarrollan (Ortea *et al.* 2016). La proteómica es una disciplina que ha madurado, incrementándose el número de estudios realizados desde su origen hace aproximadamente 25 años (Miernyk 2014). A pesar de los avances logrados, estamos ante el comienzo del desarrollo de la era de la proteómica siendo necesario el desarrollo de nuevas tecnologías e

investigaciones para llegar al punto de su máximo rendimiento (Jorrín-Novo 2014). Desde el origen de la proteómica se empleó la electroforesis bidimensional (2-DE) combinada con la espectrometría de masas (MS). En adelante, se desarrollaron nuevas metodologías proteómicas que emplean técnicas cromatográficas y/o técnicas de espectrometrías de masas (Jorrín-Novo 2014; Rabilloud 2014). Así pues, existen dos tipos de análisis proteómicos, los que emplean técnicas que se basan en la utilización de geles de electroforesis, y los que no los utilizan (Tan *et al.* 2017). La metodología proteómica basada en geles 2-DE, primera vez descrita por O'Farrell (1975), es la más reproducible y robusta siendo muy utilizada en proteómica de plantas (Agrawal *et al.* 2012; Rabilloud 2014).

Entre las limitaciones de la técnica 2-DE se destaca su carencia de resolución para analizar proteínas presentes en baja abundancia o proteínas de membrana, lo que se puede corregir parcialmente con el empleo de protocolos optimizados para el estudio de un tipo concreto de proteína (Görg *et al.* 2004, 2009; Rabilloud and Lelong, 2011; Grupta *et al.* 2016; Mouzo *et al.* 2018a). Se conoce que los tejidos de plantas contienen una menor cantidad de proteínas que otros organismos, así como una gran diversidad de componentes biológicos que pueden interferir en su extracción, solubilización y separación por medio de la técnica 2-DE. Entre los componentes biológicos que interfieren se incluyen a la pared celular, los lípidos, los polisacáridos, los polifenoles y un amplio número de proteasas. Teniendo en cuenta esto, la extracción de las proteínas es un paso inicial crítico en los estudios de proteómica de plantas porque tiene una relación directa con la calidad final de los análisis 2-DE (Saravanan and Rose 2004; Carpentier *et al.* 2005; Faurobert *et al.* 2007; de la Fuente *et al.* 2011; Mouzo *et al.* 2018a). En su conjunto, estas apreciaciones muestran que la 2-DE es muy laboriosa y que es una tecnología poco automatizada que requiere un equipo de profesionales expertos para extraer el máximo rendimiento a su potencial. Los análisis 2-DE de alta resolución pueden separar, detectar y cuantificar miles de proteínas de forma simultánea (Weiss and Görg 2007). Actualmente se emplea de manera rutinaria en proteómica para analizar proteínas solubles abundantes con una cantidad aproximada de 1-2 ng por *spot*, un rango lineal dinámico de hasta 3 órdenes de magnitud, un rango de masa molecular de 15-150 kDa y un rango de pH 2,5-12 (Görg *et al.* 2004; Weiss and Görg 2007; Rabilloud *et al.* 2010; Mouzo *et al.* 2018a). Por lo que la 2-DE tiene un poder de resolución suficiente como para separar a la mayoría de las isoformas de las proteínas solubles más abundantes en los tejidos vegetales.

La proteómica es una herramienta muy interesante para ahondar en el conocimiento de procesos biológicos que incluyen al desarrollo de las plantas y su respuesta frente a situaciones de estrés (Takáč *et al.* 2017). El estudio de la proteómica de las plantas es un área de investigación que está creciendo de manera exponencial desde que se produjo el primer estudio en el maíz (Touzet *et al.* 1996; Tan *et al.* 2017). Dentro de la proteómica de las plantas, se destaca el estudio de la biología de la semilla en el conjunto de las distintas fases de su ciclo biológico y bajo distintas condiciones ambientales (Miernyk 2014). Por ejemplo, existen proteínas importantes en la regulación y desarrollo del mecanismo de germinación de la semilla, cuyo conocimiento resulta fundamental para el sector agrícola (Tan *et al.* 2017). Se han hecho revisiones sobre los avances y éxitos de la proteómica en el estudio de mecanismos moleculares tanto en el proceso del desarrollo de la semilla como en el de su germinación (Miernyk and Hajduch 2011; Deng *et al.* 2013).

1.2.1 Modificaciones postraduccionales (PTMs)

La diversidad y abundancia de las proteínas en los sistemas biológicos se regulan por eventos postranscripcionales y postraduccionales, por lo que los análisis del genoma y del transcriptoma son insuficientes para su estudio (Calvete 2014). La proteómica es una herramienta muy útil para la identificación, con un rendimiento muy elevado, de las modificaciones postraduccionales (PTMs) (Takáč *et al.* 2017). En plantas, las PTMs influyen en múltiples aspectos de la funcionalidad de las células mediante el control de mecanismos de: señalización, expresión génica, estabilidad proteica, cinética enzimática, interacciones entre proteínas y localización subcelular (Friso and van Wijk 2015; Silva-Sanchez *et al.* 2015; Hashiguchi and Komatsu 2017; Tan *et al.* 2017). Los tipos de modificaciones postraduccionales más comunes son: la fosforilación, la glicosilación, la ubiquitinación, la nitrosilación, y la carbonilación (Tan *et al.* 2017).

La fosforilación es la PTM más conocida, en los últimos años se han desarrollado numerosos estudios del proteoma fosforilado, o “fosfoproteoma”, en plantas modelo sometidas a diversas condiciones de crecimiento (Schulze *et al.* 2015). El genoma de las plantas codifica al menos 1.000 proteínas quinasas, lo que supone aproximadamente el doble de las que codifica el genoma humano (The Arabidopsis genome initiative 2000; Manning *et al.* 2002). Estos datos subrayan la importancia de la fosforilación de proteínas en plantas, donde la fosforilación reversible es uno de los mecanismos de control metabólico de mayor

relevancia (Huber 2007). La fosforilación de las proteínas puede regular cambios funcionales en la maduración y germinación de la semilla, el crecimiento de la planta y su respuesta frente a situaciones adversas (Weber *et al.* 2005; López-Pedrouso *et al.* 2014a; Schulze *et al.* 2015; Yin *et al.* 2018; Mouzo *et al.* 2018a). Como consecuencia de la variación dinámica de los eventos de fosforilación, es necesario seguir midiendo los cambios cuantitativos de las formas fosforiladas de las proteínas para conocer en detalle sus mecanismos regulatorios (Silva-Sanchez *et al.* 2015).

1.3. Proteoma de la patata

Los primeros análisis proteómicos en especies de la familia *Solanaceae* se realizaron hace aproximadamente 3 décadas. En la revisión de Ghatak *et al.* (2017), se describe que desde entonces se han empleado metodologías proteómicas basadas en la utilización de geles (75% de los estudios realizados) o en el no empleo de los mismos. A su vez, se detalla que el 28% de los estudios se realizaron en la patata (*S. tuberosum*) debido a su importancia económica. El contenido proteico de la patata supone en torno a un 2-5% del peso fresco del tubérculo (Bartová *et al.* 2015; Calliope *et al.* 2018). La proteína de la patata representa el 1,8% de la proteína total ingerida per cápita. En las poblaciones humanas de países de América Central y África disminuye sensiblemente este porcentaje, a diferencia de los países de Europa, América del Norte y Oceanía en los que aumenta (FAOSTAT 2013). A pesar del bajo contenido proteico de la patata, ésta supone un componente alimenticio importante (Lachman *et al.* 2005). A su vez, el contenido proteico es un factor relevante en la evaluación de la calidad del tubérculo de la patata (Mitrus *et al.* 2003). Las metodologías proteómicas también se emplearon para dar respuesta a cuestiones que hacen referencia a los factores genéticos que puedan tener algún tipo de efecto sobre el proteoma de la patata (Lehesranta *et al.* 2005). Por otra parte, se desarrollaron perfiles proteómicos 2-DE para las distintas fases de desarrollo del ciclo del tubérculo de la patata lo que incluye su: desarrollo, dormancia, almacenamiento y brotación (Lehesranta *et al.* 2006). Las proteínas del tubérculo de patata se pueden clasificar por orden creciente de abundancia, en 3 grupos: proteínas de elevado peso molecular, inhibidores de proteasas y la patatina (Pots *et al.* 1999b; Ralet and Guéguen 2000). Las proteasas se definen como proteínas con la actividad enzimática de degradar a otras proteínas (López-Otín and Bond 2008), por lo tanto, los inhibidores de proteasas impiden dicha degradación.

1.4. Proteínas de reserva

Las proteínas de reserva se clasifican en función de si se localizan en semillas vegetativas (VSPs) o en semillas secas u ortodoxas (SSPs) (Shewry *et al.* 1995; Shewry 2003). Las VSPs se confinan en tejidos vegetales (tubérculo, tallo, raíz y hoja) de plantas como la patata dulce (esporaminas), la patata (patatina) y la *Oxalis tuberosa* Mol. (ocatinas) (Beardmore *et al.* 1996; Müntz 1998; Fujiwara *et al.* 2002; de Souza Cândido *et al.* 2011). En el caso de la patata, las proteínas de reserva se sitúan en tejidos vegetativos como son el tubérculo y la hoja (Sonnewald *et al.* 1989a). Las proteínas de reserva presentes en el tubérculo son las siguientes: las patatinas, los inhibidores de proteasas de tipo Kunitz, inhibidores de proteasas de tipo I y II, inhibidores de carboxipeptidasas y lipooxigenasas (Jørgensen *et al.* 2011). La proteína de reserva mayoritaria es la patatina, llegando a representar hasta un 45% de la proteína total soluble del tubérculo (Racusen and Foote 1980; Paiva *et al.* 1983; Liu *et al.* 2003; de Souza Cândido *et al.* 2011).

1.4.1. Estructura de la patatina

Utilizando la técnica de la electroforesis no desnaturizante, se determinó que la patatina es una proteína dimérica de 78 kDa en un medio de pH neutro a temperatura ambiente (Racusen and Weller 1984). En presencia de SDS, la estructura dimérica se rompe en sus unidades monoméricas (Racusen and Weller 1984). Los monómeros de las isoformas de patatina están formados por cadenas polipeptídicas con un número de aminoácidos que varía entre 374 y 387 (UniProt 2018). La patatina se clasifica como una proteína con un plegamiento de clase α/β , tiene 6 láminas β plegadas que se ubican en el medio de capas de hélices α formando una estructura de tipo sándwich (Rydel *et al.* 2003). La patatina contiene de manera aproximada, un 46% de hojas plegadas β y un 33% de hélices α (Pots *et al.* 1998).

1.4.2. Base genética de la patatina

El sistema genético que codifica la proteína patatina es muy complejo. En un principio se creía que los genes de patatina estaban presentes en un único *locus* dentro del cromosoma 8, y que dicho *locus* estaba dividido en dominios discretos (Ganal *et al.* 1991). Hoy en día, el consorcio que secuenció el genoma de la patata encontró genes que codifican para la proteína patatina en los cromosomas: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 y 10; situándose la mayoría al final del brazo largo del cromosoma 8 (The Potato Genome Sequencing Consortium 2011). Hay 16-18 copias de genes de patatina por genoma haploide (Twell and Ooms 1988). Los genes de

patatina tienen 7 exones y 6 intrones, y se dividen en dos clases: clase I y clase II (Bevan *et al.* 1986; Pikaard *et al.* 1987; Mignery *et al.* 1988). A diferencia de los genes de patatina de clase II, en los de clase I está ausente un tracto de 22 nucleótidos en la región 5'UTR. Los transcritos de patatina de clase I se expresan de manera específica en tubérculos, el número de sus transcritos es 50-100 veces superior al de los de patatina de clase II (Pikaard *et al.* 1987; Mignery *et al.* 1988). Los genes codificadores de la patatina muestran al menos un 90% de homología en su secuencia nucleotídica, siendo el gen más diferenciado el que codifica para la isoforma de patatina de tipo Kuras pat3-k1 (PT3K1) (Mignery *et al.* 1984, 1988; Bauw *et al.* 2006).

1.4.3. Propiedades bioquímicas de la patatina

Existen múltiples isoformas de patatina, definiéndose isoforma como distintas formas de una proteína que pueden ser producidas por la expresión de un mismo gen mediante el mecanismo del *splicing* alternativo, o a partir de genes distintos (NCBI 1999). Las isoformas de patatina tienen una masa molecular relativa (M_r) que oscila de 40 a 45 kDa, son inmunológicamente idénticas, tienen una homología muy alta en sus secuencias, y presentan glicosilaciones (Park *et al.* 1983; Mignery *et al.* 1984; Mignery *et al.* 1988; Stiekema *et al.* 1988; Sonnewald *et al.* 1989a; Kärenlampi and White 2009). A su vez, las isoformas de patatina contienen en sus cadenas polipeptídicas residuos aminoácidos con cargas positivas y negativas (Pots *et al.* 1998). El momento en el que la proteína es eléctricamente neutra a un pH determinado se conoce como punto isoeléctrico (pI) (NCBI 1975). El pI de las isoformas de patatina tiene un valor que varía de 4,6 a 5,2 (Pots *et al.* 1999a). En cuanto a las metodologías proteómicas empleadas para su caracterización, la 2-DE aportó la información más completa permitiendo la descripción de su M_r y su pI (Lehesranta *et al.* 2005, 2006; Bauw *et al.* 2006; Bárta *et al.* 2012).

1.4.3.1. Glicosilación en la patatina

La glicosilación de las proteínas tiene funciones biológicas importantes para el desarrollo de los organismos como pueden ser: señalización intracelular, estabilidad proteica, control del correcto plegamiento proteico e interacciones proteína-proteína (Strasser 2014, 2016). Las variaciones en la M_r de las isoformas de la patatina parece que se deben a la presencia de glicosilaciones en su secuencia de aminoácidos (Pots *et al.* 1999a). Más concretamente, a una glicosilación diferencial con enlaces de tipo N- en tres residuos

aminoacídicos de Asn, diferenciándose en el tipo de oligosacárido unido o en el número de glucanos añadidos (Sonnewald *et al.* 1989b; Bauw *et al.* 2006; Bárta *et al.* 2012; Lattová *et al.* 2015). Los primeros estudios que describieron a la patatina como una proteína glicosilada fueron ensayos *in vivo* e *in vitro* realizados por Racusen and Foote (1980) y Sonnewald *et al.* (1989b). De ahí en adelante, se determinó la presencia de hasta 5 sitios de glicosilación sobre residuos aminoacídicos de Asn y Thr total o parcialmente ocupados en sus cadenas polipeptídicas (Sonnewald *et al.* 1989b; Bauw *et al.* 2006; Wellinder and Jørgensen 2009; Bárta *et al.* 2012; Lattová *et al.* 2015).

1.4.3.2. Hipótesis de la patatina como proteína fosforilada

Empleando geles 2-DE no solo se detectó variaciones en la M_r de la patatina, sino que también se encontró diferencias en su pI estudiando distintos cultivares de tubérculo de patata (Lehesranta *et al.* 2005; Bauw *et al.* 2006; Bárta *et al.* 2012). Las diferencias de pI en las cadenas aminoacídicas de las isoformas de patatina pueden ser explicadas por variaciones en los aminoácidos cargados positiva- o negativamente (Pots *et al.* 1999a). Sin embargo, la fosforilación variable también tiene el potencial de cambiar el pI de las proteínas sustituyendo los grupos hidroxilo de los residuos aminoacídicos por grupos fosfato cargados negativamente (Zhu *et al.* 2005). Por lo tanto, la fosforilación podría ser un factor que explique la heterogeneidad presente en el pI de las isoformas de patatina.

1.5. Movilización de proteínas de reserva de semilla seca

Una vez que se realiza la caracterización de las proteínas de reserva, se estudia su movilización en el ciclo biológico de la semilla. No sólo se analiza en qué medida cambia su abundancia, sino que también se trata de dilucidar qué mecanismos pueden regular este fenómeno. Hasta la fecha, el conocimiento más completo de los cambios en la abundancia de las proteínas de reserva y su regulación se ha obtenido mediante su estudio en la semilla seca. Los mapas 2-DE aportan información muy valiosa a cerca del complejo entramado de cambios dinámicos que experimentan las proteínas de reserva en el desarrollo de la semilla y su germinación, hecho que se describe en la revisión de Mouzo *et al.* (2018a). Las investigaciones descritas en la literatura científica muestran evidencias de que las proteínas de reserva se acumulan en el proceso del crecimiento del embrión y el llenado de la semilla, siendo su patrón variable en función del tipo de proteína de reserva y el cultivar. Así, Gallardo *et al.* (2007) determinaron que las principales SSPs de la especie modelo de legumbre

Medicago truncatula L., 11S leguminas y 7S vicilinas, son sintetizadas en un orden temporal específico y se acumulan en distintas cantidades relativas durante el desarrollo de la semilla. Guo *et al.* (2012) determinaron que 5 tipos de SSPs del trigo (γ -gliadinas, globulinas, proteínas similares a la avenina, triticina y gluteninas de bajo peso molecular) se acumulan de manera diferencial en el proceso de desarrollo del grano. Las SSPs de la colza *Brassica napus* L. (napinas, cruciferinas y oleosinas) parece que se acumulan sólo en las etapas tempranas e intermedias del desarrollo de la semilla (Borisjuk *et al.* 2013; Gacek *et al.* 2018). En su conjunto, estas observaciones plantean la cuestión de cuáles son los mecanismos responsables de la acumulación diferencial de las isoformas de las proteínas de reserva en el proceso del desarrollo de la semilla. Por otra parte, también se sugiere que la movilización de las SSPs tiene una importancia especial en la etapa de la germinación de la semilla y el consiguiente crecimiento de la planta (Tan-Wilson and Wilson 2012; Mouzo *et al.* 2018a). En este sentido, los análisis proteómicos basados en la 2-DE revelaron que la acumulación de las proteínas de reserva también puede tener lugar en etapas tardías del desarrollo de la semilla y en el comienzo de la germinación. Chibani *et al.* (2006) demostraron que los precursores de las cruciferinas, una de las principales SSPs de *Arabidopsis thaliana* L., son acumulados por síntesis *de novo* en las etapas tardías del desarrollo de la semilla. Además, un estudio de la terminación de la dormancia en *Arabidopsis* sugiere que el ácido giberélico (GA) está implicado en el procesamiento de las formas precursoras de las SSPs y la acumulación de sus formas procesadas en semillas maduras (Gallardo *et al.* 2002). Por último, es destacable la investigación que revela una degradación diferencial de las isoformas de la principal proteína de reserva de la judía común (*Phaseolus vulgaris* L.), la faseolina, en la finalización de la dormancia de la semilla y su consiguiente germinación (López-Pedrouso *et al.* 2014a). No solo se describe la movilización de las SSPs, sino que también se trata de comprender cómo se regula estudiando los cambios en sus PTMs entre las que se destaca a la fosforilación.

1.6. Fosforilación en proteínas de reserva de semilla seca

Un paso previo a la asignación de un posible rol funcional a la fosforilación de las SSPs, es la identificación y caracterización de sus isoformas fosforiladas. El conocimiento de la presencia de fosforilaciones en distintos tipos de SSPs en una amplia variedad de especies se ha incrementado de manera notable en los últimos 25 años. En la revisión de Mouzo *et al.* (2018a) se muestra el estado de conocimiento actual sobre la fosforilación en SSPs. Se ha detectado la presencia de isoformas fosforiladas de proteínas de reserva de tipo globulina en

semillas de: *Arabidopsis*, arroz (*Oryza sativa* L.), colza (*B. napus*), girasol (*Helianthus annuus* L.), judía común (*P. vulgaris*), pino (*Pinus Sylvestris* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.) (Agrawal and Thelen 2006; Irar *et al.* 2006; Wan *et al.* 2007; Ghelis *et al.* 2008; Capraro *et al.* 2011; Guo *et al.* 2012; Meyer *et al.* 2012; Kovaleva *et al.* 2013; Quiroga *et al.* 2013; Han *et al.* 2014; López-Pedrouso *et al.* 2014a; Dong *et al.* 2015). A su vez, otro tipo de proteínas de reserva como son las albúminas de semillas de *Arabidopsis* y de pino, las glutelinas de semillas de arroz y las prolaminas de semillas de trigo también presentan isoformas fosforiladas (Tilley and Schofield 1995; Facchiano *et al.* 1999; Irar *et al.* 2006; Wan *et al.* 2007; Kovaleva *et al.* 2013; Lin *et al.* 2005). Para comprender como se regula la movilización de las SSPs, es necesario estudiar las correlaciones entre los cambios de su nivel de fosforilación y las variaciones en su abundancia relativa (Agrawal and Thelen 2006). A su vez, si se estudian los cambios dinámicos de la fosforilación de las proteínas en un plano espacial y temporal, se mejorará notablemente el conocimiento sobre el rol de la fosforilación en los mecanismos de control de este proceso biológico (Kersten *et al.* 2009).

1.6.1. Técnicas proteómicas para el estudio de la fosforilación de las SSPs

El análisis de las isoformas fosforiladas de las proteínas de reserva basadas en perfiles optimizados 2-DE tiene algunas ventajas importantes con respecto a los análisis basados principalmente en la utilización de la MS, hecho que se explica en la revisión de Mouzo *et al.* (2018a). En la Tabla 1 se muestran los estudios registrados en la literatura científica que se han basado en la técnica 2-DE para el análisis de la fosforilación en las proteínas de reserva. La estrategia estándar de los análisis fosfoproteómicos de carácter cuantitativo utilizan la digestión química o enzimática de una mezcla de proteínas, así se transforman en péptidos con los que se produce un espectro MS/MS (Silva-Sánchez *et al.* 2015). El principal inconveniente de esta metodología es su limitación para asignar un fosfopéptido de manera específica a una única isoforma debido a la alta redundancia de los péptidos y de los sitios de fosforilación (Rabilloud 2014). En este sentido, es destacable el hecho de que las isoformas de las proteínas de reserva son codificadas por familias génicas que muestran una alta homología de secuencia, por ejemplo, las isoformas de patatina son codificadas por una familia multigénica constituida por unos 10-18 genes por genoma haploide (The Potato Genome Sequencing Consortium 2011) que tienen una homología de secuencia de más de un 90% (Mignery *et al.* 1984, 1988). A su vez, hay otros factores que pueden hacer que se alcancen

Tabla 1. Lista de estudios fosfoproteómicos de SSPs basados en 2-DE. Fuente: Mouzo *et al.* (2018a).

Storage Protein Type	Storage Protein Subtype	Seed Stage	Additional Techniques	Species	Reference
Globulin	12S cruciferin	Development	Pro-Q DPS, LC-MS/MS	Rapeseed (<i>Brassica napus</i> L.)	Agrawal and Thelen (2006)
	12S triticin Globulin 3	Development	Pro-Q DPS, MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF	Wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Guo <i>et al.</i> (2012)
	12S cruciferin	Dormancy	1-DE, Pro-Q DPS, <i>Immunoblotting</i> , LC-MS/MS	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Irar <i>et al.</i> (2006); Wan <i>et al.</i> (2007)
	7S phaseolin	Dormancy Germination	Pro-Q DPS, HF-P, MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF	Common bean (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	López-Pedrouso <i>et al.</i> (2014a)
	12S cruciferin	Germination	<i>Western blotting</i> , MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Ghelis <i>et al.</i> (2008)
	Cupin	Germination	Pro-Q DPS, MALDI-TOF/TOF	Rice (<i>Oryza sativa</i> L.)	Han <i>et al.</i> (2014)
	Globulin 3	Germination	Pro-Q DPS, LC-MS/MS	Wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Dong <i>et al.</i> (2015)
Albumin	2S napin	Dormancy	1-DE, Pro-Q DPS, <i>Immunoblotting</i> , LC-MS/MS	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Irar <i>et al.</i> (2006); Wan <i>et al.</i> (2007)
Glutelin	N/A	Development	Pro-Q DPS, LC-MS/MS	Rice (<i>Oryza sativa</i> L.)	Lin <i>et al.</i> (2005)

N/A, Not Available

conclusiones erróneas en los análisis de PTMs basados exclusivamente en técnicas de MS. Estos factores son: la coelución de péptidos, la pérdida del grupo fosforilo en el proceso de la ionización, la transferencia de fosfatos a residuos aceptores, la falta de reproducibilidad y el bajo número de réplicas biológicas utilizadas (Gonzalez-Sanchez *et al.* 2013; Rabilloud 2014). Algunas de estas desventajas son aplicables a métodos basados en MS muy utilizados en proteómica cuantitativa como son la unión estable de isótopos con aminoácidos en cultivos celulares (SILAC) y la unión de etiquetas isobáricas para la cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ). Por otra parte, las técnicas de enriquecimiento de fosfoproteínas son utilizadas de forma frecuente antes de los análisis de MS debido a la baja cantidad de fosfopéptidos presentes en la muestra biológica (Gonzalez-Sanchez *et al.* 2013; Silva-Sánchez *et al.* 2015). En el caso de las proteínas de reserva la aplicación de técnicas de enriquecimiento de fosfopéptidos no es necesaria porque son proteínas que presentan altos niveles de fosforilación (López-Pedrouso *et al.* 2014a). Además, la cromatografía de afinidad inmovilizada del ion metal (IMAC) y dióxido de titanio (TiO₂) no permiten un análisis del estatus de fosforilación en las distintas isoformas de proteínas de reserva, lo que sí posibilitan es la identificación de sus sitios de fosforilación (Gonzalez-Sanchez *et al.* 2013; Silva-Sánchez *et al.* 2015).

1.6.2. Fosforilación de las SSPs en el desarrollo y la dormancia de la semilla

Los estudios fosfoproteómicos indican que las proteínas de reserva están fosforiladas y pueden desarrollar una función importante en el desarrollo de la semilla y su germinación (Mouzo *et al.* 2018a). En este sentido, Meyer *et al.* (2012) hicieron un estudio a gran escala del subproteoma enriquecido de fosfoproteínas en 5 estados de desarrollo de la semilla en soja (*Glycine max* L.), colza (*B. napus*) y *Arabidopsis*. Estos investigadores identificaron un total de 2.001 fosfopéptidos y 1.026 sitios de fosforilación no ambiguos en un total de 956 proteínas no redundantes, entre las que se incluyen a las proteínas de reserva. Una fracción considerable de las fosfoproteínas, 25%, resultaron ser proteínas de reserva que contienen el motivo de fosforilación X-S-D-X. Donde X puede ser cualquier aminoácido, S es el aminoácido Ser y D es el aminoácido Asp. Mediante la combinación de la 2-DE con un método de desfosforilación química que emplea ácido fluorhídrico piridina (HF-P), se determinó una elevada tasa de fosforilación (PR) en isoformas de la proteína de reserva mayoritaria en semillas en estado de dormancia de la judía común, la faseolina (López-Pedrouso *et al.* 2014a). Además, el análisis *in silico* de los fosfopéptidos reveló la presencia

del sitio de fosforilación X-S-D-X en los fosfopéptidos de la faseolina. Razón por la cual este péptido parece ser una diana de fosforilación en proteínas de reserva en el desarrollo de la semilla.

Los mapas 2-DE indican que la acumulación de isoformas de proteínas de reserva en el desarrollo de la semilla tiene patrones variables (Mouzo *et al.* 2018a). El primer estudio en el que se detectó y cuantificó fosfoproteínas en el desarrollo de la semilla fue realizado por Agrawal and Thelen (2006). Estos investigadores obtuvieron un perfil de fosfoproteínas en *B. napus* analizando los mismos cinco estados de desarrollo de la semilla que estudiaron Meyer *et al.* (2012). Esto se consiguió mediante la técnica 2-DE acoplada a la tinción específica de proteínas fosforiladas con el tinte fluorescente Pro-Q Diamond (Pro-Q DPS). Para la identificación de sitios de fosforilación utilizaron la cromatografía líquida de alta resolución combinada con la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Los resultados del estudio indican que el 40% de las subunidades de la proteína de reserva cruciferina incrementan su fosforilación en el desarrollo de la semilla, a diferencia del resto de las subunidades en las que generalmente se disminuye. A su vez, algunas subunidades fosforiladas de cruciferina muestran una mayor representación en estados tardíos del desarrollo de la semilla (Agrawal and Thelen 2006; Meyer *et al.* 2012). En las proteínas de reserva del altramuz blanco (*Lupinus albus* L.) también se detectó un aumento del nivel de fosforilación de sus isoformas durante el desarrollo y maduración de la semilla (Capraro *et al.* 2011).

Los complejos mecanismos regulatorios subyacentes bajo los cambios dinámicos en el estatus de fosforilación de las SSPs no se conocen en profundidad (Mouzo *et al.* 2018a). Sin embargo, se reconoce que un entramado de proteínas quinasas, proteínas fosfatasa y fitohormonas participan en la señalización celular y en las rutas metabólicas que controlan los niveles de fosforilación/desfosforilación de las proteínas de reserva. La proteína CK2 es una quinasa que fosforila a los residuos aminoacídicos Ser y Thr. Esta Ser/Thr quinasa está presente en todas las células eucariotas y está implicada en la regulación de múltiples procesos de desarrollo y crecimiento de las plantas, así como en las rutas de señalización celular de la fitohormona ácido abscísico (ABA) (Mulekar and Huq 2014; Vitela *et al.* 2015; Montemarh and Götz, 2018). Irar *et al.* (2006) utilizaron mapas 2-DE para realizar el perfil de fosfoproteínas de proteínas abundantes en embriogénesis tardía (LEA) y proteínas de reserva a partir de un subproteoma enriquecido en fosfoproteínas de semillas de *Arabidopsis*. Estos

investigadores identificaron varios sitios de fosforilación en SSPs y proteínas análogas a las mismas, determinando una mayor probabilidad de fosforilación de CK2 sobre los residuos aminoacídicos Ser y Thr mediante análisis *in silico* a partir de los datos obtenidos por MALDI-TOF MS y LC MS/MS. Por otra parte, la proteína fosfatasa ABI1 es un regulador negativo de la señalización inducida por ABA e interacciona con proteínas ligadas al sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) (Gosti *et al.* 1999; Ludwików 2015). Wan *et al.* (2007) demostraron que las cruciferinas de *A. thaliana* pueden ser una diana *in vivo* para ABI1 en el desarrollo de la semilla. Para ello emplearon mapas 2-DE acoplados a técnicas de detección inmunológicas de cruciferinas fosforiladas. Estos investigadores también encontraron que el nivel de fosforilación de las cruciferinas en residuos de Ser y Thr son diferentes al comparar semillas mutantes para ABI1 con semillas silvestres, por lo que se sugirió que la fosforilación sobre Ser y Thr está implicada en la señalización celular inducida por ABA.

1.6.3. Fosforilación de las SSPs en la germinación de la semilla

En la germinación de la semilla se han monitorizado los cambios en la cantidad de las proteínas de reserva junto con el nivel de fosforilación de las mismas utilizando mapas de referencia 2-DE (Ghelis *et al.* 2008; López-Pedrouso *et al.* 2014a; Han *et al.* 2014; Mouzo *et al.* 2018a). Ghelis *et al.* (2008) demostraron una variación del nivel de fosforilación sobre residuos aminoacídicos de Tyr en precursores de cruciferina y de algunas subunidades de esta proteína de reserva en semillas de *Arabidopsis*. Más concretamente, determinaron que su nivel de fosforilación está modulado en respuesta a la fitohormona ABA utilizando mapas 2-DE, e identificaron los residuos de Tyr fosforilados mediante la técnica *western blot*. Así, se reveló que las cruciferinas de semillas tratadas con ABA tienen un nivel de fosforilación notoriamente superior comparado con las cruciferinas de semillas control. En el caso del arroz, Han *et al.* (2014) detectaron que las proteínas de reserva de la superfamilia de las cupinas tienen su nivel de fosforilación más alto en la etapa de la germinación tardía de la semilla. Utilizando mapas 2-DE DIGE, Dong *et al.* (2015) determinaron que se incrementa el nivel de fosforilación de una SSP minoritaria, la globulina 3, en semillas de trigo en la primera fase de la germinación de la semilla. Algunas isoformas de proteínas de reserva del altramuz blanco también incrementan su nivel de fosforilación al inicio del proceso de la germinación de la semilla (Capraro *et al.* 2011). En la judía común, el análisis de los patrones de la faseolina mediante mapas 2-DE junto con el tratamiento de desfosforilación química con HF-P, reveló cambios en el estatus de fosforilación en la transición de semilla seca a semilla

germinada (López-Pedrouso *et al.* 2014a). Los cambios en la tasa de fosforilación de las proteínas son indicativos de un posible cambio funcional que afecte a su abundancia (Miernyk and Hajdúch 2011; Wu *et al.* 2011; López-Pedrouso *et al.* 2014a, Mouzo *et al.* 2018a). Un dato muy importante y relevante es el descubrimiento de que las isoformas de faseolina altamente fosforiladas son degradadas en semillas germinadas (López-Pedrouso *et al.* 2014a). Estos resultados suponen una prueba en favor de la existencia de un mecanismo de degradación dependiente de la fosforilación que desempeña un rol clave en la movilización de la faseolina. También se ha sugerido que la fosforilación puede causar cambios conformacionales en las proteínas fosforiladas (Wan *et al.* 2007), lo que podría promover su movilización en el proceso de la germinación. En líneas generales, se desconoce las rutas moleculares, los sitios de fosforilación y las quinasas/fosfatasa específicas que controlan las variaciones en el estatus de fosforilación de las SSPs. A su vez, no se conocen los mecanismos que regulan la movilización de las VSPs, como es el caso de la patatina en el tubérculo de la patata.

1.7. Ciclo biológico del tubérculo de la patata

El ciclo biológico del tubérculo se compone de las siguientes fases: tuberización, dormancia, liberación de la dormancia, brotación y desarrollo de la planta (Figura 1). El proceso de la tuberización es la formación de un tubérculo a partir de un tallo subterráneo denominado estolón (Dutt *et al.* 2017). El estolón se forma a partir de los brotes axilares situados en la base de dicho tallo en el momento que se detiene su crecimiento longitudinal y se desarrolla horizontalmente con un crecimiento diageotrópico (Vreugdenhil and Struik 1989). En un instante determinado, la punta del estolón sufre una serie de cambios metabólicos que inducen una transición de un crecimiento por extensión a un crecimiento radial iniciándose así la formación del tubérculo (Vreugdenhil and Struik 1989; Dutt *et al.* 2017). Una vez se inicia la formación del tubérculo, éste entra en lo que se conoce como fase de dormancia que se define como un impedimento temporal del crecimiento de toda estructura que contenga un meristemo (Lang *et al.* 1987). Los meristemas, son las regiones o zonas de las estructuras vegetales que presentan células con la capacidad de dividirse formando células de distintos tejidos de la planta (Bennett and Scheres 2010). Si se clasifican en función del mecanismo que produce el bloqueo del crecimiento de las estructuras que contienen meristemas, existen tres tipos de dormancia en el tubérculo: endodormancia, ecodormancia y paradormancia (Akesonova *et al.* 2013; Mani *et al.* 2014; Sonnewald and Sonnewald 2014).

En la endodormancia, o dormancia profunda, el crecimiento del meristemo se bloquea por la acción de factores fisiológicos internos como, por ejemplo, la acción de la fitohormona ABA. Por otra parte, el crecimiento se puede detener por la presencia de factores fisiológicos externos al meristemo (paradormancia), o por causa de otros factores ambientales desfavorables (ecodormancia). Estos conceptos se han explicado para la dormancia de brotes que forman tallos, pero también se utilizan para aquellos a partir de los cuales se producen tubérculos (Chao *et al.* 2007; Suttle 2007).

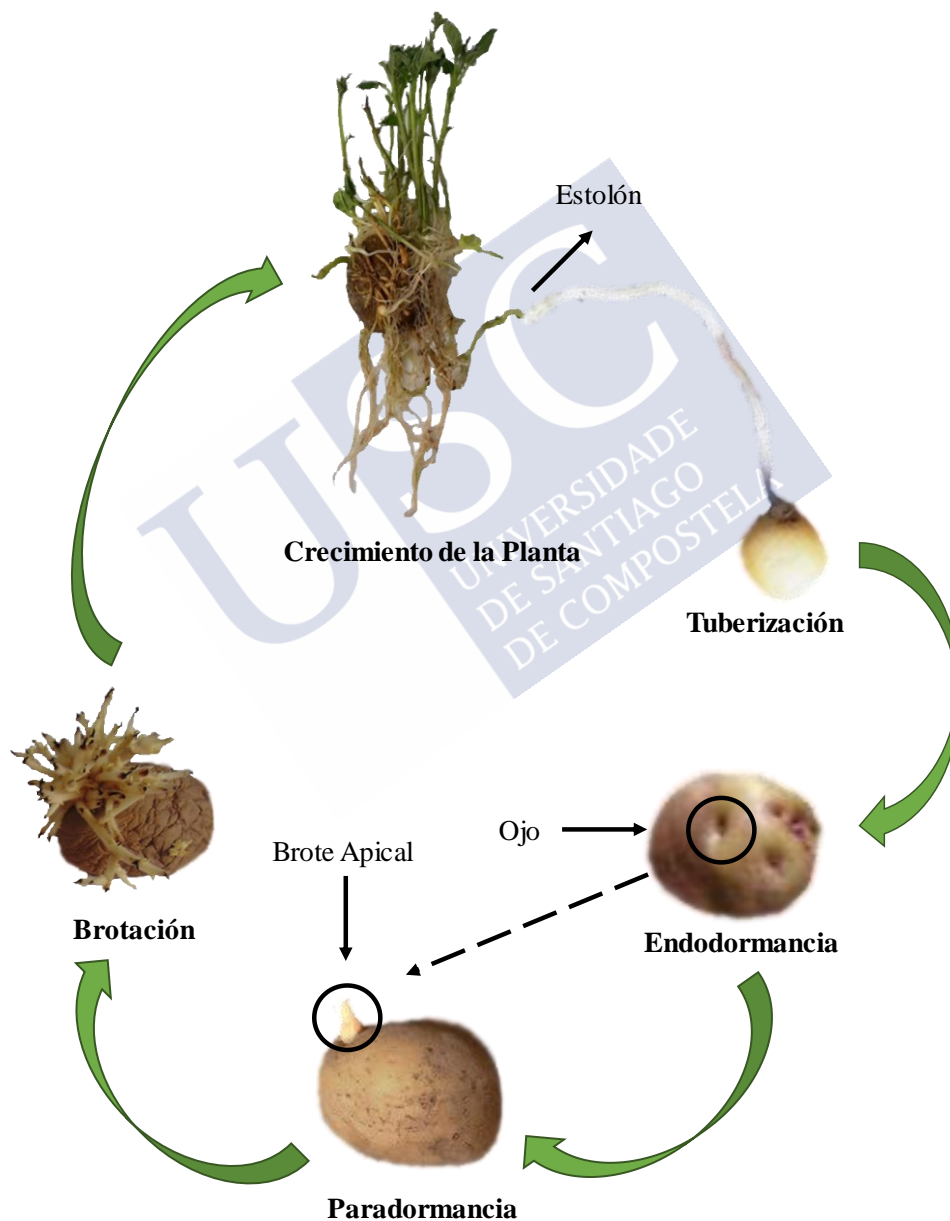


Figura 1. Diagrama esquemático de las fases del ciclo de vida del tubérculo de la patata.

Existe debate en lo referente a cuál es el punto en el que se produce el inicio de la dormancia del tubérculo. Teniendo en cuenta la definición de Lang *et al.* (1987), se puede considerar que la dormancia comienza en el inicio del proceso de tuberización. En ese momento, se impide que continúe el crecimiento del estolón que origina la formación del tubérculo. Por otra parte, existen investigadores que consideran que el inicio de la dormancia tiene lugar en los periodos tempranos del proceso de tuberización en los que se genera tubérculos jóvenes (Hemberg 1985; Claassens and Vreugdenhil 2000). Sin embargo, el criterio más aceptado es que el inicio de la dormancia profunda se produce en el instante en que el tubérculo completa su desarrollo alcanzando su tamaño final, o lo que es lo mismo, el instante en el que se cosecha (Lang *et al.* 1987; Burton 1989; Akesonova *et al.* 2013; Mani *et al.* 2014; Sonnewald and Sonnewald 2014). A diferencia de las semillas ortodoxas, los tubérculos mantienen un estado de máxima hidratación en la etapa de la endodormancia (Suttle 2007; Aksenova *et al.* 2013). A pesar de que en este punto los tubérculos son metabólicamente activos, dicha actividad se mantiene a niveles muy bajos (Macdonald and Osborne 1988; Suttle 2004). De hecho, se reduce de manera severa la tasa de respiración celular con la que se produce energía para el desarrollo del sistema biológico (Burton 1989). También se mantiene sin apenas variaciones el contenido de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos en los tejidos del tubérculo (Burton 1989). En la endodormancia del tubérculo no se desarrolla el proceso de la brotación, aunque los tubérculos estén sometidos a condiciones ambientales que puedan favorecer su inicio (Akesonova *et al.* 2013; Mani *et al.* 2014; Sonnewald and Sonnewald 2014). En las revisiones de estos investigadores se describe que los efectos fisiológicos de la endodormancia en el tubérculo se pueden mantener por exposición a condiciones ambientales desfavorables para el desarrollo de la brotación y crecimiento de las plantas jóvenes (ecodormancia). Por ejemplo, el almacenamiento de los tubérculos en cámaras con una temperatura de entre 0 y 4 °C evita que se produzca su brotación por un tiempo limitado, por lo que ese proceso no se produce en el invierno. En suma, la dormancia del tubérculo es un mecanismo de supervivencia que aumenta la probabilidad de que el desarrollo de la planta tenga lugar en un entorno favorable.

Una vez se produce la cosecha del tubérculo, el punto de escisión del estolón constituirá su meristemo apical. Este meristemo no reanudará su crecimiento hasta que se produzca la liberación de la dormancia (Peterson *et al.* 1985). Una de las principales características que define a la endodormancia es el impedimento del transporte de nutrientes

desde las células del parénquima del tubérculo hacia el meristemo apical (Viola *et al.* 2007; Sonnewald and Sonnewald 2014). Dicho transporte se realiza mediante estructuras que se conocen como conexiones simplásticas, las cuales resultan ser elementos cruciales en las interacciones que se establecen entre las células meristemáticas y los tejidos del tubérculo (Viola *et al.* 2001; Viola *et al.* 2007). En los tubérculos en estado de endodormancia se impide el transporte simplástico de metabolitos desde los tejidos del tubérculo hacia las células meristemáticas que originan los brotes (Viola *et al.* 2007; Sonnewald and Sonnewald 2014). Las células meristemáticas a partir de las cuales se producen los brotes se sitúan debajo de los que se conocen como los ojos del tubérculo, que son unas estructuras superficiales de profundidad variable (Peterson *et al.* 1985; Sonnewald and Sonnewald 2014). El transporte de nutrientes sí que se desarrolla en el momento en el que se reanuda el crecimiento activo del brote apical (Viola *et al.* 2007; Sonnewald and Sonnewald 2014). Este hecho resalta la importancia de la generación de conexiones simplásticas entre los tejidos de almacenamiento del tubérculo y las células del meristemo para el desarrollo del brote apical (Hancock *et al.* 2008). La fase de la endodormancia finaliza con la construcción de estas conexiones simplásticas que permiten el suministro de nutrientes y, en consecuencia, el meristemo apical puede iniciar su desarrollo para producir el primer brote (Viola *et al.* 2007; Sonnewald and Sonnewald 2014). En el instante en el que el brote apical se ha desarrollado con una longitud de 2 mm, se denomina rotura de brote. En adelante, se desarrolla el brote apical y se produce una nueva dormancia, conocida como dominancia apical o paradormancia, en la que se impide de manera temporal la generación de brotes laterales (Suttle 2007; Viola *et al.* 2007; Teper-Bamnolker *et al.* 2012; Akesonova *et al.* 2013; Mani *et al.* 2014; Sonnewald and Sonnewald 2014).

En lo referente a la brotación del tubérculo, el mecanismo específico que regula su bloqueo y posterior progresión no se conoce en profundidad. Una de sus características relevantes es la paralización del ciclo celular en la transición entre las fases G0 y G1 (Campbell *et al.* 1996). Al término de la fase G1, la célula ha crecido sin sintetizar la cantidad de DNA necesario para la continuación de la mitosis. En este instante se produce un punto de control clave en el desarrollo del ciclo celular entre las fases G1 y S, la fase S es la etapa en la que se sintetiza el DNA (Van't Hof 1973). Algunos de los agentes claves que participan en la regulación del bloqueo del ciclo celular en este punto temporal, y su superación, son los siguientes: dicitlinas (CYCD), ciclinas dependientes de quinasas (CDK), histonas H3 y H4, y

otras proteínas (Berckmans and de Veylder 2009). En el momento en el que se reanuda la brotación del tubérculo tras la terminación de la fase de la endodormancia, las células meristemáticas que desarrollan los brotes continúan la progresión del ciclo celular mediante la activación de los genes que regulan la replicación del DNA (Campbell *et al.* 2008; Senning *et al.* 2010; Hartmann *et al.* 2011). Al comienzo del proceso de la brotación, aparte de producirse una activación de la síntesis de ácidos nucleicos, se detecta una aceleración de la respiración celular y cambios en el proteoma (Macdonald and Osborne 1988; Desiré *et al.* 1995; Korableva and Platonova 1995; Suttle 2004; Aksenova *et al.* 2013). Aunque se produjo avances notables en la comprensión del proceso de la brotación, sigue sin conocerse en detalle las rutas de señalización celular que intervienen en la regulación de la división celular en las células de los brotes.

1.8. Movilización de la patatina en el ciclo biológico del tubérculo de la patata

El mecanismo de movilización de las VSPs es diferente en comparación con el de las SSPs (Staswick 1990; Müntz 1998; de Souza Cândido *et al.* 2011). En el caso de la patatina, Lehesranta *et al.* (2006) describieron diferencias en su abundancia en el transcurso del ciclo biológico del tubérculo. De manera más específica, determinaron que las isoformas de patatina se incrementaron en el desarrollo del tubérculo, se mantuvieron en cantidades elevadas en el inicio de la brotación y permanecieron constantes hasta que los tubérculos desarrollaron brotes de aproximadamente 20 cm de longitud. Visser *et al.* (1994) también detectaron que la patatina se acumuló desde el inicio del desarrollo de la tuberización en los estolones que se diferencian para formar un nuevo tubérculo. La acumulación de la patatina en el desarrollo del tubérculo se relacionó con un aumento en la abundancia de los inhibidores de proteasas (Lehesranta *et al.* 2006). Las variaciones observadas en la cantidad de la patatina y de los inhibidores de proteasas es consistente con los cambios detectados en la expresión de sus genes codificadores. Así, los genes que codifican la proteína patatina se activan en el proceso de la tuberización (Hendricks *et al.* 1991; Bachem *et al.* 2000; Ronning *et al.* 2003; Kloosterman *et al.* 2005; Stupar *et al.* 2006). De manera coordinada, también se incrementa la expresión génica de los inhibidores de proteasas en los estadios iniciales del desarrollo del tubérculo (Hendricks *et al.* 1991; Ronning *et al.* 2003).

Una vez se ha completado el desarrollo del tubérculo éste se encuentra en la etapa de endodormancia, que es seguida por un mecanismo de terminación de la misma (Akesonova *et al.* 2013; Mani *et al.* 2014; Sonnewald and Sonnewald 2014). En el proceso de la liberación de la dormancia del tubérculo, Campbell *et al.* (2008) hipotetizan que se genera un descenso en la expresión de los genes asociados con la tuberización, como es el caso de la patatina. De hecho, estos investigadores detectaron una menor expresión génica de la patatina en tubérculos en fase de no-dormancia comparados con tubérculos en estado de dormancia. Este hecho es indicativo de un salto en el metabolismo del tubérculo que se convierte en un tejido que sirve como fuente de recursos para el desarrollo del brote que generará una nueva planta. A su vez, los análisis de la expresión génica han demostrado que los transcritos de patatina se siguen expresando al comienzo de la brotación del tubérculo (Bachem *et al.* 2000; Ronning *et al.* 2003; Campbell *et al.* 2008). Estos estudios también sugieren que la patatina se sintetiza en el tubérculo tras la salida de la dormancia para asegurar el desarrollo y crecimiento del brote. En la brotación del tubérculo, también se detectó un incremento del catabolismo de las proteínas de reserva que supera a la síntesis de las mismas generando como balance neto una degradación (Weeda *et al.* 2010). En este sentido, se observó una activación de las proteasas que contribuyen a la movilización de las proteínas de reserva (Müntz *et al.* 2001; Schlereth *et al.* 2001). La patatina es susceptible a la acción de las proteasas del tubérculo degradadoras de residuos aminoacídicos de cisteína (Kumar *et al.* 1999). La acción de las Cys proteasas es complementaria a la de las proteasas que degradan residuos aminoacídicos de Ser que también pueden actuar en la degradación de las proteínas de reserva (Shutov and Vaintraub 1987; Dunaevsky and Belozersky 1989). Una vez el tubérculo brotado desarrolla el crecimiento de una planta joven, se produce una degradación o inactivación de los inhibidores de proteasas, lo que implica que se aumenta la actividad de las proteasas generándose así un descenso en la abundancia de la patatina en el tubérculo (Weeda *et al.* 2010). Para poder avanzar en la comprensión de cómo se regula la movilización de la patatina en el tubérculo, es necesario ahondar en el conocimiento de las PTMs presentes en sus isoformas y los cambios dinámicos que puedan sufrir.





2. OBJETIVOS



1. Obtención de un mapa de referencia 2-DE de alta resolución de la principal proteína de reserva de la patata (*Solanum tuberosum* L.), la patatina, en tubérculos en estado de rotura de brote. Para ello se empleará una combinación de las siguientes técnicas proteómicas: electroforesis bidimensional (2-DE) y espectrometría de masas (MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF MS).
2. Detectar en las isoformas de patatina de tubérculos en estado de rotura de brote la presencia de modificaciones co- y postraduccionales como son las glicosilaciones y las fosforilaciones. En el caso de la detección de glicosilaciones, se realizará un tratamiento de desglicosilación enzimática con anterioridad al desarrollo de la 2-DE. Por otra parte, para identificar la presencia de isoformas fosforiladas de patatina se teñirán los geles 2-DE con un tinte fluorescente específico de fosfoproteínas (Pro-Q DPS). A su vez, se cuantificará el estatus de fosforilación de las isoformas de patatina aplicando un tratamiento de desfosforilación química con ácido fluorhídrico piridina (HF-P) antes de la realización de la 2-DE. En esta ocasión, se teñirán los geles 2-DE con el tinte fluorescente SYPRO Ruby.
3. Dilucidar si la fosforilación tiene una función en el mecanismo de movilización de la patatina en las siguientes etapas del ciclo de vida del tubérculo: endodormancia, rotura de brote, brotación y crecimiento de la planta. Con este fin, se cuantificará el estatus de fosforilación y la abundancia relativa de la patatina presente en los tubérculos de cada una de las etapas indicadas. Así, se determinará si existe una relación entre los cambios del estatus de fosforilación de la patatina y las variaciones en su abundancia relativa comparando el conjunto de etapas del tubérculo a analizar.





3. MATERIAL Y MÉTODOS



3.1. Material biológico y preparación de muestra

Para el análisis proteómico se emplearon tubérculos de patata de la variedad cv. Kennebec cosechados en una finca experimental localizada en Xinzo de Limia (Ourense, España). Se tomaron como muestra 4 réplicas biológicas en las siguientes fases del ciclo biológico del tubérculo: endodormancia, rotura de brote, brotación y crecimiento de la planta. En la Figura 2 se muestra una representación esquemática de las etapas estudiadas en el ciclo biológico del tubérculo. Los tubérculos en estado de endodormancia se recogieron en la cosecha y se liofilizaron. Para la liofilización de las muestras se utilizó una Stoppering Tray Dryer (Labconco, Kansas City, MO, USA). Antes de su liofilización, los tubérculos en estado de rotura de brote se almacenaron durante 8 semanas en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente hasta la formación de un brote apical de 2 mm. Los tubérculos en estado de brotación se conservaron durante 14 semanas en las mismas condiciones, generándose así brotes de 5 cm. Finalmente, para la obtención de tubérculos en la etapa de crecimiento de la planta se tomaron tubérculos brotados y se dispusieron en macetas siendo enterrados en tierra fertilizada. Estos tubérculos se hidrataron con una frecuencia de riego de 3 veces por semana y se desarrollaron en una cámara climática Fitoterm 13000 E (Aralab, Río de Mouro, Portugal) con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad con una temperatura de 22°C y 18°C respectivamente. Después de dos semanas, se generaron una media de 7 tallos por tubérculo con una longitud aproximada de 12 cm cada uno. Antes de la extracción de la proteína, las muestras se trituraron con un mortero y se homogeneizaron guardándose en un congelador a -80 °C.

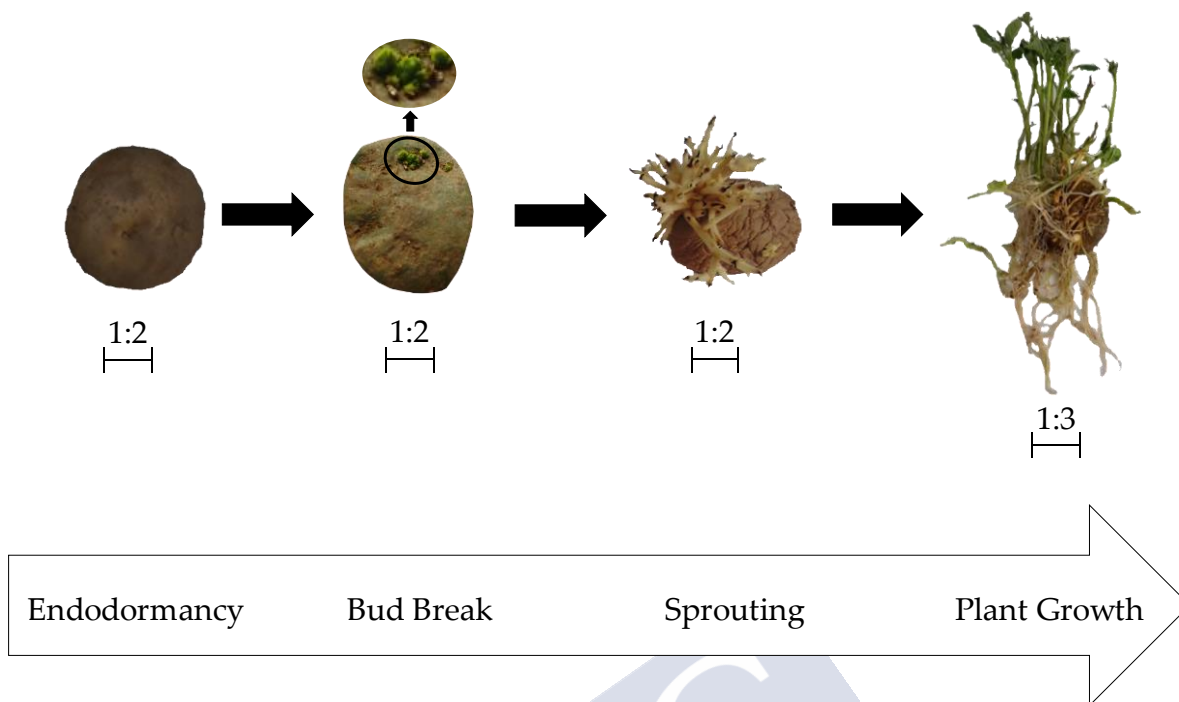


Figura 2. Diagrama esquemático de las etapas analizadas del ciclo biológico del tubérculo de patata de la variedad cv. Kennebec. Fuente: Bernal *et al.* (2019).

3.2. Extracción y cuantificación de la proteína

Las proteínas del tubérculo liofilizado se separaron del resto de componentes celulares empleando el método de extracción con fenol siguiendo los pasos descritos por Saravanan and Rose (2004). Se partió de 200 mg de muestra que se resuspendió en el búfer de extracción (DTT 2%, EDTA 50 mM, KCl 100 mM, PMSF 1 mM, sacarosa 700 mM, Tris-HCl 500 mM a pH=8,0) y se incubó durante 10 min en un baño de hielo. Se añadió fenol saturado con Tris-HCl (pH 6,6-7,9), y se incubó otros 10 min a temperatura ambiente. La fase fenólica se recuperó después de centrifugar la muestra (4.500 rpm, 4 °C, 15 min) utilizando una centrífuga Labofuge 400R (Heraeus, St Luis MO, USA). A continuación, se repitieron los pasos de resuspensión de la muestra en búfer de extracción y de adición de fenol saturado con Tris-HCl (pH 6,6-7,9) con sus correspondientes incubaciones, y se recuperó la fase fenólica tras la centrifugación. Las proteínas disueltas en la fase fenólica se precipitaron por la adición de amonioacetato 0,1 M disuelto en metanol enfriado incubándose un mínimo de 4h a -20 °C. El pellet de proteínas se lavó en 3 ocasiones con amonioacetato 0,1 M y DTT 10 mM disuelto en metanol, esta solución se enfrió a -20 °C. Tras cada lavado se recuperó el pellet de proteínas centrifugando la muestra (4.500 rpm, 4 °C, 15 min). Por último, la muestra se lavó

con una solución de acetona al 80 % y DTT 10 mM enfriada a -20 °C recuperándose la proteína por centrifugación. Finalmente, el pellet proteico se resuspendió en búfer de lisis (CHAPS 4%, DTT 10 mM, Pharmalyte™ pH 3-10 al 2%, tiourea 2 M y urea 7 M). La concentración de la proteína se determinó empleando el método de Bradford, para ello se utilizó el kit comercial CB-X (G-Biosciences, St. Louis, MO, USA) y un lector de microplacas Chromate (Awareness Technology INC., Palm City, FL, USA). Se siguió las indicaciones del fabricante para la eliminación de agentes que interfieren en la medición, y se empleó la proteína seroalbúmina bovina (BSA) para la realización de una recta de calibrado.

3.3. Electroforesis bidimensional (2-DE)

Se realizó un estudio preliminar para la optimización de los perfiles 2-DE de la patatina en las muestras de tubérculo de la variedad cv. Kennebec utilizando distintas concentraciones de proteína total cargada (75-100 µg), rangos de pH (4-7 y 4,7-5,9) en la primera dimensión, y concentraciones de acrilamida de un 10-12% en la segunda dimensión. Los perfiles 2-DE de alta resolución de las isoformas de patatina en las distintas etapas del ciclo de vida del tubérculo se obtuvieron utilizando las condiciones electroforéticas detalladas a continuación. Se partió de un extracto de proteína total del tubérculo de 75 µg disuelto en búfer de lisis y de rehidratación (azul de bromofenol 0,002%, CHAPS 4%, tiourea 2 M y urea 7 M). Se cargó el extracto proteico en unas tiras IPG (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) de 24 cm de longitud, con un gradiente lineal de pH 4,7-5,9, junto con un 0,6% de DTT y un 1% de IPG búfer (Bio-Rad Laboratories). Debido al cese de producción de tiras IPG de 24 cm con un gradiente líneas de pH 4,7-5,9, éstas se utilizaron sólo con las extracciones de proteínas de tubérculos en la etapa de rotura de brote. Para los extractos de proteína de tubérculo en el resto de las etapas del tubérculo se empleó tiras IPG de la misma longitud con un gradiente lineal de pH 4-7. El isoelectroenfoque (IEF) de la primera dimensión se desarrolló en una máquina PROTEAN IEF cell system (Bio-Rad Laboratories) después de hidratar las tiras IPG un tiempo de 12 h con un voltaje de 50 V. A continuación, se aplicó un ascenso escalonado del voltaje hasta que se alcanzó un total acumulado de 70 kVh. Después del IEF las tiras se equilibraron en dos pasos sucesivos de 15 min cada uno realizados a temperatura ambiente. Para ello se emplearon las siguientes disoluciones: disolución de equilibrado I (DTT 1%, glicerol 30%, Tris 50 mM a pH 8,8, urea 6 M y SDS 2%) y disolución de equilibrado II (glicerol 30%, iodoacetamida 4%, SDS 2%, Tris 50 mM a pH 8,8 y urea 6 M). Tras la primera dimensión, se desarrolló la segunda dimensión de la

electroforesis en geles SDS-PAGE al 10% utilizando una máquina Ettan DALTsix vertical slab gel system (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) y Tris-glicina-SDS (glicina 384 mM, SDS 0,2% y Tris 50 mM) como búfer de los electrodos. La proteína migró dentro del gel 2-DE con una corriente eléctrica constante de 16 mA por réplica a 25 °C por un tiempo de aproximadamente 15 h hasta que se dejó de apreciar el frente de azul de bromofenol. Una vez completada la segunda dimensión, se aplicaron protocolos de tinción fluorescente sobre los geles y se digitalizaron las imágenes empleando el aparato Gel Doc™ XR+ system (Bio-Rad Laboratories).

3.3.1. Protocolo de tinción Pro-Q DPS

Al comienzo de la 2-DE, se mezclaron los 75 µg de proteína del tubérculo de patata con 5 µg del marcador de fosfoproteínas y de peso molecular PeppermintStick™ (Molecular Probes). El PeppermintStick contiene tanto proteínas desfosforiladas (avidina, 18,0 kDa; β-galactosidasa, 116,25 kDa; lisozima, 14,4 kDa y BSA, 66,2 kDa) como proteínas fosforiladas (β-caseína, 23,6 kDa; y ovoalbúmina, 45,0 kDa) que constituyen respectivamente controles de fosforilación negativos y positivos. La identificación de los fosfopéptidos presentes en los geles 2-DE fue posible gracias a la tinción con un tinte fluorescente específico para fosfoproteínas, el Pro-Q Diamond phosphoprotein stain (Pro-Q DPS, Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). El protocolo de tinción se desarrolló de acuerdo con lo descrito por Agrawal and Thelen (2005) con algunas modificaciones menores (López-Pedrouso *et al.* 2014a). Después de la segunda dimensión, los geles se fijaron con ácido acético al 10% y metanol al 50% por un tiempo de 60 min. A continuación, se realizaron dos lavados de agua destilada sucesivos de 15 min cada uno, tras los cuales se incubaron los geles con el Pro-Q DPS durante 2 h. Después de la tinción se aplicó una solución de desteñido (acetonitrilo (ACN) pH 4,0 al 20% y acetato de sodio 50 mM) realizando 4 lavados de 30 min cada uno. Por último, se lavaron los geles con 2 incubaciones en agua de 5 min y se procedió a la digitalización de la imagen de los geles teñidos con Pro-Q DPS.

3.3.2. Protocolo de tinción SYPRO Ruby

Al término de la 2-DE, los geles se fijaron durante al menos 3 h con ácido acético al 10% y metanol al 40%, a continuación, se realizaron 3 lavados de 30 min con agua destilada. Los geles se incubaron toda la noche con el tinte fluorescente SYPRO Ruby (Lonza,

Rockland, ME, USA) y se terminó realizando dos lavados de 30 min con agua destilada antes de la digitalización de la imagen.

3.4. Tratamiento de desfosforilación química

El tratamiento de desfosforilación química de la proteína se realizó antes de la 2-DE empleando como agente desfosforilante el HF-P a una concentración del 70%. Para ello se siguen los pasos del protocolo desarrollado por Kuyama *et al.* (2003) y Kita *et al.* (2006) con algunas pequeñas modificaciones descritas por López-Pedrouso *et al.* (2014a). 1 mg de proteína total del tubérculo de patata se mezcló con el marcador de fosforilación ovoalbúmina de huevo del pollo y se incubó con HF-P al 70% en un baño de hielo por un tiempo de 2h. La reacción se paró neutralizando la solución con NaOH 10 M. Las sales presentes en la muestra se limpiaron por disolución en agua destilada que se eliminó por centrifugación empleando tubos de ultracentrifugación Amicon Ultra-4 centrifugal filter devices (Millipore, Billerica, MA, USA). Finalmente, la proteína se resuspendió en 300 μ L de búfer de lisis y se limpia de nuevo la proteína desfosforilada empleando el kit comercial Clean-up (GE Healthcare) de acorde con las indicaciones del fabricante. En cada réplica biológica se realizó a mayores una muestra control que reproduce el protocolo descrito sin el paso de la incubación con HF-P al 70%. Una vez se obtuvieron las muestras controles y desfosforiladas, se desarrolló la 2-DE empleando el protocolo de tinción SYPRO Ruby descrito en el subapartado anterior.

3.5. Tratamiento de desglicosilación enzimática

El tratamiento de desglicosilación enzimática de la proteína se realizó antes de la 2-DE. Para ello, se empleó la enzima péptido-N-glicosidasa F (PNGasa F, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. La PNGasa F (25 U/mL) se incubó con 75 μ g de proteína del tubérculo de patata en estado de rotura de brote por un tiempo de 2h, y se disolvió en el búfer de reacción (New England Biolabs) hasta alcanzar un volumen final de 20 μ L.

3.6. Análisis de imágenes

En las imágenes de los patrones 2-DE se midió manualmente tanto el *pI* como la M_r de los *spots* identificados como isoformas de patatina. El *pI* de los *spots* se determinó a partir de su posición en las tiras IPG una vez realizado el IEF. Y la M_r de la proteína se estimó utilizando marcadores de peso molecular (Fermentas, Ontario, Canadá) cuyo rango oscila entre 15 y 200 kDa y con el marcador ovoalbúmina presente en el Peppermint. Para el cálculo

de la *PR* por el método del HF-P, se analizaron las imágenes digitalizadas de los geles 2-DE utilizando el programa informático PDQuest Advanced software v. 8.0.1 (Bio-Rad Laboratories). En los geles 2-DE se marcaron los *spots* en cada una de las réplicas biológicas y se determinó el volumen del *spot* después de realizar una sustracción del “*background*” o ruido de fondo. A su vez, se realizó una normalización en la que se tiene en cuenta la densidad total de los *spots* validados en cada gel considerando solo a los *spots* que son reproducibles en al menos la mitad de las réplicas biológicas. Todos los análisis automáticos se han comprobado manualmente.

3.7. Digestión en gel

El procedimiento de digestión en gel con la consiguiente identificación de la proteína patatina por MS se realizó con los *spots* de los mapas de referencia 2-DE de los tubérculos en estado de endodormancia y rotura de brote. Los *spots* de interés se escindieron de los geles 2-DE y se sometieron a una digestión en gel siguiendo los pasos descritos por Jensen *et al.* (1999). Los *spots* escindidos fueron sometidos a las reacciones químicas de reducción y alquilación con una solución de DTT 10 mM disuelto en bicarbonato de amonio 50 mM, e iodoacetamida 55 mM disuelta en bicarbonato de amonio 50 mM. Se limpiaron las piezas de los geles con bicarbonato de amonio 50 mM disuelto en metanol al 50%, y se deshidrataron por adición de ACN secándose a continuación con la máquina SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). En la digestión proteolítica se incubaron, durante 16 h a 37°C, las piezas de los geles secas con una tripsina modificada del cerdo (Promega, Madison, WI, USA) que es añadida con una concentración final de 20 ng/μL disuelta en bicarbonato de amonio 20 mM. La extracción de los péptidos se realizó en 3 incubaciones, de 20 min cada una, con 40 μL de ACN al 60% en ácido fórmico al 0.5%. Los extractos de los péptidos se juntaron y se concentraron en la máquina SpeedVac guardándose finalmente en un congelador a -20°C.

3.8. Espectrometría de masas (MS)

Las muestras secadas se disolvieron en 4 μL de ácido fórmico al 0,5%. Volúmenes equivalentes (0,5 μL) de las soluciones de los péptidos y de la matriz, que consiste en 3 mg de α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA) disuelto en 1 mL de ACN al 50% y ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1%, se depositaron en una placa 384 Opti-TOF MALDI plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando el método de la capa fina. Los datos

de MS se obtuvieron mediante un análisis automático utilizando un analizador 4800 MALDI-TOF/TOF analyzer (Applied Biosystems). Los espectros de MS se adquirieron utilizando un reflector de iones en modo positivo con el aparato Nd:YAG, que realiza un promedio de 1.000 disparos con un láser que tiene una longitud de onda de 355 nm, como calibración interna se utilizó al menos 3 picos autolíticos de tripsina. Todos los espectros MS/MS se desarrollaron por selección de los picos precursores con una resolución de anchura a media altura de pico (FWHM) de 300 realizando una supresión metaestable. Los análisis automatizados de los datos de masas se obtuvieron utilizando el programa informático 4000 Series Explorer Software v. 3.5 (Applied Biosystems). La huella dactilar de la masa peptídica (PMF) y los datos de los espectros de péptidos fragmentados de cada muestra se combinaron empleando los programas GPS Explorer Software v. 3.6 y Mascot software v. 2.1 (Matrix Science, Boston, MA, USA) para realizar una búsqueda en la base de datos *S. tuberosum* UniProt/SwissProt. Se indicaron como criterios de búsqueda: una tolerancia del precursor de 50 ppm, una tolerancia del fragmento MS/MS de 0,6 Da, la carbamidometil cisteína (CAM) como modificación fija, la metionina oxidada como modificación variable y permitiendo la pérdida de un punto de rotura. Todos los espectros y todos los resultados de la base de datos se cotejaron e inspeccionaron manualmente utilizando el software indicado previamente. Las proteínas en las que se detectó al menos 2 péptidos generando un *Mascot Score* estadísticamente significativo (p -valor < 0,05) fueron seleccionadas como identificaciones positivas. Además, en los tubérculos en estado de rotura de brote se identificó a los fosfopéptidos de patatina seleccionando como modificaciones variables los residuos de: fosfoserina, fosfotirosina y fosfothreonina. Se empleó la base de datos Swiss-Prot y se utilizaron los datos de los espectros obtenidos con anterioridad. Los análisis de los sitios de fosforilación se realizaron utilizando la base de datos de proteínas fosforiladas en plantas Plant Protein Phosphorylation DataBase (P³DB) (Yao *et al.* 2012) junto con la herramienta de predicción de sitios de fosforilación Musite (Gao *et al.* 2010).

3.9. Análisis Estadístico

Para analizar el estatus de fosforilación de las isoformas de patatina en las distintas etapas del ciclo de vida del tubérculo, se calculó la *PR* en cada *spot* de los geles 2-DE de acuerdo con la fórmula descrita por López-Pedrouso *et al.* (2014a), como se describe a continuación:

$$PR = [(T - D) / T] \times 100$$

Donde T y D son los volúmenes de un *spot* determinado en geles 2-DE de muestras controles (volumen de la proteína total) y en geles 2-DE de muestras tratadas con HF-P (volumen de proteína desfosforilada) respectivamente.

En la etapa de rotura de brote de los tubérculos, se calcularon los intervalos de confianza (CIs) *bootstrap* no paramétricos para el valor promedio de la PR de cada uno de los *spots* de patatina mediante el método del percentil con corrección de sesgo (Efron 1982). Para cada set de $N (=4)$ estimaciones, se obtuvieron 2.000 muestras *bootstrap* de tamaño N con un reemplazamiento que sigue el algoritmo de Monte Carlo. Los CIs con una confianza estadística del 95 y 99% se calcularon para las medias observadas utilizando la distribución de las 2.000 réplicas *bootstrap*. El sesgo, *bias*, es la proporción de réplicas *bootstrap* de la media cuyo valor es inferior a la estima original de la media. El CI *bootstrap* con corrección de sesgo se calculó utilizando la distribución normal teórica conforme a lo descrito por Efron (1982), para ello se empleó el software DIANA (C. Zapata, no publicado). A su vez, se calculó los parámetros de estadística descriptiva, el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, así como los coeficientes de correlación no paramétricos de Spearman entre las variables: PR , V y pI . Para el desarrollo de estos cálculos se empleó el software estadístico IBM SPSS Statistics 21 (SPSS, Chicago, IL, USA). Los datos de PR se agruparon en clústeres utilizando el método del promedio no ponderado por pares de grupos (UPGMA). El dendrograma UPGMA se derivó de la matriz de pares de valores PR utilizando el programa informático NTSYSpc v. 2.1 software (Applied Biostatistics, Setauket, NY, USA).

En el conjunto de las distintas etapas del ciclo biológico del tubérculo estudiadas, se compararon las medias PR de las isoformas de patatina empleando las pruebas estadísticas ANOVA de un factor y el análisis a posteriori de Tukey-Kramer utilizando el software IBM SPSS Statistics 21. Se empleó un test de estadística paramétrica tras comprobar la normalidad de la variable PR utilizando sus valores promedio en cada uno de los *spots* de patatina, al ser el número de datos promedio inferior a 30 se empleó el test de normalidad de Shapiro-Wilk. El análisis a posteriori de Tukey-Kramer se utilizó por ser las poblaciones a comparar de distinto tamaño muestral. A su vez, se calcularon los intervalos de confianza al 95% de la media de las PR de las isoformas de patatina en cada una de las etapas del ciclo biológico del tubérculo analizadas. Por otra parte, se estudió las diferencias en PR de las isoformas de

patatina categorizándolas en dos tipos: Kuras y no-Kuras. En el caso de las isoformas de patatina de tipo Kuras no se emplearon valores promedio, aun así, se comprobó la normalidad de la variable *PR* utilizando el test de Shapiro-Wilk, y se realizaron los test ANOVA de un factor y el análisis a posteriori de Tukey Kramer. Esto mismo se realizó para el análisis de las isoformas de patatina de tipo no-Kuras con la diferencia de que en esta ocasión sí se emplearon los valores promedio de su *PR*. A mayores, se comprobó si existen diferencias estadísticamente significativas en el conjunto de etapas analizadas del ciclo biológico del tubérculo comparando las isoformas de patatina de tipo Kuras y no-Kuras empleando la prueba de rango con signo de Wilcoxon. Además, se comprobó la existencia de diferencias en el estatus de fosforilación de las isoformas de patatina en la liberación de la endodormancia del tubérculo. Para ello se agruparon los datos de la *PR* de las isoformas de patatina de los tubérculos en la etapa de rotura de brote, brotación y crecimiento de la planta en un grupo denominado etapa de no-endodormancia. La detección de diferencias en la media de la *PR* de las isoformas de patatina se realizó empleando el test t de student. Finalmente, se calculó la abundancia relativa de la patatina como la suma, en cada una de las réplicas, de los volúmenes de sus *spots* en los tubérculos de las distintas etapas analizadas del ciclo del tubérculo. A su vez, se midieron los cambios en la abundancia relativa de la patatina calculando los CIs *bootstrap* utilizando el método percentil con corrección de sesgo (Efron 1982). Los análisis *bootstrap* se realizaron con el software DIANA de acuerdo con la descripción de Franco *et al.* (2015).





4. RESULTADOS



4.1. Mapa 2-DE optimizado de las isoformas de patatina

La optimización del patrón 2-DE de la patatina se realizó estudiando tubérculos de patata de la variedad cv. Kennebec en estado de rotura de brote. Así, se lograron perfiles 2-DE de alta resolución en los que se describe a la patatina como una compleja agrupación de *spots* que muestran una notable variación en su M_r y pI (Figura 3). La mejoría en la calidad del patrón 2-DE de la patatina se logró ensayando diversas condiciones experimentales en lo que se refiere a la separación de sus isoformas en función de su pI y de su M_r . La utilización de tiras zum para la realización del IEF, empleando un rango de pI de 4,7-5,9 en vez de 4-7, permite un aumento considerable de la capacidad de distinguir la presencia de múltiples polipéptidos con un pI muy próximo, por no decir equivalente. Por otra parte, se aplicó una baja cantidad de proteína en el desarrollo de la 2-DE para mejorar la resolución de proteínas con una alta abundancia relativa aplicando. Así, se consigue mejorar de manera significativa la separación de las distintas isoformas de patatina utilizando en cada réplica biológica 75 μ g de proteína del tubérculo en vez de 400 μ g. Para optimizar dicha separación, no solo se redujo la cantidad de proteína, sino que también se varió el porcentaje de acrilamida en el gel de la segunda dimensión. Así, se utilizaron geles 2-DE con una concentración de acrilamida del 10% para favorecer la separación de las proteínas con una alta M_r . En su conjunto, las variaciones técnicas aplicadas lograron una reducción significativa de los efectos que disminuyen la definición de los *spots* como son el *streaking*, y el *background* en el gel 2-DE. El *streaking* y el *background* introducen ruido de fondo dificultando la identificación del *spot* y la cuantificación de su volumen. De este modo, se consigue mejorar la definición de los *spots* identificados como isoformas de patatina en los patrones 2-DE, lo que posibilita una descripción detallada de su perfil en términos cualitativos y cuantitativos. A nivel cualitativo, se distinguió un total de 20 *spots* que contienen isoformas de patatina que se distribuyen en 3 filas situadas en distintos niveles. Las isoformas de patatina presentan una M_r que oscila entre 40,1 y 43,0 kDa y un rango de pI que varía de 4,8 a 5,3. La singularidad del patrón de la patatina radica en su complejidad por tener duetos verticales (*spots* n^{os} 2-3, 5-6, 7-8, 15-16 y 19-20) y duetos horizontales (*spots* n^{os} 1 y 4, 9-10, 11 y 13, 17-18) que se alternan, así como *spots* que se intercalan en un nivel intermedio entre los pares de *isospots* (ej. *spot* n^o 14).

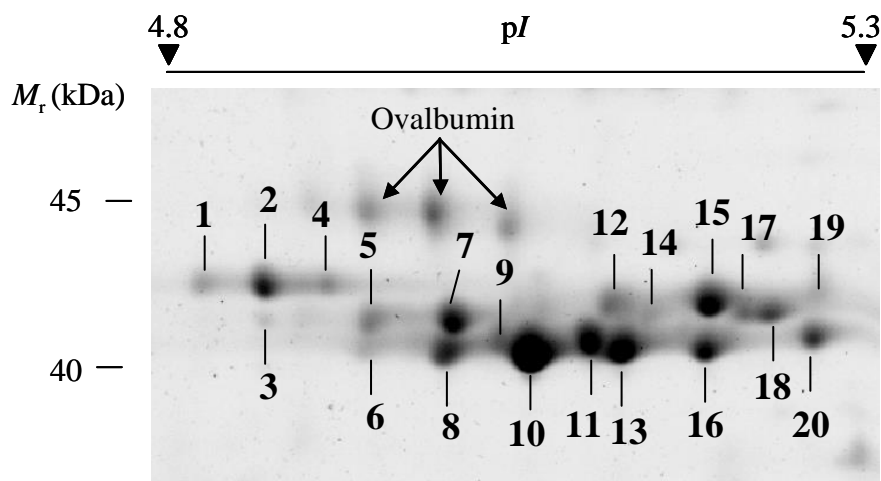


Figura 3. Mapa 2-DE de alta resolución de las isoformas de patatina en tubérculos maduros de la variedad cv. Kennebec. La imagen muestra los *spots* de patatina numerados consecutivamente en un orden de pI creciente. La 2-DE se desarrolló utilizando tiras IPG de 24 cm con un gradiente lineal de pH 4,7-5,9 en la primera dimensión, y geles de acrilamida al 10% en la SDS-PAGE. En cada gel se analizó 75 μ g de proteína y se tiñó con el tinte fluorescente SYPRO Ruby. Las flechas indican la posición de la ovoalbúmina (45,0 kDa) que es el marcador de peso molecular en el gel. La masa M_r de los *spots* se infirió a partir de la posición de la ovoalbúmina y de los marcadores estándar de peso molecular que varían de 15 a 200 kDa, y sus pIs se estimaron en función del pH lineal de la tira. Fuente: Bernal *et al.* (2017).

4.2. Identificación de las isoformas de patatina en los mapas 2-DE optimizados

Prácticamente la totalidad de los *spots* indicados en la Figura 3 se han identificado como polipéptidos de patatina. Las identificaciones se realizaron por medio de las técnicas MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF MS, los resultados se muestran en la Tabla 2. A excepción del *spot* n° 3, débilmente teñido, todos los *spots* se identificaron con un *Mascot Score* estadísticamente significativo (p -valor < 0,05) cuyo rango de valores oscila entre 60 y 550. Las técnicas de MS permiten la identificación de péptidos que forman parte de la secuencia aminoacídica de alguna proteína identificada previamente. Así, se logró identificar a los polipéptidos de los *spots* del patrón 2-DE a partir de un número variable de péptidos, entre 2 y 13, que representan un 11-58% de la secuencia aminoacídica de distintas isoformas de patatina. Los datos detallados de los péptidos identificados por MS junto con su masa molecular experimental se muestran en el Anexo I. A partir de los análisis de MS se confirmó que los *spots* numerados sólo contienen polipéptidos de patatina. Sin embargo, la mayoría de las identificaciones son ambiguas y compatibles con la presencia simultánea de distintos tipos de isoformas de patatina. De hecho, las identificaciones posibles más probables alcanzan un

número de hasta 24 isoformas de patatina distintas, cuyos nombres de acceso en la base de datos UniProt son los siguientes: PAT0, PAT03, PAT04, PAT05, PAT06, PAT07, PAT08, PAT10, PAT11, PAT12, PAT14, PAT15, PATB1, PATB2, PATD2, PATD3, PATJ1, PATM1, PATM2, PATM3, PT2K1, PT2K3, PT2K4 y PT3K1. Los *spots* n^{os} 1, 2 y 4 son los que tienen una M_r más alta dentro del patrón 2-DE y se identificaron sin ambigüedad como la isoforma de patatina de tipo Kuras PT3K1.

Tabla 2. Proteína, fosfopéptido y sitios de fosforilación en los *spots* 2-DE de patatina de tubérculos cv. Kennebec en estado de rotura de brote que se han identificado con las técnicas de espectrometría de masas MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF. Fuente: Bernal *et al.* (2017).

Spot no. ^a	Exp. pI ^b	Match./cov. (%) ^c	Mascot Score	Protein name (type ^d)	Phosphopeptides/Phosphosites
1	4.84	7/24	191	Patatin (PT3K1)	1/1
2	4.88	13/58	571	Patatin (PT3K1)	7/17
3	4.90	–	–	Unidentified	-
4	4.93	5/16	158	Patatin (PT3K1)	-
5	4.96	3/8	106	Patatin (various)	-
6	4.96	5/21	>60-187	Patatin (various)	-
7	5.02	11/40	>60-200	Patatin (various)	-
8	5.02	6/25	>60-297	Patatin (various)	-
9	5.05	7/28	>60-324	Patatin (various)	1/1
10	5.08	5/11	>60-199	Patatin (various)	1/1
11	5.12	9/32	>60-337	Patatin (various)	3/7
12	5.13	8/30	>60-298	Patatin (various)	-
13	5.14	9/31	>60-475	Patatin (various)	1/1
14	5.16	9/31	>60-267	Patatin (various)	-
15	5.20	2/11	>60-103	Patatin (various)	4/9
16	5.20	10/40	>60-440	Patatin (various)	4/10
17	5.23	5/25	>60-123	Patatin (various)	-
18	5.25	9/31	>60-259	Patatin (various)	5/9
19	5.29	3/9	>60-129	Patatin (various)	-
20	5.27	10/41	>60-550	Patatin (various)	4/8

^a Gel position of assigned spots is shown in Figure 3.

^b Experimental pI value.

^c Matched peptides and percentage of the polypeptide sequence covered by matched peptides.

^d PT3K1, abbreviation for Patatin-3-Kura 1.

4.3. Glicosilación de las isoformas de patatina en los mapas 2-DE optimizados

El mapa 2-DE de la patatina permitió, a su vez, la detección de sus isoformas glicosiladas utilizando la enzima glicosidasa PNGasa F. Esta enzima presenta la actividad de inducir una N-desglicosilación en las cadenas polipeptídicas, por tanto, la comparación del patrón 2-DE de la patatina antes y después del tratamiento con la PNGasa F permite identificar la presencia de N-glicosilaciones en sus isoformas. Así, se observó la existencia de 3 niveles de *spots* diferenciados en su M_r que se juntan, prácticamente en su totalidad, en un único nivel de *spots* con un aparente descenso en su M_r después de la incubación con PNGasa F (Figura 4). Los *spots* 12 y 15 son los únicos que no se movilizaron tras el tratamiento con la enzima PNGasa F. Tomando estos datos en su conjunto, se puede concluir que existen grados variables de glicosilación en las isoformas de patatina presente en los patrones 2-DE de los tubérculos en estado de rotura de brote. Este hecho explica que la glicosilación es uno de los principales factores que contribuyen a la heterogeneidad en la M_r de la patatina.

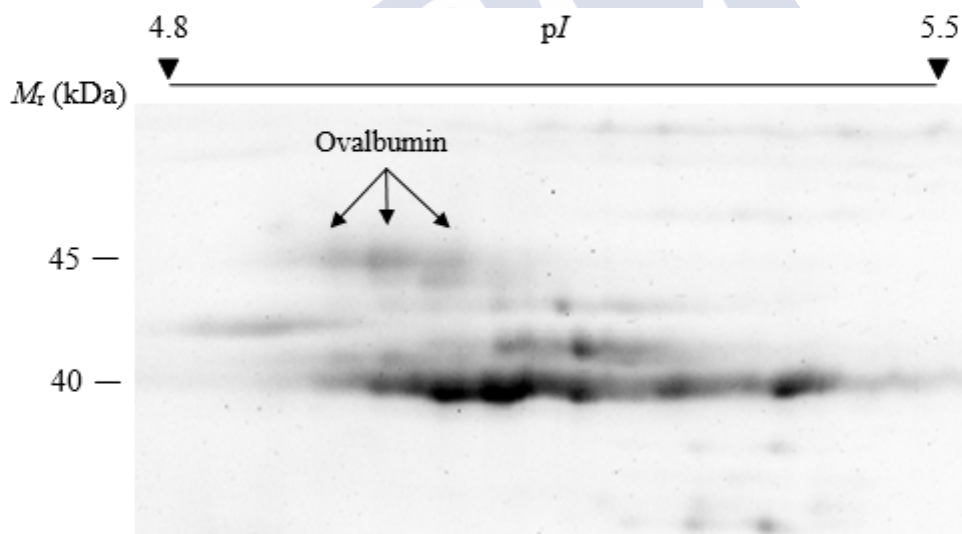


Figura 4. Perfil 2-DE de las isoformas de patatina desglicosiladas en tubérculos de patata de la variedad cv. Kennebec en estado de rotura de brote. Se aplicó un tratamiento de desglicosilación enzimática con la enzima PNGasa F antes de la realización de la 2-DE.

4.4. Identificación de las isoformas fosforiladas de la patatina en los perfiles 2-DE optimizados

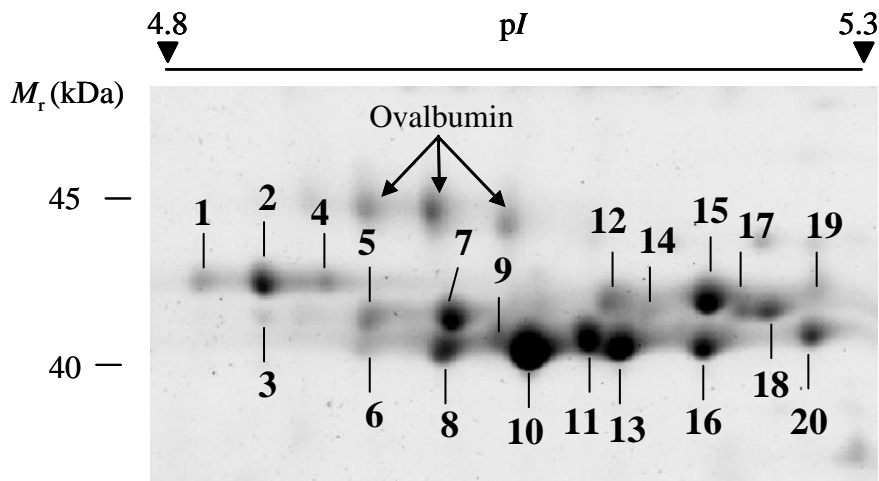
El Pro-Q DPS se utilizó para la identificación *multiplex* de las isoformas de patatina fosforiladas en los geles 2-DE. En la Figura 5 se muestran los patrones 2-DE representativos de la patatina en los tubérculos en estado de rotura de brote teñidos con los tintes fluorescentes Pro-Q DPS y SYPRO Ruby. Los 20 *spots* del patrón de referencia de la patatina muestran señales fluorescentes tras la tinción con Pro-Q DPS. Para validar si el tinte Pro-Q DPS tiñe de manera específica a las proteínas fosforiladas, se empleó el marcador estándar de fosforilación, Peppermint, con controles positivos y negativos. Empleando las condiciones experimentales apropiadas para la obtención de un mapa de la patatina mediante la técnica 2-DE, se observaron cuatro proteínas marcadoras: β -galactosidasa, BSA, ovoalbúmina y β -caseína. La β -galactosidasa y la BSA son marcadores negativos, o de ausencia de fosforilación, a diferencia de la ovoalbúmina y la β -caseína que son marcadores positivos de fosforilación. Utilizando el tinte Pro-Q DPS se detectó señal fluorescente para la ovoalbúmina y la β -caseína, pero no así para la β -galactosidasa y la BSA. Por lo que se concluye que la señal del Pro-Q DPS identifica de manera específica a las isoformas de patatina fosforiladas en sus perfiles 2-DE (Figura 5b). Resultados similares se obtuvieron en las patatinas de los tubérculos no brotados de los cultivares cvs. Agria, Amanda y Ivory Russet (datos no mostrados). Por lo tanto, podemos concluir que la fosforilación es una PTM ubicua asociada con las isoformas de patatina.

El mapeo 2-DE de las isoformas fosforiladas es más informativo que la identificación exacta de los sitios de fosforilación para la evaluación de su significado biológico. A pesar de ello, los análisis predictivos de los sitios de fosforilación suponen una evidencia adicional de si una proteína determinada presenta fosforilaciones o no. Motivo por el cual se realizó una identificación prospectiva de los fosfopéptidos y los sitios de fosforilación en las isoformas de patatina. Esto se logró por medio de su búsqueda en MASCOT utilizando los datos espectrales obtenidos por MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF MS. De esta forma, se reveló la presencia no redundante de 22 fosfopéptidos de patatina que contienen 49 sitios de fosforilación (Tabla 3). La comparación de nuestros resultados con investigaciones a gran escala en otras especies utilizando la base de datos P³DB (Yao *et al.* 2012) sugiere que la mayoría de los sitios de fosforilación se han identificado por primera vez en este estudio. Así,

RESULTADOS

no se identificaron sitios de fosforilación ortólogos equivalentes con los detectados en las plantas: *A. thaliana*, *M. truncatula*, arroz, colza, maíz y soja.

(a) 2-DE reference map of the patatin



(b) Phosphorylated patatin profile

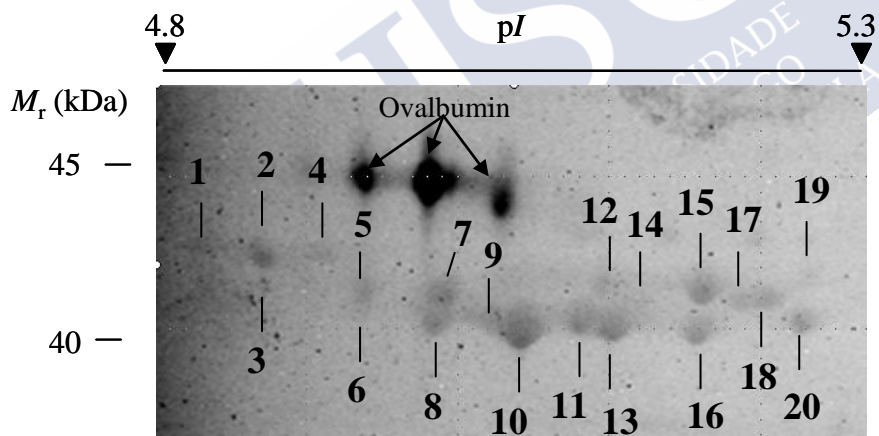


Figura 5. Mapa 2-DE de los *spots* de patatina fosforilados en tubérculos (cv. Kennebec) en estado de rotura de brote. (a) Perfil de referencia de los *spots* de patatina fosforilados en geles teñidos con el tinte fluorescente SYPRO Ruby que tiñe a las proteínas de forma inespecífica. (b) Perfil de los *spots* de patatina fosforilados obtenido en el mismo gel realizando la tinción específica de fosfoproteínas con el tinte fluorescente Pro-Q DPS. La fosfoproteína ovoalbúmina se utilizó como marcador de fiabilidad de la especificidad de la tinción con Pro-Q DPS empleando nuestras condiciones experimentales. Fuente: Bernal *et al.* (2017).

Tabla 3. Fosfopéptidos no redundantes y sitios de fosforilación de la patatina en tubérculos de patata (cv. Kennebec) en estado de rotura de brote identificados mediante los programas MASCOT y Musite a partir de los datos de espectrometría de masas (MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF MS).

Spot no. ^a	Patatin name	Phosphopeptides and phosphosites ^b
1	PT3K1	<u>T</u> PELDAK
2	PT3K1	VQENPL <u>TGT</u> *TTK MLLL <u>S</u> LGTGT*TSEFDK <u>S</u> VSEDNHETYEVALK WGILQWMSPLWEMR MILAT <u>T</u> SSTFASLEEMVTVLSIDGGGIK MYDICYSTAAAPTFFPPHYFAT <u>N</u> T <u>S</u> NGDK
2,11	PT3K1, Patatin mix	MYDICYSAAPTYFPPHYFAT <u>N</u> T <u>I</u> NGDK
9	Patatin mix	<u>S</u> FLILFFMILATTSSTCAK
10, 13,15,16,20	Patatin mix	<u>T</u> YTAEEAAK
11	Patatin mix	VHQAL <u>T</u> EVAI <u>S</u> SFDIK <u>S</u> FLIL <u>S</u> VMILAT <u>T</u> SSTFASLEEMVTVLSIDGGGIK
15	Patatin mix	LEEMV <u>T</u> VLSIDGGGIK MYDICY <u>S</u> TAAAPIYFPPHVFVTHTSNGAR
15,16	Patatin mix	VQENAL <u>TGT</u> * <u>T</u> TEMDDASEANMELLVQVGETLLK
16,18,20	Patatin mix	<u>S</u> LDYK
16,20	Patatin mix	WMLAIQQMT <u>N</u> A <u>A</u> SSYMTDYYISTVFQAR
18	Patatin mix	<u>S</u> LNYK <u>T</u> HT <u>A</u> E <u>E</u> TAK D <u>S</u> PETYEEALK VQENAL <u>TGT</u> * <u>T</u> TK
20	Patatin mix	MAT <u>T</u> TK

^a Spot code numbers according to Figure 3.

^b Phosphorylation sites identified by MASCOT search are underlined. Putative phosphorylation sited using the Musite program are indicated by an asterisk.

4.5. Cuantificación de la fosforilación de las isoformas de patatina en los perfiles 2-DE optimizados

El cambio en el estatus de fosforilación de las isoformas de patatina se estimó cuantificando las variaciones detectadas en su patrón 2-DE tras el tratamiento de desfosforilación química con HF-P. En la Figura 6 se muestra una imagen representativa del patrón de la patatina en geles 2-DE obtenidas antes y después del tratamiento con HF-P. Nótese que la totalidad de los *spots* del marcador proteico de fosforilación, ovoalbúmina, experimentaron un salto básico en su *pI* después del tratamiento con HF-P, lo que indica que el HF-P tuvo tiempo suficiente para la realización de una completa desfosforilación de los polipéptidos de patatina. Con respecto a los perfiles 2-DE de la patatina desfosforilada, podemos resaltar dos observaciones importantes. La primera, es que todos los *spots* de patatina de las muestras controles permanecen después de la desfosforilación con una aparente disminución en su volumen. De lo que se infiere que no todos los polipéptidos de patatina presentes en el patrón 2-DE tienen péptidos fosforilados, sino que los *spots* de patatina contienen una mezcla de péptidos fosforilados y no fosforilados. En segundo lugar, el rango de *pI* en el que se localizan las isoformas de patatina aumenta de 4,8-5,3 a 4,8-5,5 en los patrones 2-DE desfosforilados con HF-P. Este hecho se puede explicar por la aparición de hasta 7 *spots* nuevos (n^{os} 21-27) en los perfiles de patatina desfosforilada apareciendo en posiciones relativas más básicas dentro de los geles 2-DE. Dichos *spots* nuevos se observaron en regiones de *pI* más bien básico (*spots* n^{os} 24-27), que intermedio (*spots* n^{os} 22, 23) o ácido (*spot* n^o 21). Los análisis de MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF MS confirmaron que estos *spots* nuevos contienen patatina (datos no mostrados), y por lo tanto son isoformas en las que se produjo un salto básico en su *pI* después del tratamiento de desfosforilación química con HF-P.

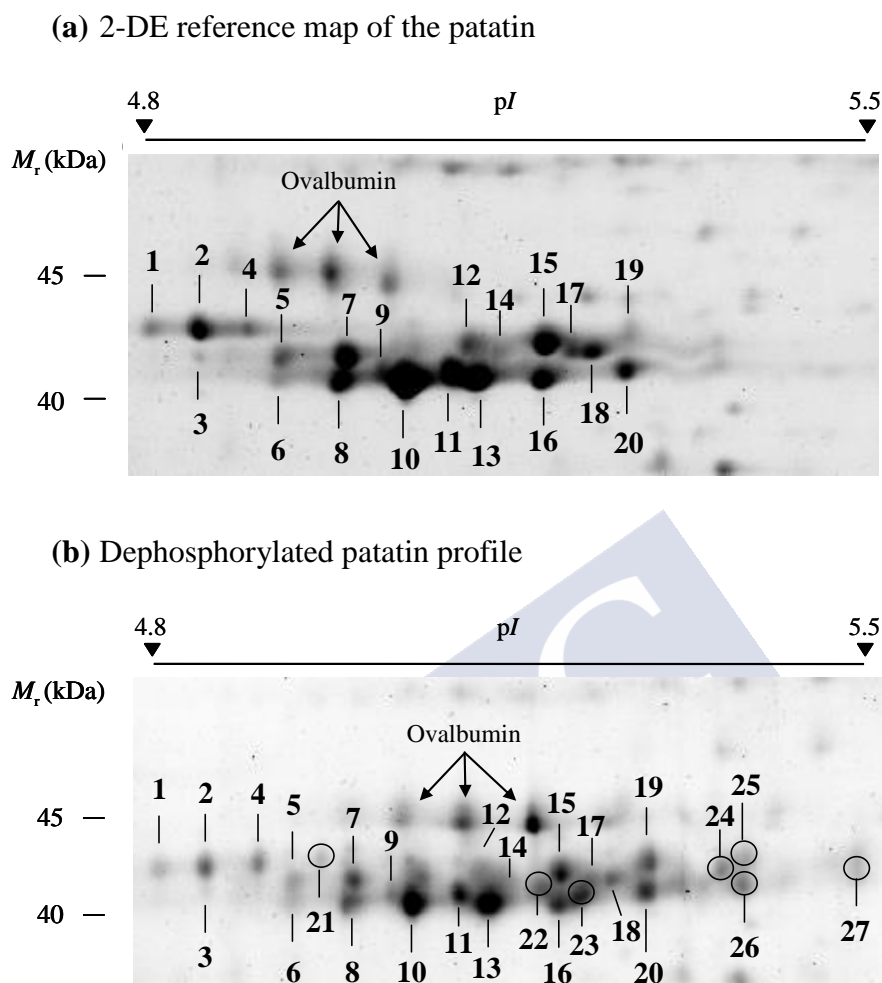


Figura 6. Perfil 2-DE de la patatina desfosforilada con HF-P en tubérculos (cv. Kennebec) en estado de rotura de brote. (a) Perfil de referencia de la patatina sin el tratamiento de desfosforilación química en geles teñidos con SYPRO Ruby. (b) Perfil de la patatina después de la desfosforilación química con HF-P en geles teñidos con SYPRO Ruby. Los círculos cerrados indican la aparición de *spots* nuevos en el gel obtenido tras la desfosforilación química en comparación con el perfil de referencia. La identificación de los *spots* nuevos como isoformas de patatina se realizó con las técnicas MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF MS. Fuente: Bernal *et al.* (2017).

El estatus de fosforilación en cada *spot* de patatina se evaluó con la medida *PR*, utilizando los volúmenes 2-DE obtenidos en el programa informático PDQuest a partir de los mapas de referencia y los perfiles desfosforilados. En la Tabla 4 se muestran: los valores de la media (\pm SE, error estándar) de la *PR* de cada *spot*, los CIs *bootstrap* de la *PR* calculados con una confianza estadística del 95 y 99%, los valores promedios de los volúmenes de los *spots* y sus *pIs*. No se cuantificó la *PR* del *spot* n° 19 por presentar un volumen por debajo del límite de detección, de manera que al aplicar la sustracción de *background* con el PDQuest no se podía calcular de manera fiable. Teniendo en cuenta la totalidad del resto de *spots*, se resuelve que los valores medios de *PR* de las isoformas de patatina tienen un rango de 4,6-52,3% y un promedio (\pm SE) de $34,4 \pm 2,8\%$. En el análisis minucioso de las diferencias en *PR* entre las distintas isoformas de patatina, resulta interesante el hecho de que los *spots* no están fosforilados de manera uniforme. Los CI *bootstrap* al 95 y 99% revelan diferencias estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre muchos pares de *spots*. En consecuencia, los *spots* de patatina se agruparon en función de su valor *PR* utilizando un dendrograma UPGMA. El dendrograma resultante muestra que las isoformas de patatina se pueden clasificar en tres agrupaciones con diferencias estadísticamente significativas en su *PR* (p -valor $< 0,01$) como muestran sus CIs *bootstrap* al 99% (Figura 7). En particular, los *spots* (n°s 13 y 20) del tercer grupo formaron un clúster (*PR* media = 8,3%) bien separado de los otros dos grupos restantes con una *PR* media de 44,0 y 30,1% respectivamente.

Tabla 4. Valores promedio (\pm SE) de la *PR* y CIs *bootstrap* de los *spots* de patatina estimados a partir de las 4 réplicas biológicas de tubérculos en estado de rotura de brote de la variedad cv. Kennebec. Fuente: Bernal *et al.* (2017).

Spot No. ^a	pI	Mean (\pm SE) <i>PR</i>	$P(\hat{\theta}_B \leq \hat{\theta})^b$	95% bootstrap CI (CL, CU) ^c	99% bootstrap CI (CL, CU) ^c
1	4.84	39.75 \pm 2.53	0.53	35.6, 44.1	34.6, 44.3
2	4.88	41.21 \pm 6.07	0.57	31.9, 52.9	30.1, 54.5
3	4.90	43.05 \pm 2.88	0.55	37.5, 47.9	37.4, 49.3
4	4.93	28.11 \pm 4.35	0.76	23.8, 32.5	23.8, 32.5
5	4.96	42.83 \pm 2.02	0.56	40.1, 46.9	39.4, 48.3
6	4.96	52.34 \pm 4.10	0.57	46.4, 60.4	44.5, 61.8
7	5.02	39.01 \pm 4.11	0.51	32.4, 45.6	30.4, 45.7
8	5.02	27.19 \pm 5.61	0.52	16.9, 35.0	15.3, 35.0
9	5.05	32.48 \pm 3.30	0.51	26.7, 37.3	22.9, 38.0
10	5.12	30.48 \pm 4.72	0.57	23.3, 40.2	22.6, 42.4
11	5.12	25.13 \pm 4.31	0.57	18.8, 33.1	16.6, 34.1
12	5.13	51.39 \pm 5.52	0.55	41.2, 60.6	40.0, 62.1
13	5.14	4.60 \pm 2.04	0.75	2.6, 6.6	2.6, 6.6
14	5.16	44.34 \pm 9.37	0.52	25.7, 57.3	25.0, 59.0
15	5.20	41.87 \pm 3.80	0.52	35.7, 49.3	34.7, 51.2
16	5.20	26.99 \pm 8.37	0.58	18.1, 37.0	10.4, 37.0
17	5.23	35.96 \pm 2.42	0.53	32.9, 40.9	32.2, 42.8
18	5.25	34.16 \pm 4.09	0.53	26.2, 39.6	25.6, 40.0
19	5.29	N/A ^d	N/A	N/A	N/A
20	5.27	11.95 \pm 4.63	0.55	6.8, 20.9	5.6, 20.9

^a Gel position of assigned spots is shown in Figure 3.

^b The bootstrap distribution is median biased if the probability (P) of $\hat{\theta}_B \leq \hat{\theta} \neq 0,05$, which was calculated from 2.000 bootstrap replicate; the symbols are the bootstrap mean and the sample mean estimates, respectively.

^c CI – Confidence interval; CL – lower bound; CU – upper bound.

^d N/A = not available, weekly stained spot with a volume below the limit of detection.

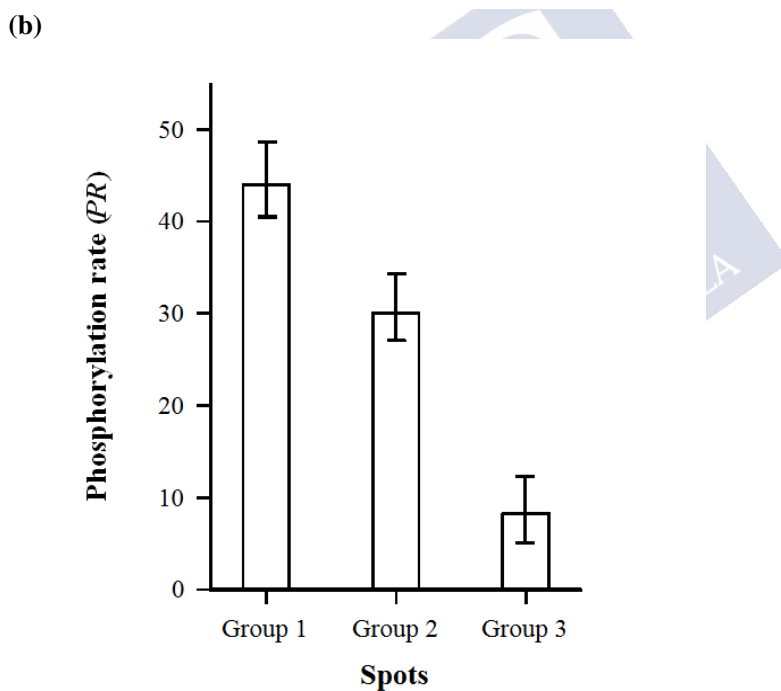
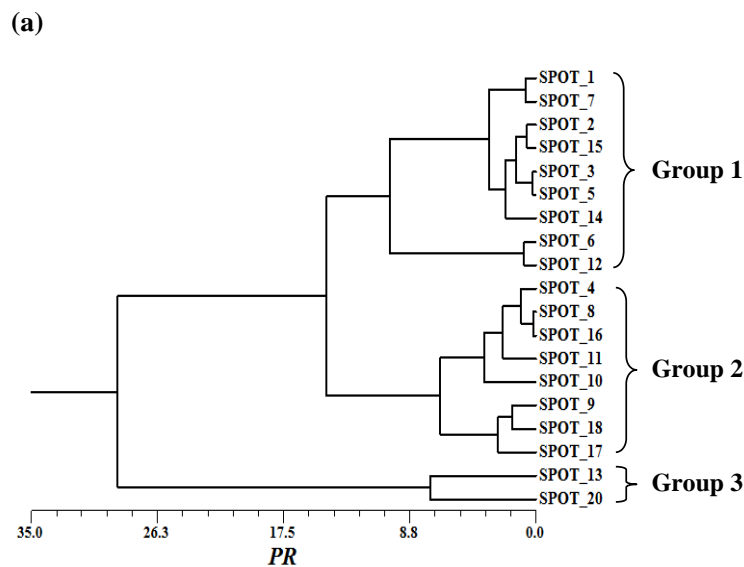


Figura 7. Evaluación de la *PR* diferencial de los *spots* de patatina (tubérculos en estado de rotura de brote). (a) Dendrograma UPGMA obtenido a partir de la matriz de diferencia de medias en *PR* entre los pares de *spots* de patatina. La numeración de los *spots* se corresponde con lo indicado en la Figura 3. (b) Valores promedio de la *PR* de cada uno de los tres grupos principales de *spots* observados en el análisis UPGMA. Se realizó un remuestreo *bootstrap* (2000 réplicas) para determinar los CIs al 99% de la media de los valores *PR* de cada grupo. Los valores *PR* de cada *spot* se calcularon utilizando la fórmula $PR = [(T - D)/T] \times 100$, donde T y D representan el volumen del *spot* en los perfiles de patatina de referencia y perfiles de patatina desfosforilada respectivamente. Los volúmenes de los *spots* en las 4 réplicas biológicas se determinaron empleando el software PDQuest. Fuente: Bernal *et al.* (2017).

Para el cálculo de las correlaciones entre las variables *PR*, *pI* y volumen se consideró los valores de los *spots* de patatina cuyo cálculo fue posible en más de un 50% de las réplicas biológicas, por este motivo, se descartaron los valores de los *spots* n^{os} 4 y 13. En dichos *spots* hubo dos réplicas en las que no fue posible el cálculo de su *PR* debido a la presencia de un mayor volumen en la muestra desfosforilada que en la muestra control. Este resultado carece de sentido biológico y se debe a la suma de los péptidos que no están fosforilados con los péptidos desfosforilados que tenían previamente un *pI* menos elevado. Utilizando los datos mostrados en el Anexo II, se determinó por medio del test de Shapiro-Wilk que las distribuciones de los datos de las variables volumen y *pI* de los polipéptidos de patatina no se ajustan a una distribución normal gaussiana. Por consiguiente, para el establecimiento de relaciones entre las variables estimadas se empleó el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman (*rs*). Así, se detectó una relación negativa estadísticamente significativa entre los volúmenes de los *spots* de patatina y su correspondiente valor de *PR* ($rs = -0,42$, $p\text{-valor} < 0,01$, $n = 70$). Esto implica que con un incremento en la abundancia de los péptidos fosforilados no se va a producir necesariamente un aumento en su estatus de fosforilación. Por lo tanto, los cambios dinámicos en el estatus de fosforilación de las proteínas deben ser explicados por otro factor que no sea el cambio en su abundancia proteica. En este sentido, se detectó una correlación negativa estadísticamente significativa entre las variables *PR* y *pI* de los *spots* de patatina ($rs = -0,31$, $p\text{-valor} < 0,01$, $n = 70$). Como se espera si se cumple la hipótesis de la fosforilación diferencial, las isoformas de patatina más fosforiladas tienen un menor *pI* y se localizan en posiciones más acídicas en el gel 2-DE. Además, cabe destacar que los niveles de fosforilación se calcularon utilizando la medida del *PR*, la cual tiene en cuenta la cantidad de proteína total presente en cada *spot*. De este modo, la estimación del estatus de fosforilación de las isoformas de patatina obvia la posibilidad de que el cambio en *PR* se produzca por una mayor o menor abundancia de la misma. Tomando estos datos en su conjunto, se puede concluir que la fosforilación diferencial en las isoformas de patatina parece ser genuina y no puede ser explicada sólo por cambios en la abundancia de las proteínas. Como se explica en subapartados posteriores, la identificación y el mapeo de las isoformas fosforiladas de la patatina supone un avance que nos permite profundizar en el conocimiento del mecanismo de movilización de esta VSP en el proceso de la brotación del tubérculo.

4.6. Perfil 2-DE de las isoformas de patatina en el ciclo de vida del tubérculo

Los patrones 2-DE de alta resolución de la patatina se obtuvieron no solo en tubérculos en estado de rotura de brote, sino también en tubérculos en las etapas de: endodormancia, brotación, y crecimiento de la planta (Figura 8a). Para la obtención de patrones 2-DE de las isoformas de patatina se emplearon tiras de *pI* 4-7 en vez de 4,7-5,9 teniendo en cuenta que no se produjo variaciones notables en sus patrones de referencia. De esta forma se distinguió un rango de 17-20 *spots* de patatina en el conjunto de etapas del ciclo biológico del tubérculo analizadas. Las isoformas de patatina se localizan en una zona del gel 2-DE que contiene *spots* con una M_r que varía de 40,0 a 45,0 kDa y con un *pI* que oscila entre 4,8 y 5,4. Al igual que en los patrones 2-DE de patatina obtenidos en tubérculos en estado de rotura de brote, sus isoformas se distribuyen en duetos de *spots* horizontales y verticales alternándose entre sí en un total de 3 niveles con distinto M_r . La 2-DE muestra cambios cualitativos y cuantitativos entre isoformas de patatina, no solo por la presencia o ausencia de *spots*, sino también por diferencias en el volumen relativo de los mismos (Tabla 5). Centrándonos en los cambios cualitativos de los patrones 2-DE, la variación más destacable es la ausencia de los *spots* n^{os} 1, 3 y 4 en los tubérculos en etapa de endodormancia en comparación con los tubérculos en estado de rotura de brote (Figura 8a). Los *spots* n^{os} 1 y 4, identificados como isoformas de patatina de tipo Kuras PT3K1, se localizan en una posición más ácida con respecto a las isoformas de patatina de tipo no-Kuras. Considerando la correlación negativa que hallamos entre el *pI* y la *PR* de las isoformas de patatina en los tubérculos en estado de rotura de brote, podríamos afirmar que en la salida de la endodormancia del tubérculo se acumulan las isoformas de patatina aparentemente más fosforiladas.

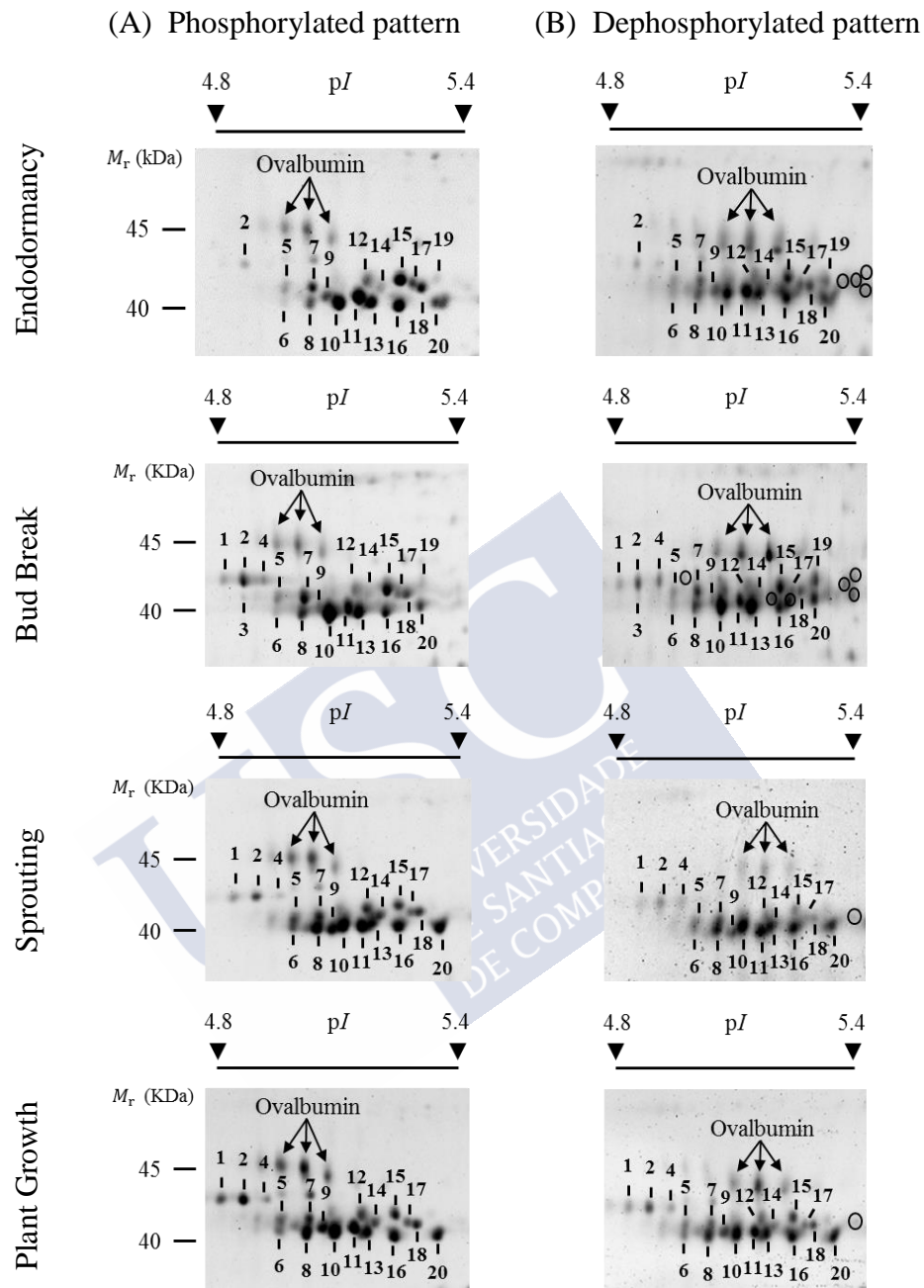


Figura 8. Perfiles 2-DE de alta resolución de la patatina en las siguientes etapas del ciclo de vida del tubérculo (cv. Kennebec): endodormancia, rotura de brote, brotación y crecimiento de la planta. En cada una de las etapas se analizaron 4 réplicas biológicas empleando la 2-DE con las condiciones experimentales descritas en la sección de material y métodos. (A) Perfiles 2-DE de la patatina sin desfosforilar teñidos con SYPRO Ruby. (B) Perfiles de la patatina desfosforilada con HF-P y teñidos con SYPRO Ruby. Los círculos indican la aparición de *spots* nuevos de patatina en los perfiles desfosforilados. Como marcador de fosforilación se empleó a la ovoalbúmina (45 kDa), la cual se desfosforiló por completo en los geles de los perfiles de patatina desfosforilada. Fuente: Bernal *et al.* (2019).

Tabla 5. Valores promedio (\pm SE) de los volúmenes de los *spots* identificados como patatina en las siguientes etapas del ciclo biológico del tubérculo de la patata (cv. Kennebec): endodormancia, rotura de brote, brotación y crecimiento de la planta. Fuente: Bernal *et al.* (2019).

Spot No. ^a	pI	Volume				Mean (\pm SE)
		Endodormancy	Bud Break	Sprouting	Plant Growth	
1	4.84	N/A ^b	12,050 \pm 1,142	15,723 \pm 1,026	14,181 \pm 1,548	13,985 \pm 1,065
2	4.88	10,732 \pm 3,108	41,867 \pm 6,605	52,352 \pm 4,589	43,124 \pm 9,139	37,019 \pm 9,069
3	4.90	N/A ^b	6,562 \pm 621	N/A ^b	N/A ^b	6,562
4	4.93	N/A ^b	14,580 \pm 2,165	16,359 \pm 3,352	12,041 \pm 1,532	14,327 \pm 1,253
5	4.96	16,567 \pm 2,399	20,124 \pm 884	47,632 \pm 4,740	28,141 \pm 4,706	28,117 \pm 6,941
6	4.96	4,367 \pm 1,078	11,115 \pm 2,623	23,960 \pm 2,472	15,874 \pm 1,290	13,829 \pm 4,120
7	5.02	25,718 \pm 1,864	49,656 \pm 8,585	57,000 \pm 5,878	44,531 \pm 4,391	44,226 \pm 6,679
8	5.02	29,058 \pm 3,399	41,209 \pm 6,638	84,447 \pm 27,174	74,025 \pm 7,132	57,185 \pm 13,144
9	5.05	38,651 \pm 3,841	42,687 \pm 7,477	81,641 \pm 12,434	48,856 \pm 8,811	52,959 \pm 9,788
10	5.12	127,074 \pm 12,545	212,111 \pm 28,417	194,709 \pm 20,987	203,463 \pm 21,496	184,339 \pm 19,416
11	5.12	184,421 \pm 10,173	191,235 \pm 30,176	212,584 \pm 14,805	149,824 \pm 18,564	184,516 \pm 13,027
12	5.13	29,886 \pm 1,647	40,287 \pm 9,062	53,083 \pm 9,119	57,128 \pm 8,961	45,096 \pm 6,212
13	5.14	56,120 \pm 8,600	130,622 \pm 24,500	71,544 \pm 11,279	73,049 \pm 8,274	82,834 \pm 16,382
14	5.16	15,477 \pm 2,289	13,087 \pm 3,074	45,092 \pm 5,892	30,191 \pm 6,300	25,962 \pm 7,414
15	5.20	88,487 \pm 3,452	141,180 \pm 22,364	98,921 \pm 8,566	67,200 \pm 10,762	98,947 \pm 15,548
16	5.20	76,364 \pm 12,313	99,953 \pm 15,356	146,326 \pm 22,966	90,283 \pm 8,177	103,231 \pm 15,159
17	5.23	22,560 \pm 3,018	25,589 \pm 3,888	32,293 \pm 4,031	29,025 \pm 6,539	27,367 \pm 2,107
18	5.25	47,433 \pm 5,222	33,075 \pm 5,073	45,834 \pm 5,890	47,751 \pm 6,288	43,523 \pm 3,508
19	5.29	6,778 \pm 1,033	19,938 \pm 4,147	N/A ^b	N/A ^b	13,858 \pm 6,580
20	5.27	17,078 \pm 1,023	74,519 \pm 12,005	108,063 \pm 11,664	72,308 \pm 8,002	67,992 \pm 18,840

^a Gel position of assigned spots is shown in Figure 8. ^b N/A = not accessible, spot signal of volume under the limit of detection.

4.7. Identificación de las isoformas fosforiladas de la patatina en perfiles 2-DE de tubérculos en estado de endodormancia

Los péptidos de los *spots* presentes en los tubérculos en estado de endodormancia se identificaron como isoformas de patatina utilizando las técnicas MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF MS. Las identificaciones se muestran en la Tabla 6, la numeración se asignó de acuerdo con los patrones 2-DE de la patatina obtenidos en los tubérculos en estado de rotura de brote. Los *spots* (n^{os} 6 y 19) débilmente teñidos no se pudieron identificar, y la única isoforma de patatina que se identificó sin ambigüedad es la Kuras PT3K1 (*spot* n^o 2). Todas las identificaciones se realizaron con un *Mascot Score* estadísticamente significativo (p-valor < 0,05) con un rango de valores que oscila entre 106 y 571. Esto se logró mediante la identificación de un número de péptidos que varía de 3 a 13 y representan un 8-58% de la secuencia aminoacídica de las isoformas de patatina identificadas. Por medio de los análisis de MS se corrobora la existencia exclusiva de isoformas de patatina en los *spots* numerados de los perfiles 2-DE (Figura 8). En total, hay 26 posibles identificaciones de isoformas de patatina con los siguientes nombres abreviados en la base de datos UniProt: PAT01, PAT02, PAT03, PAT04, PAT05, PAT06, PAT07, PAT10, PAT11, PAT12, PAT13, PAT14, PAT15, PAT16, PATA2, PATA3, PATB1, PATB2, PATJ1, PATM1, PATM2, PATM3, PT1K2, PT2K1, PT2K3 y PT3K1 (Anexo III). La equivalencia en la identificación de *spots* en las etapas de la endodormancia y de la rotura de brote permite asumir que los tubérculos en estado de brotación y crecimiento de la planta también contienen isoformas de patatina. En su conjunto, la patatina se puede clasificar en isoformas PT3K1 identificadas sin ambigüedad (*spots* n^o 1, 2 y 4) e isoformas con identificaciones ambiguas (*spots* n^o 3 y 5-20). En el presente trabajo de investigación, se denominan respectivamente como isoformas de patatina de tipo Kuras e isoformas de patatina de tipo no-Kuras.

RESULTADOS

Tabla 6. Isoformas de patatina identificadas en los *spots* 2-DE de los perfiles de tubérculos de patata (cv. Kennebec) en estado de endodormancia por medio de las técnicas de espectrometría de masas MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF. Fuente: Bernal *et al.* (2019).

Spot No. ^a	pI ^b	Patatin name (Abbrev.)	Mascot Score	Sequence Coverage (%)	Matched peptides
2	4.88	Patatin-3-Kuras 1 (PT3K1)	571	58	13
5	4.96	Other isoforms	106	8	3
6	4.96	–	–	–	–
7	5.02	Other isoforms	200	40	11
8	5.02	Other isoforms	299	25	6
9	5.05	Other isoforms	324	28	7
10	5.08	Other isoforms	135	28	10
11	5.12	Other isoforms	337	32	9
12	5.13	Other isoforms	127	19	10
13	5.14	Other isoforms	178	26	10
14	5.16	Other isoforms	267	31	9
15	5.20	Other isoforms	146	17	7
16	5.20	Other isoforms	294	27	12
17	5.23	Other isoforms	181	20	8
18	5.25	Other isoforms	251	34	13
19	5.29	–	–	–	–
20	5.27	Other isoforms	215	27	10

^a Gel spot position is shown in Figure 8. ^b Experimental pI value.

4.8. Fosforilación de las isoformas de patatina en el ciclo de vida del tubérculo

La tinción Pro-Q DPS se empleó para la detección de la presencia de isoformas de patatina fosforiladas en los patrones 2-DE de las distintas etapas analizadas del ciclo de vida del tubérculo. En la Figura 9 se representan los perfiles típicos de la patatina, teñidos con los tintes fluorescentes SYPRO Ruby y Pro-Q DPS, en los tubérculos en estado de: endodormancia, rotura de brote, brotación y crecimiento de la planta. La totalidad de los *spots* identificados como isoformas de patatina presentan señal fluorescente al teñirse con Pro-Q DPS. Este hecho indica que el conjunto de las isoformas de patatina tienen polipéptidos fosforilados en todas las etapas del ciclo biológico del tubérculo que se han estudiado. La tinción específica de las fosfoproteínas en los geles 2-DE se corrobora por la detección de señal fluorescente únicamente en los marcadores de fosforilación positiva del Peppermint, ovoalbúmina y β -caseína.

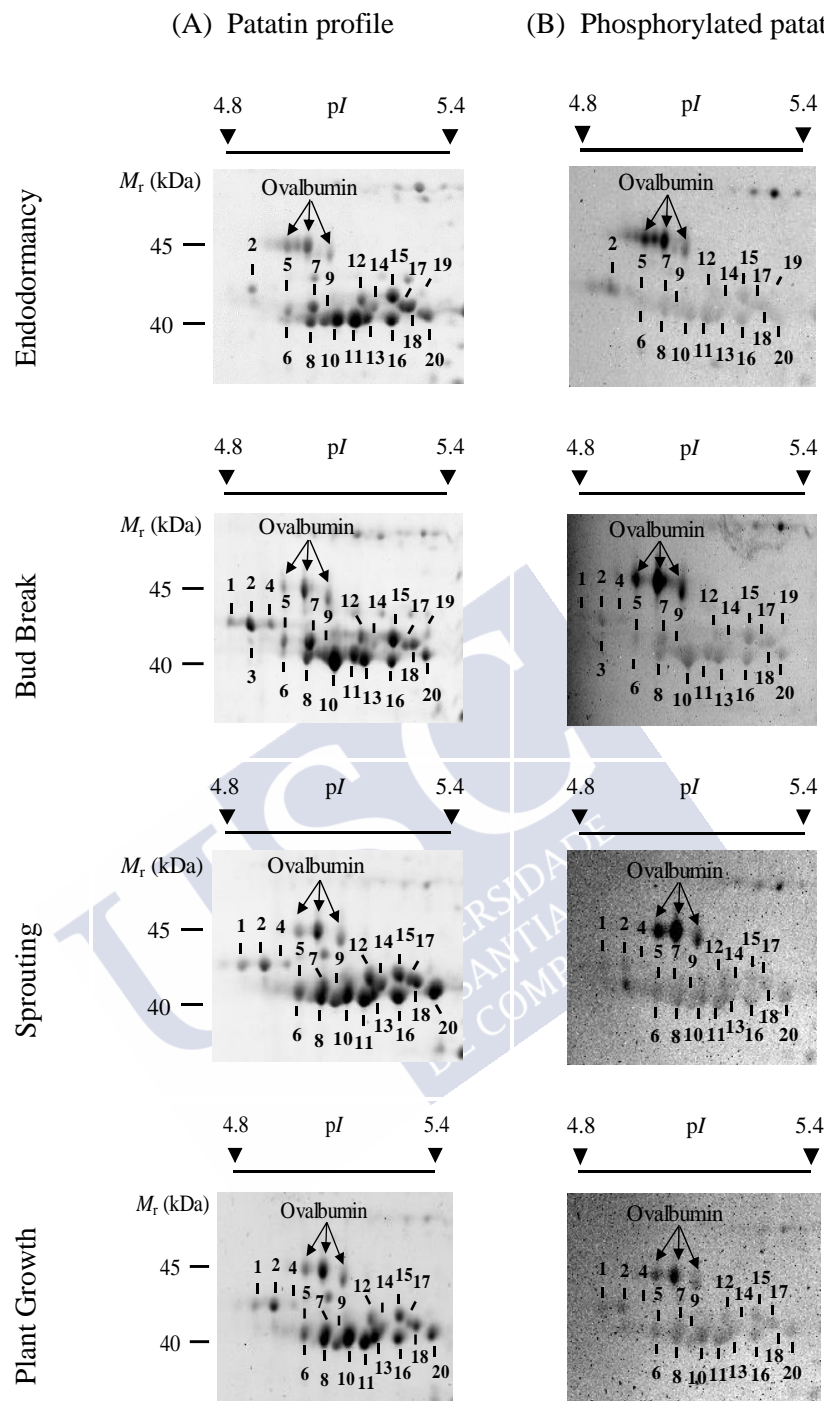


Figura 9. Detección de las isoformas de patatina fosforiladas en las siguientes etapas del ciclo de vida del tubérculo de patata (cv. Kennebec): endodormancia, rotura de brote, brotación y crecimiento de la planta. (A) Perfiles de referencia 2-DE de la patatina teñidos con el tinte fluorescente SYPRO Ruby. (B) Perfiles 2-DE de la patatina fosforilada teñidos con el tinte fluorescente específico para fosfoproteínas Pro-Q DPS. La ovoalbúmina se utilizó como marcador de fosforilación para validar la fiabilidad del método. Fuente: Bernal *et al.* (2019).

Después de la tinción con Pro-Q DPS, se realizó el tratamiento de desfosforilación química con HF-P para cuantificar la *PR* de las isoformas de patatina en las distintas etapas analizadas del ciclo de vida del tubérculo de la patata. Así, se obtuvo otro patrón 2-DE de la patatina después de ser desfosforilada con HF-P en tubérculos en estado de endodormancia, rotura de brote, brotación y crecimiento de la planta (Figura 8b). Comparando el patrón desfosforilado con el patrón control, prácticamente todos los *spots* que contienen isoformas de patatina muestran una disminución aparente en la intensidad de la señal fluorescente que emite el tinte SYPRO Ruby sin llegar a desaparecer por completo. Por consiguiente, se deduce que el conjunto de isoformas de patatina de los tubérculos en las distintas etapas analizadas no tienen la totalidad de sus polipéptidos fosforilados. De este modo, se explicó que en los *spots* coexisten una mezcla de péptidos fosforilados y no fosforilados en cada una de las isoformas de patatina. A su vez, se detectó la aparición de *spots* nuevos en la región más básica del gel en los patrones 2-DE de patatina desfosforilada como consecuencia del salto básico en su *pI* producido por la retirada de grupos fosfato. De esta forma, el rango de *pI* de las isoformas de patatina en los perfiles 2-DE se incrementa de 4,8-5,3 a 4,8-5,4. En lo que se refiere al marcador de fosforilación ovoalbúmina, la totalidad de sus polipéptidos muestran una traslación a posiciones más básicas dentro de los geles 2-DE de proteína desfosforilada. Este hecho valida la efectividad del tratamiento con HF-P para desfosforilar las isoformas de patatina.

Los valores de las medias de *PR* (\pm SE, error estándar) de las isoformas de patatina en cada una de las etapas analizadas del ciclo biológico del tubérculo se resumen en la Tabla 7. Los cambios en la *PR* de las isoformas de patatina se determinaron empleando las medias de los volúmenes de los *spots* en los patrones 2-DE de las muestras desfosforiladas y de las muestras controles. El valor de *PR* no se calculó en el caso de: los *spots* n^{os} 6, 13 y 19 de los tubérculos en estado de endodormancia; los *spots* n^{os} 4, 13 y 19 de los tubérculos en estado de rotura de brote y el *spot* n^o 13 de los tubérculos brotados. Se estableció el criterio de no considerar el dato si la *PR* del *spot* no se puede calcular en al menos un 50% de las réplicas biológicas. Dicho cálculo no es posible si el volumen del *spot* desfosforilado es superior al volumen del *spot* control. Al aplicar la fórmula de cálculo de la *PR* se obtendría un valor negativo, por lo que se descarta el dato al carecer de significado biológico. Así, se determinó que todos los *spots* contienen isoformas fosforiladas porque el valor de su *PR* siempre es superior a 0, lo que es coherente con los resultados obtenidos en los experimentos de tinción

específica de fosfoproteínas con el Pro-Q DPS. A su vez, los valores de *PR* de las isoformas de patatina son muy diferentes y heterogéneos. El valor de la *PR* promedio mínima es de 10,9% en el *spot* n° 11 de tubérculos en estado de endodormancia, y el valor máximo es de 53,2% en el *spot* n° 14 de tubérculos en estado de brotación. En ningún caso el valor de la *PR* es del 100%, lo que se supone una prueba adicional en favor de que los *spots* de patatina contienen una mezcla de isoformas fosforiladas y desfosforiladas.

Tabla 7. Valores promedio (\pm SE) de la *PR* de los *spots* de patatina en las siguientes etapas del ciclo biológico del tubérculo de patata (cv. Kennebec): endodormancia, rotura de brote, brotación y crecimiento de la planta.

Fuente: Bernal *et al.* (2019).

Spot No. ^a	<i>pI</i>	<i>PR</i>				Mean (\pm SE)
		Endodormancy	Bud Break	Sprouting	Plant Growth	
1	4.84	N/A	39.8 \pm 2.5	51.9 \pm 5.2	33.1 \pm 5.6	41.6 \pm 5.5
2	4.88	38.1 \pm 5.3	41.2 \pm 6.1	52.4 \pm 5.9	39.6 \pm 5.7	42.8 \pm 3.3
3	4.90	N/A	43.1 \pm 2.9	N/A	N/A	N/A
4	4.93	N/A	N/A	39.7 \pm 5.4	23.0 \pm 4.6	31.4 \pm 8.4
5	4.96	27.1 \pm 1.9	42.8 \pm 2.0	43.2 \pm 6.4	30.5 \pm 4.4	35.9 \pm 4.2
6	4.96	N/A	52.3 \pm 4.1	38.4 \pm 4.4	27.5 \pm 5.2	39.4 \pm 7.2
7	5.02	32.3 \pm 4.5	39.0 \pm 4.1	42.5 \pm 5.9	26.9 \pm 5.8	35.2 \pm 3.5
8	5.02	15.3 \pm 3.8	27.2 \pm 5.6	27.0 \pm 4.6	29.1 \pm 5.1	24.6 \pm 3.2
9	5.05	27.3 \pm 2.4	32.5 \pm 3.3	40.5 \pm 5.1	31.4 \pm 5.7	32.9 \pm 2.8
10	5.12	32.0 \pm 4.0	30.5 \pm 4.7	23.5 \pm 6.1	40.0 \pm 6.4	31.5 \pm 3.4
11	5.12	10.9 \pm 6.9	25.1 \pm 4.3	26.4 \pm 4.4	25.2 \pm 6.3	21.9 \pm 3.7
12	5.13	28.3 \pm 2.4	51.4 \pm 5.5	52.7 \pm 4.2	31.9 \pm 7.0	41.1 \pm 6.4
13	5.14	N/A	N/A	N/A	26.0 \pm 7.2	N/A ^c
14	5.16	50.1 \pm 4.9	44.3 \pm 9.4	53.2 \pm 7.5	33.3 \pm 5.9	45.2 \pm 4.4
15	5.20	41.4 \pm 2.4	41.9 \pm 3.8	44.1 \pm 5.5	28.0 \pm 5.3	38.8 \pm 3.7
16	5.20	12.8 \pm 3.1	27.0 \pm 8.4	17.2 \pm 4.3	25.1 \pm 5.1	20.6 \pm 3.3
17	5.23	23.8 \pm 3.6	36.0 \pm 2.4	39.8 \pm 6.3	29.3 \pm 4.6	32.2 \pm 3.5
18	5.25	29.6 \pm 5.3	34.2 \pm 4.1	51.6 \pm 4.5	22.9 \pm 4.6	34.5 \pm 6.1
19	5.29	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
20	5.27	11.6 \pm 2.0	11.9 \pm 4.6	25.6 \pm 6.3	29.2 \pm 4.9	19.6 \pm 4.6
Mean (\pm SE)		27.2 \pm 3.1	36.5 \pm 2.5	39.4 \pm 2.8	29.6 \pm 1.1	

^a Gel position of assigned spots is shown in Figure 2.

N/A = not accessible, spot signal of volume under the limit of detection.

Las *PR* promedio (\pm SE) de las isoformas de patatina en los tubérculos en las etapas analizadas muestran diferencias estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$), entre al menos dos de sus estadios, lo que se dedujo empleando el test de diferencia de medias ANOVA. La detección concreta de entre qué estadios del tubérculo se producen las diferencias estadísticamente significativas se pudo determinar calculando los intervalos de confianza de los promedios, así como realizando un análisis estadístico a posteriori. En la Figura 10 se muestra un histograma que representa los valores promedios de las *PR* promedio de las isoformas de patatina, junto con sus intervalos de confianza, en el conjunto de las etapas del ciclo biológico del tubérculo analizadas. A su vez, se indica entre qué etapas se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la *PR* promedio de las isoformas de patatina empleando el análisis a posteriori de Tukey-Kramer. Así, se determinó que la *PR* promedio (\pm SE) de la patatina en tubérculos en estado de endodormancia ($27,2 \pm 3,1$) es estadísticamente diferente (p -valor $< 0,01$) de la *PR* promedio (\pm SE) de la patatina en tubérculos brotados ($39,4 \pm 2,8$). Por otra parte, la *PR* promedio (\pm SE) de los tubérculos brotados muestra una diferencia estadísticamente significativa (p -valor $< 0,05$) con respecto a la *PR* promedio (\pm SE) de los tubérculos en estado de crecimiento de la planta ($29,6 \pm 1,1$). Por último, hay que decir que la *PR* promedio (\pm SE) de la patatina de los tubérculos en estado de rotura de brote, $36,5 \pm 2,5$, no presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto al resto de etapas analizadas. Aunque en la diferencia de medias de la *PR* promedio de la patatina en tubérculos en estado de endodormancia y de rotura de brote se obtuvo un p -valor de $0,052$, que está muy próximo a ser estadísticamente significativo con un nivel de confianza $\alpha = 0,05$. Tomando estos datos en su conjunto, se demuestra que la *PR* promedio de la patatina aumenta en la transición de tubérculos en estado de endodormancia a tubérculos brotados. A su vez, se evidencia que dicha *PR* promedio de la patatina disminuye al compararse tubérculos que han formado una nueva planta con tubérculos brotados.

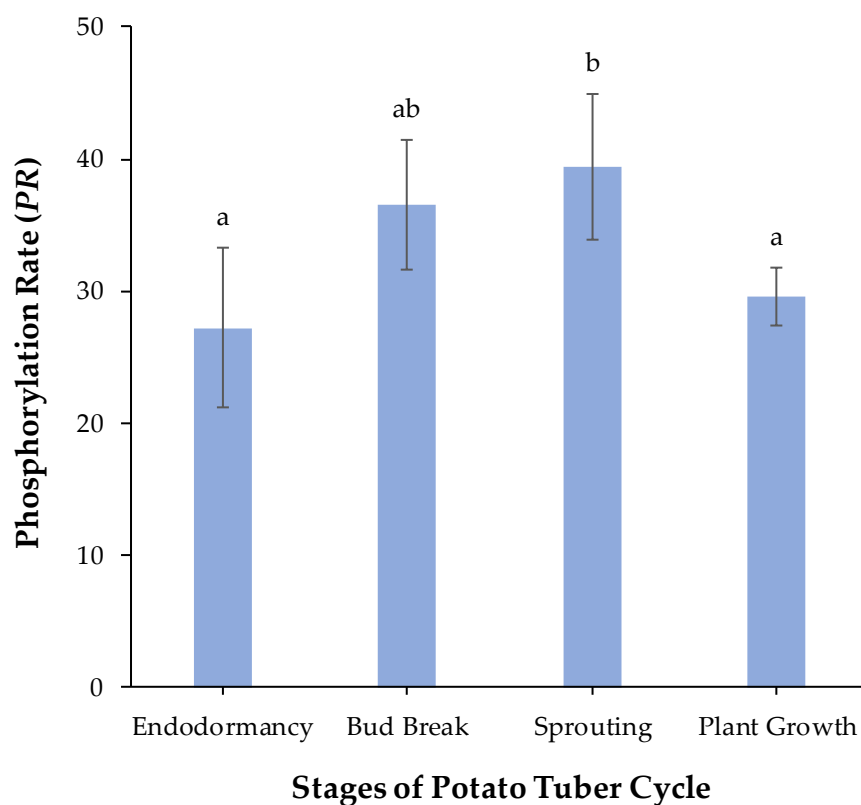


Figura 10. Histograma que representa los valores promedio de las *PR* de las isoformas de patatina con sus respectivos intervalos de confianza en cada una de las etapas del ciclo biológico del tubérculo analizadas: endodormancia, rotura de brote, brotación y crecimiento de la planta. Las letras dispuestas sobre los CIs al 95% indican las diferencias estadísticamente significativas obtenidas al aplicar el análisis a posteriori de Tukey-Kramer. Si las letras son equivalentes quiere decir que las *PR* promedio de las isoformas de patatina son similares. Fuente: Bernal *et al.* (2019).

4.8.1. Estatus de fosforilación de las isoformas de patatina de tipo Kuras y no-Kuras

El análisis de las diferencias en *PR* de las isoformas de patatina de tipo Kuras y no-Kuras se realizó comparando sus valores medios en las distintas etapas del ciclo biológico del tubérculo analizadas. Empleando la prueba de rango con signo de Wilcoxon (p -valor $< 0,01$) se demuestra que la *PR* promedio de las isoformas de patatina de tipo Kuras es más elevada que la de las isoformas de patatina de tipo no-Kuras en el conjunto de las etapas del ciclo biológico del tubérculo analizadas (Figura 11). Además, las líneas de tendencia que describen como cambia la fosforilación de las isoformas de patatina de tipo Kuras y no-Kuras en las distintas etapas del tubérculo tienen el mismo comportamiento. Así, la *PR* de ambos tipos de isoformas de patatina se incrementa desde los tubérculos en estado de endodormancia hasta los tubérculos en la etapa de brotación. De hecho, el valor máximo de la *PR* se obtiene en los

tubérculos brotados, y disminuye en tubérculos que desarrollaron el crecimiento de una nueva planta. El test de diferencia de medias ANOVA muestra que en ambos tipos de isoformas de patatina se detectaron diferencias estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre las *PR* estimadas en al menos 2 de las etapas del ciclo biológico del tubérculo. En el caso de las isoformas de patatina de tipo Kuras, se detectó una diferencia estadísticamente significativa (p -valor $< 0,01$, análisis a posteriori de Tukey-Kramer) al compararse la estima de la *PR* en los tubérculos en estado de brotación con la *PR* de los tubérculos en estado de crecimiento de la planta. De esta forma, se demuestra que la *PR* de las isoformas de patatina de tipo Kuras es más elevada en tubérculos brotados que en tubérculos que han formado una nueva planta. Analizando las isoformas de patatina de tipo no-Kuras con el test de Tukey-Kramer, se detectó una diferencia estadísticamente significativa (p -valor $< 0,05$) entre su *PR* promedio en los tubérculos en estado de endodormancia y su *PR* promedio en los tubérculos en estado de brotación. Así, se señala que la *PR* promedio de las isoformas de patatina de tipo no-Kuras es más elevada en tubérculos brotados que en tubérculos en estado de endodormancia. A su vez, si se engloba a las isoformas de patatina de tipo no-Kuras de los tubérculos de la totalidad de etapas de no-endodormancia en único grupo y se compara su *PR* con la de los tubérculos en estado de endodormancia, se obtiene una diferencia estadísticamente significativa (p -valor $< 0,05$; test *t* de Student). Por lo que se concluye que en la liberación de la etapa de la endodormancia se produce un incremento del estatus de fosforilación de las isoformas de patatina de tipo no-Kuras.

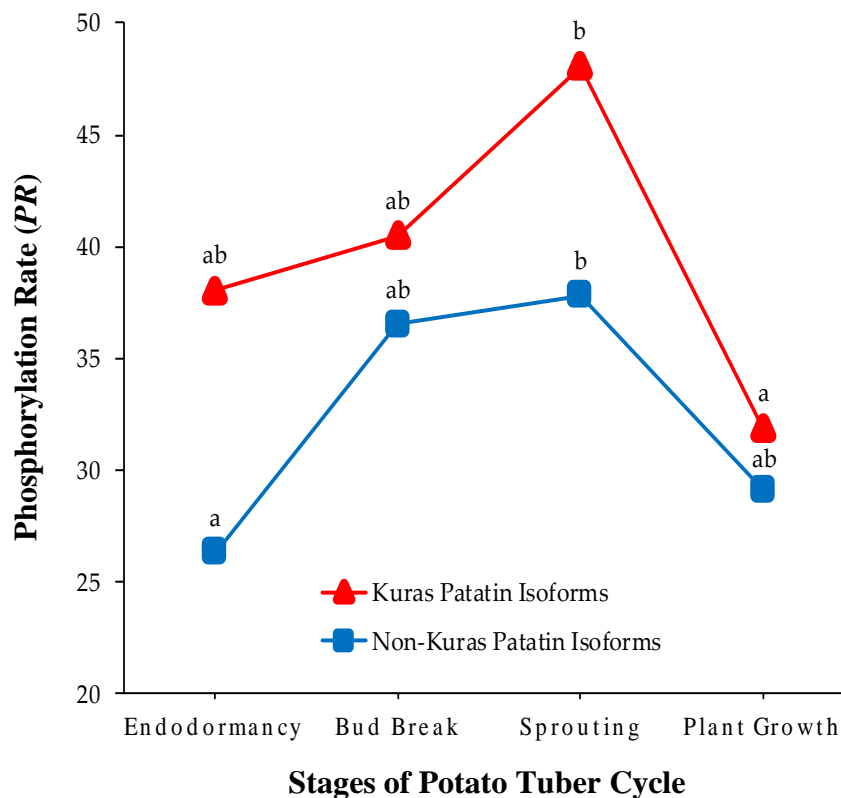


Figura 11. Cambios dinámicos en las *PR* promedio de las isoformas de patatina de tipo Kuras y no-Kuras en el conjunto de etapas del ciclo biológico del tubérculo analizadas: endodormancia, rotura de brote, brotación y crecimiento de la planta. Los triángulos y los cuadrados indican los valores medios de las *PR* de las isoformas de patatina de tipo Kuras y no-Kuras respectivamente. Fuente: Bernal *et al.* (2019).

4.9. Cambios en la abundancia de la patatina en el ciclo biológico del tubérculo

En cada una de las etapas del ciclo de vida del tubérculo de la patata se calculó la abundancia relativa de la patatina (Anexo IV). Dicha abundancia relativa se estimó sumando los valores de los volúmenes de los *spots* en cada una de las réplicas biológicas. Con estos datos, se calculó el promedio de la abundancia relativa junto con el CI *bootstrap* al 95 % utilizando el método del percentil con corrección de sesgo como se muestra en la Figura 12. De este modo, se demostró que se produce una acumulación estadísticamente significativa de las isoformas de patatina en los tubérculos en estado de rotura de brote comparados con los tubérculos en la etapa de la endodormancia. Este resultado podría estar relacionado con los cambios encontrados en el estatus de fosforilación de la patatina una vez se ha producido una completa liberación de la dormancia del tubérculo. A su vez, es destacable el menor tamaño de rango del CI que se calculó para la abundancia de la patatina de los tubérculos en estado de endodormancia. Esta particularidad sugiere un control muy estricto de los niveles de

RESULTADOS

expresión de la patatina en la etapa de la endodormancia del tubérculo indicando que esta VSP puede desempeñar un papel fundamental en este proceso biológico. Por otra parte, los cambios de fosforilación detectados en la patatina en la continuación de la brotación del tubérculo podrían estar relacionados con variaciones en su abundancia relativa. En este sentido, los cálculos del CI *bootstrap* al 95% mediante el método del percentil con corrección de sesgo muestran una disminución de la abundancia relativa de la patatina al compararse tubérculos que han formado una nueva planta con tubérculos brotados. Resulta interesante el hecho de que también se haya detectado una disminución de la *PR* de las isoformas de patatina de tipo Kuras en tubérculos que formaron una nueva planta. Si la degradación de las isoformas de patatina se produce por un mecanismo aleatorio, no se espera que varíe su estatus de fosforilación. Sin embargo, el cambio en el estatus de fosforilación de las isoformas de patatina de tipo Kuras sugiere que son degradadas de forma preferencial con respecto a las isoformas de tipo no-Kuras.

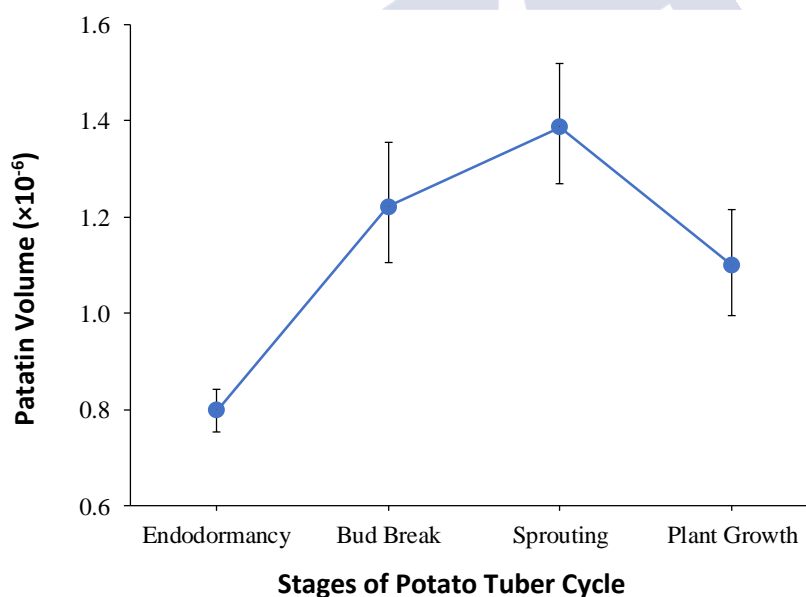


Figura 12. Cambios dinámicos en la abundancia relativa de la patatina analizando las siguientes etapas del ciclo biológico del tubérculo (cv. Kennebec): endodormancia, rotura de brote, brotación y crecimiento de la planta. Para la abundancia relativa de la patatina en cada una de las etapas se calculó el CI *bootstrap* al 95% utilizando el método del percentil con corrección de sesgo. Fuente: Bernal *et al.* (2019).



5. DISCUSIÓN



5.1. Mapa 2-DE optimizado para identificar isoformas de patatina fosforiladas

La 2-DE optimizada es muy útil para identificar y separar las isoformas de las proteínas de reserva (Bárta *et al.* 2012; de la Fuente *et al.* 2012; López-Pedrouso *et al.* 2014a, b; Mouzo *et al.* 2018a, b). La 2-DE acoplada a técnicas de MS es una estrategia analítica de uso tradicional y frecuente en el estudio de la diversidad de las proteínas de reserva en una gran variedad de especies vegetales como, por ejemplo: *Arabidopsis*, arroz (*O. sativa*), colza (*B. napus*), judía común (*P. vulgaris*), *Medicago*, patata (*S. tuberosum*) y trigo (*T. aestivum*) (Agrawal and Thelen 2006; Bauw *et al.* 2006; Chibani *et al.* 2006; Irar *et al.* 2006; Lehesranta *et al.* 2006; Gallardo *et al.* 2002, 2007; Wan *et al.* 2007; Ghelis *et al.* 2008; de la Fuente *et al.* 2011, 2012; Bárta *et al.* 2012; Guo *et al.* 2012; Han *et al.* 2014; López-Pedrouso *et al.* 2014a, b; Mouzo *et al.* 2018a, b). Los perfiles 2-DE de alta resolución han contribuido a incrementar el conocimiento de las proteínas de reserva en lo referente a la identificación y cuantificación de la abundancia relativa de sus isoformas, y a la detección de modificaciones co- y postraduccionales (de la Fuente *et al.* 2012; López-Pedrouso *et al.* 2014a; Mouzo *et al.* 2018a). La 2-DE optimizada permitió separar la mayoría de las isoformas de proteínas de reserva con un éxito notable. Las proteínas de reserva son solubles y muy abundantes siendo las mayoritarias dentro de las semillas. Estas proteínas tienen un rango de M_r y de pI que está dentro de los límites de resolución de los mapas 2-DE optimizados.

Utilizando la 2-DE optimizada, hemos detectado la presencia de hasta 20 *spots* identificados como isoformas de patatina con una resolución lo suficientemente buena como para separarlos entre sí permitiendo el cálculo de su abundancia relativa. Aparte de la patatina, la única proteína de reserva en la que se obtuvo un mapa 2-DE de alta resolución es la faseolina (Bárta *et al.* 2012; de la Fuente *et al.* 2012; López-Pedrouso *et al.* 2014a, b; Mouzo *et al.* 2018a, b). En la Figura 13 se muestra la comparación de los patrones 2-DE optimizados y no optimizados de la patatina presente en tubérculos en estado de rotura de brote que se ha analizado en este estudio, y de la faseolina analizada en semillas durmientes (de la Fuente *et al.* 2012; López-Pedrouso *et al.* 2014a, b). Como se puede apreciar, los protocolos 2-DE optimizados permiten ofrecer imágenes de los geles de muy alta calidad con las isoformas de proteínas de reserva bien separadas, contenidas en *spots* muy bien definidos dispuestos en hileras. Los perfiles 2-DE de la faseolina y de la patatina están compuestos por un amplio número de *spots* que se organizan en agrupaciones dispuestas en la misma región

del gel, con un rango de valores de M_r y de pI que oscilan entre 40-50 kDa y 4.5-5.3 respectivamente. Los perfiles de las proteínas de reserva también pueden estar formados por múltiples agrupaciones de *spots* distribuidos en todo el gel 2-DE y no sólo en una región en concreto. Así, en la Figura 14 observamos como las isoformas de las proteínas de reserva de semillas de soja, glicinina y β -conglucininina, se distribuyen por todo el mapa 2-DE en contraposición con lo que sucede en el caso de la faseolina y de la patatina.

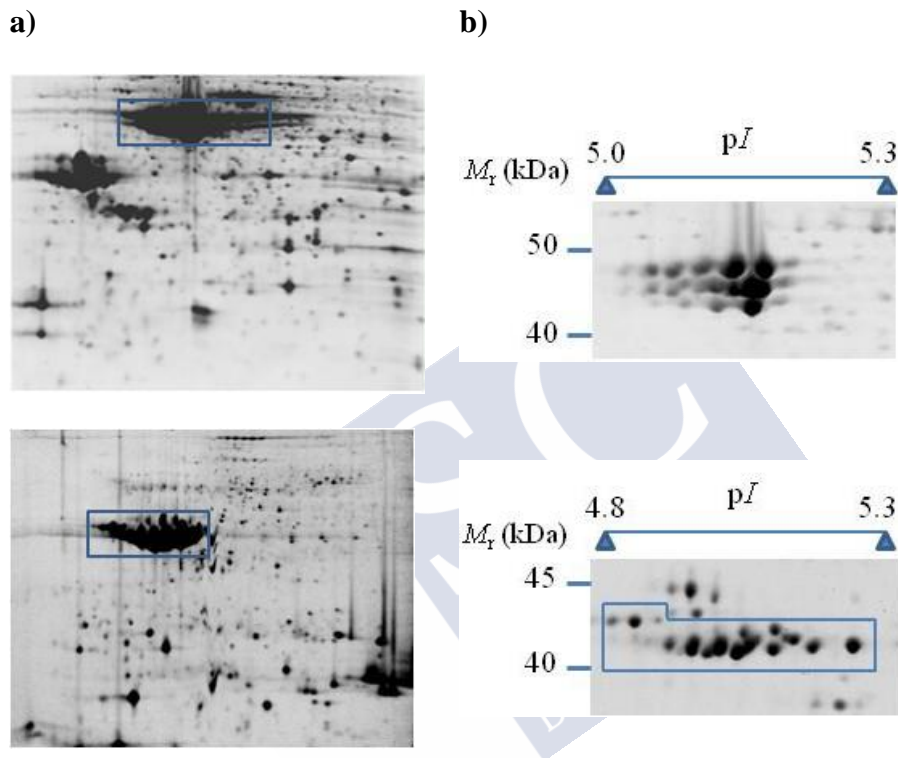


Figura 13. Imágenes de geles 2-DE estándar (a) y optimizadas (b) de las isoformas de faseolina (arriba) y patatina (abajo) en semillas de la judía común (*P. vulgaris*) y en tubérculos de patata (*S. tuberosum*). En los geles 2-DE estándar se analizaron 400 μ g de proteína total utilizando tiras IPG de 24 cm con un gradiente de pH lineal 4-7 en la primera dimensión. En la segunda dimensión (SDS-PAGE) se emplearon geles de acrilamida al 12% (w/v). Los geles fueron teñidos con el tinte fluorescente SYPRO Ruby. Las imágenes de los geles 2-DE optimizados para los perfiles de alta resolución se obtuvieron utilizando las mismas condiciones experimentales, con la diferencia de que sólo se analizó 75 μ g de proteína total. Fuente: Mouzo *et al.* (2018a).

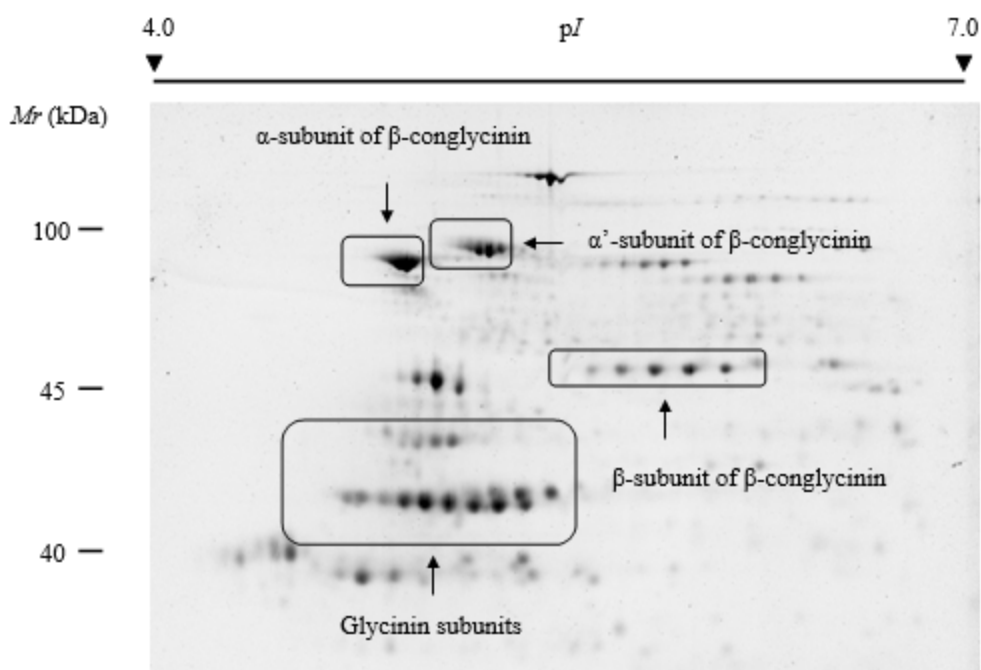


Figura 14. Imagen en gel del perfil de alta resolución de las proteínas de reserva (subunidades de β -conglycinina y glicinina) de la soja (*G. max*) utilizando la técnica 2-DE optimizada: Fuente: Mouzo *et al.* (2018a).

La técnica de la 2-DE es muy útil para la identificación de modificaciones co- y postraduccionales que hacen que varíe el pI y/o la M_r de las proteínas como son las fosforilaciones o las glicosilaciones (Rabilloud 2014; Rabilloud and Lelong 2011). Los perfiles 2-DE optimizados permiten la detección de glicosilaciones y fosforilaciones en las múltiples isoformas de la patatina y de la faseolina (Figura 15). Cabe destacar que este estudio es el primero en identificar a la patatina como una proteína fosforilada y en cuantificar su estatus de fosforilación. En ambas proteínas de reserva la tasa de fosforilación es más elevada en isoformas con un pI más ácido, y las isoformas de mayor M_r presentan un mayor número de glicosilaciones. Comparando las tasas de fosforilación, las isoformas de patatina presentes en tubérculos en estado de rotura de brote tienen una *PR* promedio sensiblemente inferior a la de las isoformas de faseolina en semillas durmientes (López-Pedrouso *et al.* 2014a). La presencia de fosforilaciones también se detectó en isoformas de SSPs de tipo globulina, albúmina, glutelinas y prolaminas de una gran variedad de especies: *Arabidopsis*, arroz (*Oryza sativa* L.), colza (*B. napus*), girasol (*Helianthus annuus* L.), pino (*Pinus Sylvestris* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.) (Tilley and Schofield 1995; Facchiano *et al.* 1999; Lin *et al.* 2005; Agrawal and Thelen 2006; Irar *et al.* 2006; Wan *et al.* 2007; Ghelis *et al.* 2008; Guo *et*

al. 2012; Meyer *et al.* 2012; Kovaleva *et al.* 2013; Quiroga *et al.* 2013; Han *et al.* 2014; Dong *et al.* 2015). Sin embargo, empleando protocolos 2-DE para el estudio de proteomas completos o metodologías que no empleen geles de electroforesis, con enriquecimiento de fosfoproteínas en algunos casos, no se logró cuantificar el estatus de fosforilación de las isoformas de proteínas de reserva de manera específica. En contraposición, la mejora de la calidad de los mapas de referencia 2-DE permite cuantificar el estatus de fosforilación de las isoformas de proteínas de reserva diferenciándolas entre sí.

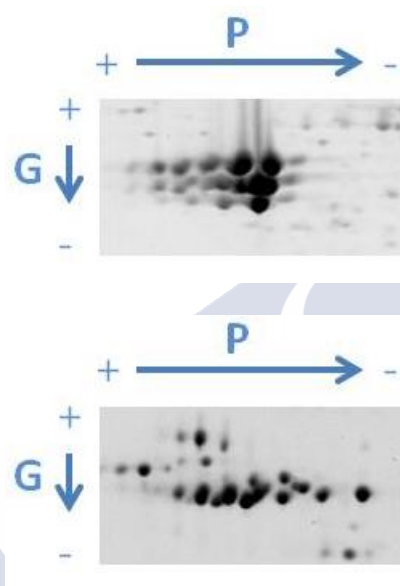


Figura 15. Imagen en gel de las isoformas de la faseolina (arriba) y de la patatina (abajo) diferencialmente fosforiladas (P) y glicosiladas (G) obtenidas empleando la técnica 2-DE optimizada. Fuente: Mouzo *et al.* (2018a).

5.1.1 Glicosilación de las isoformas de patatina en los mapas 2-DE optimizados

La detección y cuantificación de las isoformas de proteínas de reserva glicosiladas puede realizarse por distintos métodos, incluyendo a la desglicosilación enzimática de los extractos de proteína total (de la Fuente *et al.* 2012), tinción en gel de electroforesis con el tinte fluorescente Pro-Q Emerald (Mehta-D'souza 2012) y enriquecimiento de glucopéptidos utilizando una columna de cromatografía líquida de interacción hidrófila zwitteriónica (HILIC) o cromatografía de afinidad empleando una columna de concanavalina-A-sefarosa (Duranti *et al.* 1994; Dam *et al.* 2013). La detección de los péptidos glicosilados es difícil empleando sólo análisis de MS porque las glicosilaciones cambian la hidrofobicidad/hidrofilicidad del péptido (Rabilloud *et al.* 2010). Las isoformas glicosiladas

de proteínas de reserva pueden ser identificadas de manera eficiente por medio de las variaciones de M_r detectados en perfiles 2-DE optimizados de isoformas desglicosiladas con una enzima glicosidasa como es la PNGasa F (de la Fuente *et al.* 2012). En la Tabla 8 se muestra los estudios de glicosilaciones en SSPs y VSPs basados en la utilización de la 2-DE en combinación con otras técnicas y tratamientos como, por ejemplo, la desglicosilación enzimática. El empleo de la desglicosilación enzimática de las proteínas con la PNGasa F es un método muy efectivo para la eliminación de casi todos los oligosacáridos unidos mediante enlaces de tipo N- (Tarentino *et al.* 1985). En dicho estudio se explica que se consigue la N-desglicosilación por medio de la hidrólisis del enlace que se genera entre el extremo terminal del monosacárido N-acetilglucosamina (GlcNAc) y el nitrógeno de la amida del aminoácido Asn.

Por medio de la utilización de experimentos de desglicosilación enzimática con PNGasa F utilizando tubérculos en estado de rotura de brote, hemos inferido que la heterogeneidad en la M_r de las isoformas de patatina se debe en gran medida a la presencia de N-glicosilaciones. Esta heterogeneidad en M_r se podría explicar por una glicosilación diferencial de las isoformas de patatina como consecuencia de la presencia de un mayor o menor número de sitios de N-glicosilación en su secuencia. En esta línea, la literatura científica argumenta que la presencia de grandes diferencias en M_r entre isoformas de patatina se puede explicar por la presencia de hasta 5 sitios potenciales de N-glicosilación en residuos aminoacídicos de Asn y Thr que no están necesariamente unidos en su totalidad a cadenas de glucanos (Sonnewald *et al.* 1989b; Pots *et al.* 1999a; Bauw *et al.* 2006; Wellinder and Jørgensen 2009; Bárta *et al.* 2012; Lattová *et al.* 2015). El primer estudio que detectó la presencia de glicosilaciones en la proteína patatina lo realizaron Sonnewald *et al.* (1989b). Previamente se había deducido la presencia de sitios potenciales de glicosilación, pero no se había confirmado la presencia/ausencia de cadenas glucídicas *in vivo*. Estos investigadores lo lograron introduciendo un gen de patatina en hojas de la planta del tabaco y determinaron la presencia de glicosilaciones en 2 de los 3 residuos aminoacídicos de Asn que se habían propuesto como sitios de N-glicosilación. En la literatura científica también se refrenda nuestra observación experimental de que prácticamente la totalidad de isoformas de patatina presentan glicosilaciones. En este sentido, Pots *et al.* (1999a) sugirieron que puede haber patatinas glicosiladas en un único sitio de glicosilación, a diferencia de otras isoformas que lo están en 2 o incluso en hasta 3 posiciones. Este hecho se dedujo por medio de diferencias en

Tabla 8. Lista de estudios glucoproteómicos de SSPs y VSPs basados en 2-DE. Fuente: Mouzo *et al.* (2018a).

Storage protein Type	Storage Protein Subtype	Additional Techniques	Species	Reference
Globulin	7S vicilin	1-DE, Glycoprotein staining	Cocoa vean (<i>Theobroma cacao</i> L.)	Kumari <i>et al.</i> (2016)
	7S phaseolin	1-DE, Fluorography, Radioactive labelling of sugars, Concanavalin A binding, Immunoaffinity chromatography, N-Deglycosylation,	Common Bean (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Lioi and Bollini (1984); Paaren <i>et al.</i> (1987); de la Fuente <i>et al.</i> (2012)
	7S convicilin	N-Deglycosylation	Lotus (<i>Lotus japonicus</i> L.)	Dam <i>et al.</i> (2013)
Glutelin	N/A	Glycoprotein staining LC-MS/MS	Rice (<i>Oryza sativa</i> L.)	Lin <i>et al.</i> (2005)
Lectin	N/A	N-Deglycosylation	Lotus (<i>Lotus japonicus</i> L.)	Dam <i>et al.</i> (2013)
Vegetative	Patatin	N-Deglycosylation, MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF	Potato (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	Bauw <i>et al.</i> (2006); Bárta <i>et al.</i> (2012);

N/A, not available

su M_r estudiadas por MS en las patatinas de 3 cultivares distintos de tubérculo de patata. Bárta *et al.* (2012) confirmaron los resultados de Pots *et al.* (1999b) al relacionar la heterogeneidad en M_r de las isoformas de patatina en los mapas 2-DE con la presencia de grados variables de glicosilación. Mediante la técnica MALDI-TOF MS, determinaron que las diferencias de M_r entre las hileras de *spots* de patatina es de aproximadamente 1,2 kDa, lo que se corresponde con el tamaño molecular de un azúcar denominado antenna. Además, estos investigadores establecieron que las isoformas de patatina glicosiladas en uno o dos de los sitios potenciales de glicosilación son las más frecuentes. En consonancia con lo descrito en estos experimentos, Bauw *et al.* (2006) confirmaron la presencia de 2 de los 3 sitios de glicosilación mediante análisis PMF empleando técnicas de MS. Dichos sitios de glicosilación se detectaron en los *spots* de mayor M_r de los perfiles 2-DE de la patatina, identificados como la isoforma PT3K1. A su vez, en dicho estudio se describió la existencia de otras isoformas de patatina de tipo Kuras que no tenían sitios potenciales de glicosilación, e isoformas que presentaron un único sitio potencial de glicosilación.

En los perfiles 2-DE de patatina que hemos obtenido tras el tratamiento de desglicosilación enzimática con PNGasa F, se detectó que el 100% de las isoformas de patatina de tipo Kuras PT3K1 presentan N-glicosilaciones. En apoyo de esta observación, Wellinder and Jørgensen (2009) concluyeron que la glicosilación parece estar presente en todas las isoformas de patatina de tipo Kuras debido a la ausencia de polipéptidos no glicosilados tras la realización de un tratamiento de desglicosilación enzimática. Esto lo han inferido estudiando la presencia de glicosilaciones en las cadenas polipeptídicas de las isoformas de patatina en tubérculos de la variedad cv. Kuras. El análisis lo realizaron mediante la técnica nano-LC-MS/MS, la cual combinaron en un segundo experimento con la desglicosilación de la patatina con la glucopeptidasa A. Mediante los experimentos de desglicosilación enzimática de la patatina, determinaron en qué posiciones de la secuencia aminoacídica están glicosiladas. El número de posiciones glicosiladas que muestran las isoformas de patatina son los siguientes: 1 (PT1K2, PT2K1, PT2K2, PT2K3 y PT2K4), 2 (PT1K1) y 3 (PT3K1 y PT4K1). Cabe destacar que la isoforma PT3K1 es una de las que mayor grado de glicosilación presenta, lo que podría explicar el hecho de que hallamos apreciado su desaparición en los perfiles 2-DE de la patatina tras el tratamiento con la enzima glicosidasa PNGasa F. Por otra parte, Lattová *et al.* (2015) analizaron el número y el tipo de glucanos que se unen a los sitios de glicosilación de las cadenas polipeptídicas de las

isoformas de patatina por medio de ensayos MALDI-TOF/TOF MS y de desglicosilación enzimática con PNGasa A. Este estudio lo realizaron en tubérculos de patata de distintas especies del género *Solanum*, lo que sugiere que la glicosilación es una modificación co- y postraduccional ubicua en el caso de la proteína patatina.

En lo referente al significado biológico que puede tener la glicosilación en la patatina, se ha sugerido un rol importante en su transporte intracelular, así como en su estabilidad proteica y posible movilización (Sonnewald *et al.* 1989b; Wellinder and Jørgensen 2009; Santos *et al.* 2013). La correcta glicosilación de los polipéptidos de patatina permite que se produzca el transporte intracelular de los mismos hacia las vacuolas (Sonnewald *et al.* 1989b). Centrándonos en la estabilidad proteica de la patatina, Wellinder and Jørgensen (2009) analizaron la estructura de la isoforma de patatina PAT17 de *Solanum cardiophyllum* Lindl., que es muy similar a las isoformas de patatina de tipo Kuras de *S. tuberosum*, para analizar la posición de las cadenas de los glucanos. Dichos glucanos se situaron sobre Asn y Thr expuestas hacia el exterior en la región superficial de la estructura molecular. Estos investigadores sugirieron que estos glucanos pueden tener una función de protección frente al desplegamiento proteico. Por otra parte, el mapeo de isoformas glicosiladas de patatina en los geles 2-DE podría permitir investigar en futuros estudios si la glicosilación tiene un rol funcional en la movilización de la patatina. En este sentido, Santos *et al.* (2013) identificaron por primera vez que una enzima glicosidasa ubicuamente distribuida, la glucósido-hidrolasa β -N-acetilhexosaminidasa (β -NAHase), está implicada en la movilización de la proteína de reserva α -conglutina en el proceso de germinación de la semilla del altramuz blanco (*L. albus*).

5.1.2. Identificación de las isoformas de patatina en los mapas 2-DE optimizados

Al igual que en investigaciones previas, hemos identificado como isoformas de patatina a los polipéptidos presentes en los perfiles 2-DE de los tubérculos, lo que se logró utilizando la técnica de la MS (Lehesranta *et al.* 2005; Bauw *et al.* 2006; Bárta *et al.* 2012). La identidad de las isoformas de patatina en los perfiles 2-DE de tubérculos en estado de endodormancia y de rotura de brote se confirmó empleando las técnicas MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF MS. Así, hemos comprobado que la identificación de las isoformas de patatina en los mapas 2-DE son equivalentes en ambas etapas del ciclo biológico del tubérculo. Este hecho nos permite asumir que todos los *spots* numerados de los perfiles 2-DE

de los tubérculos en las distintas fases analizadas contienen polipéptidos de patatina. Por otra parte, cabe decir que la realización de perfiles 2-DE de la patatina combina un doble sistema de separación de la proteína en función de su pI y su M_r , lo que permite detectar un alto número de isoformas de patatina. En nuestro caso, empleando tubérculos de la variedad cv. Kennebec hemos detectado hasta 20 *spots* 2-DE con un total de 26 identificaciones posibles de isoformas de patatina.

En el conjunto de isoformas de patatina identificadas en nuestro trabajo, sólo la PT3K1 se ha identificado sin ambigüedad. Este hecho podría explicarse por el hallazgo de Bauw *et al.* (2006) en el que determinaron que la isoforma de patatina más diferenciada a nivel genético es la PT3K1. Estos investigadores estudiaron las isoformas de patatina presentes en tubérculos de la variedad cv. Kuras, y las catalogaron en 3 grupos basándose en los análisis de árboles filogenéticos UPGMA de las secuencias de sus cDNAs. Así, se detectaron isoformas de patatina específicas de tipo Kuras incluyéndose de manera exclusiva en el tercer grupo a la patatina PT3K1. Además, se clasificaron las isoformas de patatina PT1K1 y PT1K2 en el primer grupo, y a las variantes PT2K1, PT2K2, PT2K3 y PT2K4 en el segundo grupo. Estos investigadores también determinaron que las isoformas de patatina presentes en los tubérculos de la variedad cv. Kuras muestran un alto grado de homología, de hecho, sus secuencias aminoacídicas son idénticas en un 80-95% de los casos. Al igual que en nuestro estudio, las isoformas de patatina contenidas en los *spots* 2-DE de mayor M_r se identificaron como isoformas de patatina PT3K1. La enorme ambigüedad existente en la identificación de las isoformas de patatina es consecuencia de la enorme similitud de sus respectivas secuencias aminoacídicas. Dicha homología se puede relacionar con el alto grado de similitud de las secuencias de los genes codificadores para las distintas isoformas de patatina (Mignery *et al.* 1984, 1988). De hecho, tanto en el caso de la patatina de clase I como en la patatina de clase II, se estimó una homología de aproximadamente un 98% en sus secuencias nucleotídicas (Mignery *et al.* 1984). Este grado de homología se corroboró por medio de los análisis de secuenciación génica en los que se determinó que un promedio de 97,8% de las secuencias de los exones, que es la parte del gen que se expresa, son equivalentes (Mignery *et al.* 1988).

5.2. Perfil 2-DE de las isoformas de patatina en el ciclo de vida del tubérculo

En los mapas 2-DE optimizados de la patatina se detectó la presencia de una gran riqueza de isoformas de esta VSP en tubérculos recién cosechados en estado de endodormancia. Lehesranta *et al.* (2006) estudiaron los cambios en el proteoma de la patata en las distintas fases de desarrollo del tubérculo, así como en tubérculos completamente formados y brotados. En lo referente a los cambios detectados en la patatina, cabe decir que observaron una acumulación de la misma en el proceso de desarrollo del tubérculo. De hecho, algunas isoformas de patatina incrementan su abundancia relativa en el momento en que el tamaño de los tubérculos en desarrollo aumenta de 1-2 cm a 2-2,5 cm de diámetro. En apoyo de esta conclusión, Kloosterman *et al.* (2005) analizaron la expresión génica de las isoformas de patatina en el desarrollo del tubérculo y su almacenamiento una vez se ha cosechado. Realizaron un análisis a nivel transcripcional utilizando *microarrays* de cDNAs para estudiar los cambios en expresión génica en etapas equivalentes a las descritas por Lehesranta *et al.* (2006). De esta forma, concluyeron que la expresión génica de las isoformas de patatina, así como de los inhibidores de proteasas, incrementa en el desarrollo del tubérculo. A su vez, otros estudios de expresión génica detectaron un incremento de la transcripción de genes codificadores de isoformas de patatina desde el inicio de la tuberización hasta la finalización de este proceso (Bachem *et al.* 2000; Ronning *et al.* 2003; Stupar *et al.* 2006). Por otra parte, Weeda *et al.* (2009) corroboraron que se produce un incremento progresivo de la expresión génica de los inhibidores de proteasas desde que el estolón comienza a desarrollar el tubérculo. Estos investigadores detectaron que los inhibidores de proteasas se expresan hasta finalizar la formación del tubérculo, hecho que correlacionan con un descenso en la actividad de las proteasas y un incremento de la expresión proteica de la patatina. En suma, el balance neto de estos sucesos genera una acumulación progresiva de la patatina que se ve favorecida por la inhibición de la acción de las proteasas causada por un aumento en la cantidad de los inhibidores de las mismas. Por lo tanto, en los análisis tanto a nivel genético como a nivel proteómico se concluye que la patatina aumenta su abundancia en el desarrollo del tubérculo.

En lo referente a los cambios detectados en el perfil 2-DE de las isoformas de patatina en el conjunto de etapas del tubérculo analizadas, el principal cambio cualitativo que se detectó es la acumulación de isoformas de patatina de tipo Kuras en la salida de la endodormancia. A su vez, se observaron cambios cuantitativos estadísticamente significativos en la abundancia relativa de las isoformas de patatina al compararse tubérculos en estado de

endodormancia con los tubérculos del resto de etapas analizadas. En consonancia con nuestros resultados, Weeda *et al.* (2010) señalaron que la expresión génica de la patatina es elevada en el proceso de salida de la endodormancia antes de que se generen brotes visibles. De acuerdo con esta apreciación, Ronning *et al.* (2003) indicaron que se produce una alta expresión de los genes codificadores para isoformas de patatina e inhibidores de proteasas analizando tubérculos en estado de rotura de brote. De esta forma, los datos de expresión génica son congruentes con la idea de que la proteína patatina se sigue sintetizando en el punto de la rotura de brote.

En nuestros resultados también se detectó una disminución de la abundancia relativa de la patatina entre los tubérculos brotados y los tubérculos en la etapa de formación de la planta. Contradictoriamente, Lehesranta *et al.* (2006) afirmaron que las isoformas de patatina acumuladas en el desarrollo del tubérculo permanecen con una abundancia relativa constante hasta el desarrollo de tubérculos con brotes de aproximadamente 20 cm de longitud. Esta discrepancia puede explicarse por el hecho de que realizaron un análisis 2-DE del proteoma completo del tubérculo, lo que les resta poder resolutivo para poder realizar una estimación con mayor precisión y exactitud. En nuestro caso se realizó un análisis 2-DE enfocado en la optimización del estudio de la patatina mejorando notablemente la calidad de los resultados obtenidos. En consonancia con nuestras observaciones, Weeda *et al.* (2010) detectaron un descenso progresivo de la abundancia relativa de la patatina en el transcurso de los procesos de la brotación del tubérculo y de la generación de la nueva planta. Ello lo lograron empleando técnicas de electroforesis monodimensional (1-DE) junto con ensayos de actividad enzimática de la patatina. Así, determinaron que la patatina experimenta una disminución en su cantidad relativa en la brotación del tubérculo. Dicho descenso en la cantidad relativa de la patatina entre tubérculos en estado de endodormancia y tubérculos que forman plantas jóvenes es de aproximadamente un 57%. Este hecho corrobora la función de la patatina como la principal proteína de reserva del tubérculo de la patata, al movilizarse en el proceso de la brotación del tubérculo y el desarrollo de una nueva planta. Estos investigadores también analizaron los cambios en la actividad de las proteasas, así como en la cantidad de los inhibidores de proteasas. De este modo, detectaron que se produce un incremento de la actividad de las proteasas en la brotación del tubérculo y en la formación de la nueva planta. A su vez, en dicho trabajo se relacionó el aumento en la actividad de las proteasas con la movilización de la patatina por ser sucesos simultáneos en el tiempo. Los cambios en la

actividad de las proteasas son coherentes con las variaciones en la cantidad de inhibidores de proteasas. En el momento en el que la cantidad de los inhibidores de proteasas disminuye, la actividad de las proteasas aumenta y la patatina se degrada. La disminución de la cantidad relativa de las isoformas de patatina podría producirse por la acción de las Cys proteasas presentes en el tubérculo de la patata, así como de otras Ser proteasas que degradan proteínas de reserva (Shutov and Vaintraub 1987; Dunaevsky and Belozersky 1989; Kumar *et al.* 1999).

Otra explicación posible de la disminución de la abundancia de la patatina en tubérculos que han formado una nueva planta podría ser el decaimiento de los niveles de expresión génica de la patatina en la etapa de la brotación del tubérculo. En este sentido, Weeda *et al.* (2010) detectaron que la expresión génica de la patatina disminuyó de manera progresiva desde el inicio de la producción de brotes visibles. Aun así, en el inicio de la brotación del tubérculo se observó un nivel de expresión relativamente alto de los genes codificadores de isoformas de patatina (Bachem *et al.* 2000; Ronning *et al.* 2003; Campbell *et al.* 2008). Al continuar el proceso de la brotación del tubérculo, la expresión de los genes codificadores de patatina es prácticamente no detectable hasta la producción de lo que será la nueva planta (Weeda *et al.* 2010). De acuerdo con este hallazgo, Campbell *et al.* (2008) determinaron que algunas isoformas de patatina disminuyen su expresión génica en tubérculos que se han superado por completo la etapa de la dormancia produciendo el desarrollo de brotes con un crecimiento notable. Una vez se inicia la producción de las plantas jóvenes a partir de los brotes, se observó un incremento de la expresión génica de las isoformas de patatina en el momento en que el crecimiento de la planta progresa y se maduran sus tejidos (Weeda *et al.* 2010). En resumen, se puede inferir que la proteína patatina está siendo degradada a la vez que es sintetizada en la brotación del tubérculo y la formación de la nueva planta, lo que explicaría por qué en nuestros resultados no se detectó una degradación clara y notable de sus isoformas. En el caso de la principal SSP de la judía común sí que se observaron isoformas degradadas en semillas germinadas (López-Pedrouso *et al.* 2014a). La síntesis y degradación simultánea de las isoformas de patatina en el tubérculo podría permitir que el suministro de nutrientes a la planta nueva que se está formando no cese. De esta forma se estaría movilizando la patatina hasta que se produzca la senescencia de los tejidos del tubérculo.

5.3. Fosforilación de la patatina en el ciclo de vida del tubérculo

5.3.1. Estatus de fosforilación de la patatina en tubérculos en estado de endodormancia

La detección de la presencia de isoformas de patatina fosforiladas en tubérculos en estado de endodormancia podría explicarse por la presencia de proteínas quinasas que la fosforilen. Este hecho no se ha demostrado en el caso de la patata, pero sí en semillas de la especie modelo *Arabidopsis* (Irar *et al.* 2006). Estos investigadores afirmaron que las SSPs de *Arabidopsis* pueden ser fosforiladas por la proteína quinasa CK2, la cual está presente en todas las células eucariotas. También se comprobó que la proteína quinasa CK2 está implicada en la fosforilación de proteínas cuya expresión está controlada por la fitohormona ABA (Plana *et al.* 1991; Goday *et al.* 1994). El tratamiento de semillas de *Arabidopsis* con la fitohormona ABA, que estimula la acumulación de determinadas proteínas, induce un incremento de la fosforilación en residuos de Tyr de SSPs de tipo globulina (Ghelis *et al.* 2008). Estos investigadores obtuvieron estos resultados empleando la técnica de la 2-DE combinada con el *western blot* para la detección de *spots* fosforilados, y la MALDI-TOF/TOF MS para la identificación de las proteínas. Extrapolando las investigaciones realizadas en semilla seca a lo que podría estar sucediendo en el tubérculo de la patata, resulta curioso el hecho de que la fitohormona ABA esté presente en altas cantidades en la fase de la endodormancia del tubérculo (Aksenova *et al.* 2013; Mani *et al.* 2014; Sonnewald and Sonnewald 2014). Las rutas de transducción de señales que regula la fitohormona ABA podrían modular directa o indirectamente la fosforilación de la patatina al mismo tiempo que esta VSP se acumula en el proceso de la tuberización.

5.3.2. Cambios en el estatus de fosforilación de la patatina en la liberación de la dormancia del tubérculo

El estatus de fosforilación de la patatina aumenta en el momento en que se produce una total liberación de la dormancia del tubérculo, o lo que es lo mismo, en la etapa de la brotación. Analizando semillas de: el altramuz blanco, el arroz, la colza, el girasol, la judía común y el trigo; se detectó un incremento del nivel de fosforilación de las proteínas de reserva durante el proceso de maduración de la semilla alcanzándose sus niveles más altos en semillas germinadas (Agrawal and Thelen 2006; Capraro *et al.* 2011; Quiroga *et al.* 2013; Han *et al.* 2014; López-Pedrouso *et al.* 2014a; Dong *et al.* 2015). Por consiguiente, parece que

el estatus de fosforilación de las proteínas de reserva aumenta en la liberación de la dormancia de la semilla.

Aunque no se ha demostrado, la proteína quinasa SnRK1 podría estar implicada en el mecanismo de fosforilación de la patatina en la liberación de la dormancia. En la revisión de Sonnewald and Sonnewald (2014) se explica lo que se conoce sobre la regulación del proceso de la brotación del tubérculo, en el cual la proteína quinasa SnRK1 tiene un rol relevante. Estos investigadores explican que en la dormancia del tubérculo los niveles de sacarosa en las células del parénquima, que son las que aportan nutrientes para el desarrollo del brote, son bajos. En el momento en que el nivel de sacarosa es escaso, la cantidad del disacárido trehalosa-6P disminuye. Si los niveles de trehalosa-6P son bajos, se activa la ruta de transducción de señales que regula la quinasa SnRK1 con el resultado final de favorecer la movilización de reservas (Debast *et al.* 2011). Esta movilización inducida por SnRK1 es iniciada por la rotura del almidón y por la activación del catabolismo de la fitohormona ABA (Debast *et al.* 2011; Sonnewald and Sonnewald 2014). En futuros estudios sería interesante analizar si la regulación de la salida de la dormancia del tubérculo inducida por parte de la quinasa SnRK1, de forma coordinada con las rutas de transducción de señales controladas por la fitohormona ABA, tiene un efecto indirecto sobre la fosforilación de la patatina.

5.3.3. Cambios en el estatus de fosforilación de la patatina en la brotación del tubérculo

Una vez se ha producido la liberación de la dormancia del tubérculo, las isoformas de patatina incrementan su estatus de fosforilación alcanzando su valor máximo en la etapa de la brotación. En apoyo de nuestros resultados, López-Pedrouso *et al.* (2014a) detectaron que varias isoformas de la principal SSP de la judía común aumentan su estatus de fosforilación al comparar semillas germinadas con semillas en estado de dormancia. Además, se ha detectado la presencia de isoformas fosforiladas de proteínas de reserva presentes en semillas germinadas de otras especies (Kovaleva *et al.* 2013; Quiroga *et al.* 2013; Han *et al.* 2014; Dong *et al.* 2015). Centrándonos en lo que pasa en las etapas iniciales de la germinación de la semilla, Dong *et al.* (2015) determinaron que la fosforilación de una isoforma de proteína de reserva minoritaria de semillas de trigo se fosforila preferentemente en la primera fase de la germinación. Los restantes estudios analizaron qué sucede con la fosforilación de las SSPs una vez que las semillas han completado todas las fases de su germinación, y serán discutidos en el último subapartado de la discusión.

Por otra parte, la mayor *PR* de las isoformas de patatina en los tubérculos brotados podría estar relacionada con la acción de una proteína quinasa dependiente de calcio, StCDPK1, que es expresada en las células meristemáticas localizadas bajo los ojos de los tubérculos en el proceso de la brotación (Santin *et al.* 2017). El promotor del gen StCDPK1 contiene un elemento regulador cis del factor embrionario de semillas de soja (SEF1) que se asocia con la regulación de la expresión de proteínas de reserva (Lessard *et al.* 1991; Santin *et al.* 2017). SEF1 está presente en el promotor de los genes que codifican para las isoformas de proteína de reserva de tipo globulina, y actúa favoreciendo la acumulación diferencial de SSPs en la morfogénesis de la semilla (Lessard *et al.* 1991). La presencia del elemento SEF1 en el promotor de la proteína quinasa StCDPK1 (Santin *et al.* 2017), podría ser indicativo de una posible relación entre la expresión de StCDPK1 y la movilización de VSPs en el caso del tubérculo de la patata. A su vez, resulta interesante el hecho de que la fitohormona GA incrementa su abundancia en tubérculos brotados, siendo su biosíntesis modulada por sensores de calcio en el proceso de la germinación de las semillas de *Arabidopsis* (Li *et al.* 2013; Sonnewald and Sonnewald 2014). Más concretamente, Li *et al.* (2013) detectaron que semillas de *Arabidopsis* mutantes con pérdida de función en un sensor de calcio determinado, presentan un patrón de expresión génica alterado en genes que codifican proteínas que intervienen en la ruta biosintética de la fitohormona GA. Estos investigadores también descubrieron que este sensor de calcio interactúa con una subunidad reguladora del complejo que conforma la proteína quinasa SnRK1. Como se explicó en el subapartado anterior, la proteína quinasa SnRK1 tiene una función reguladora en el proceso de liberación de la dormancia e inicio del proceso de la brotación del tubérculo. En futuras investigaciones sería interesante estudiar la posible existencia de una relación, directa o indirecta, entre la acción mediada por calcio de las proteínas quinasas StCDPK1 y SnRK1 junto con la fitohormona GA, que explique cuál es el mecanismo de fosforilación de la patatina.

5.3.4. Cambios en el estatus de fosforilación de la patatina en el crecimiento de la planta

El progreso del proceso de la brotación del tubérculo desencadena en la formación de una nueva planta, momento en el cual la patatina experimenta un descenso de su estatus de fosforilación en las isoformas de los polipéptidos no degradados. En consonancia con nuestros resultados, la totalidad de las formas no degradadas de las isoformas de la principal SSP de la judía común disminuyen su *PR* en las semillas germinadas (López-Pedrouso *et al.* 2014a). Estos investigadores detectaron que las isoformas de SSPs más fosforiladas son las

que se degradan en la transición de semilla seca a semilla germinada, a diferencia de las isoformas menos fosforiladas que no se movilizan, y por eso se produce un descenso de su *PR*. A su vez, se detectó una disminución de la tasa de fosforilación en residuos de Tyr de las proteínas de reserva del pino en el proceso de la germinación (Kovaleva *et al.* 2013). Más concretamente, se redujo su nivel de fosforilación sobre residuos de Tyr a los 3 días de haber superado la primera fase de la germinación de la semilla. Estos resultados los obtuvieron empleando las técnicas de la 1-DE y el *western blot* realizado con anticuerpos que detectan la presencia de fosforilaciones en residuos de Tyr. La desventaja de esta estrategia analítica radica en su imposibilidad de afirmar que exista un cambio en el estatus de fosforilación, puesto que no se relativiza considerando los cambios que se producen en la abundancia de proteína entre estadios.

Por otra parte, las proteínas de reserva de semillas de girasol y de arroz presentaron una mayor tasa de fosforilación en la etapa de la germinación (Quiroga *et al.* 2013; Han *et al.* 2014). En el caso del girasol, se señaló la posibilidad de que la fosforilación tenga una función en la movilización de las proteínas de reserva en la germinación de la semilla (Quiroga *et al.* 2013). Para ello, estos investigadores emplearon la técnica de la 1-DE combinada con un *immunoblotting* en el que utilizaron anticuerpos que reconocían la presencia de fosforilaciones sobre residuos aminoacídicos de Ser. Sin embargo, esta metodología no permitió cuantificar en qué isoformas específicas se producen los cambios tanto en el nivel de fosforilación como en la abundancia relativa. Dicha determinación sí fue posible en el estudio del nivel de fosforilación de las proteínas de reserva de tipo globulina en semillas de arroz utilizando la técnica 2-DE con la tinción Pro-Q DPS combinada con la MALDI-TOF/TOF MS (Han *et al.* 2014). De esta forma se determinó que al menos la mitad de las isoformas de proteínas de reserva incrementan su nivel de fosforilación alcanzando su valor más alto una vez se ha completado la germinación de la semilla.

5.4. Relación entre el estatus de fosforilación y la movilización de la patatina

Los resultados de este trabajo, junto con los estudios realizados hasta la fecha, muestran que la fosforilación parece tener una función relevante en el proceso de movilización de las proteínas de reserva tanto en semilla seca como en semilla vegetativa. En el caso de las etapas del ciclo biológico del tubérculo de patata que hemos analizado resulta curiosa la relación que se detectó entre los cambios en el estatus de fosforilación de la patatina

y las variaciones en su abundancia relativa. En el proceso de liberación de la endodormancia se ha detectado una acumulación de patatina, en especial de sus isoformas más fosforiladas (Kuras PT3K1), a la vez que se incrementó su estatus de fosforilación de manera gradual alcanzando su valor máximo en la etapa de la brotación. De forma general, parece que las proteínas de reserva incrementan su nivel de fosforilación en el proceso de maduración de la semilla y su consiguiente germinación, lo que incluye a la fase de la liberación de la dormancia (Agrawal and Thelen 2006; Capraro *et al.* 2011; Quiroga *et al.* 2013; Han *et al.* 2014; López-Pedrouso *et al.* 2014a; Dong *et al.* 2015). Este aumento en el estatus de fosforilación de las proteínas de reserva se produce simultáneamente con una acumulación de sus isoformas más fosforiladas, que serán las que se degraden de forma preferencial en el proceso de germinación y desarrollo de una nueva planta.

A continuación de la liberación de la dormancia el tubérculo brotado continúa su desarrollo y termina generando una planta, en esta transición se observó un descenso del estatus de fosforilación de la patatina concurrente con una disminución de su abundancia relativa. La disminución de la PR es más pronunciada en las isoformas de patatina más fosforiladas (Kuras PT3K1). De forma análoga a lo observado en las SSPs de la judía común (López-Pedrouso *et al.* 2014a), parece que las enzimas proteolíticas degradan de forma preferencial a las isoformas de patatina más fosforiladas. Una posible explicación de por qué sucede esto la hallamos en la observación de que el nivel de fosforilación/desfosforilación puede desestabilizar la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas de reserva facilitando así su rotura proteolítica (Wan *et al.* 2007). La patatina es un dímero de 88 kDa formado por subunidades de aproximadamente 366 aminoácidos (17 Tyr), con cargas negativas y positivas distribuidas en sus cadenas laterales, que están estructurados en hélices α y hojas plegadas β (Pots *et al.* 1998; Ralet and Guéguen 2000; Rydel *et al.* 2003). Teniendo en cuenta esto, establecemos la hipótesis de que un exceso de fosfatos con carga negativa en isoformas de patatina altamente fosforiladas puede desestabilizar su estructura favoreciendo así su degradación proteolítica. Para comprobar la veracidad de esta hipótesis es necesario estudiar en qué posiciones de la secuencia aminoacídica están los sitios de fosforilación, determinar su estequiometría y establecer qué interacciones producen en la secuencia terciaria y cuaternaria de la patatina.





6. CONCLUSIONES



1. La optimización y obtención de patrones de alta resolución por medio de la técnica de la electroforesis bidimensional (2-DE) y su combinación con la espectrometría de masas (MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF MS) es una excelente metodología proteómica para la identificación y separación de las isoformas de la principal proteína de reserva del tubérculo de la patata (*Solanum tuberosum* L.), la patatina.
2. En tubérculos en estado de rotura de brote se corroboró que la glicosilación es uno de los principales factores que contribuyen a la heterogeneidad en la masa molecular relativa (M_r) de la patatina. Hecho que se dedujo por medio de la utilización de un protocolo de desglicosilación enzimática con la enzima PNGasa F junto con la técnica 2-DE optimizada.
3. El estudio de tubérculos en estado de rotura de brote mediante la 2-DE optimizada junto con protocolos de tinción de fosfoproteínas con Pro-Q DPS y tratamientos de desfosforilación química con ácido fluorhídrico piridina (HF-P), propició por primera vez la identificación de las isoformas de patatina como fosfoproteínas. A su vez, la desfosforilación química con HF-P resolvió la cuantificación de la tasa de fosforilación (PR) de las isoformas de patatina, que son altamente fosforiladas y muestran niveles de fosforilación muy diferentes.
4. Por medio de esta metodología proteómica también se identificó y cuantificó la presencia de fosforilaciones en isoformas de patatina presentes en tubérculos en estado de endodormancia, brotación y crecimiento de la planta. La comparación del estatus de fosforilación de la patatina en las cuatro etapas analizadas reveló que la PR se incrementa significativamente en la transición de los tubérculos desde la etapa de endodormancia hasta la de brotación. Este hecho es concurrente con una acumulación de las isoformas de patatina de tipo Kuras en la salida de la endodormancia del tubérculo. El estatus de fosforilación de las isoformas de patatina de tipo Kuras es más elevado que el de las isoformas de patatina de tipo no-Kuras en el conjunto de las etapas del tubérculo analizadas. Por consiguiente, se deduce que en la liberación de la endodormancia del tubérculo se acumulan las isoformas de patatina más fosforiladas.

5. El estatus de fosforilación de la patatina y su abundancia disminuyen significativamente al compararse los tubérculos que han formado una nueva planta con los tubérculos brotados. A su vez, la *PR* de las isoformas de patatina de tipo Kuras decrece de forma significativa en tubérculos que han desarrollado una nueva planta. Por lo que se deduce que la proteólisis de la patatina no se produce de forma aleatoria, sino que las isoformas de tipo Kuras son degradadas de forma preferencial.
6. Los resultados del estudio permiten concluir por primera vez que la fosforilación es un factor relevante en la movilización de una proteína de reserva vegetativa (VSP), como es el caso de la patatina. Los cambios en el estatus de fosforilación se asocian con la movilización de la patatina en la liberación de la endodormancia del tubérculo, así como en el proceso de la brotación.





7. BIBLIOGRAFÍA



- Agrawal, G.K., Pedreschi, R., Barkla, B. J., Brindschedler, L.V., Cramer, R., Sarkar, A., Renaut, J., Job, D., Rakwal, R. (2012). Translational plant proteomics: a perspective. *J. Proteomics* 75: 4588–4601.
- Agrawal, G.K., Thelen, J.J. (2005). Development of a simplified, economical polyacrylamide gel staining protocol for phosphoproteins. *Proteomics* 5: 4684–4688.
- Agrawal, G.K., Thelen, J.J. (2006). Large-scale identification and quantitative profiling of phosphoproteins expressed during seed filling in oilseed rape. *Mol. Cell Proteomics* 5: 2044–2059.
- Aksenova, N.P., Sergeeva, L.I., Konstantinova, T.N., Golyanovskaya, S.A., Kolachevskaya, O.O., Romanov, G.A. (2013). Regulation of potato tuber dormancy and sprouting. *Russ. J. Plant Physiol.* 60: 301–312.
- Bachem, C., van der Hoeven, R., Lucker, J., Oomen, R., Casarini, E., Jacobsen, E., Visser, R. (2000). Functional genomic analysis of potato tuber life-cycle. *Potato Res.* 43: 297–312.
- Bárta, J., Bártová, V., Zdráhal, Z., Šedo, O. (2012). Cultivar variability of patatin biochemical characteristics: table versus processing potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 60: 4369–4378.
- Bártová, V., Bárta, J., Brabcová, A., Zdráhal, Z., Horáčková, V. (2015). Amino acid composition and nutritional value of four cultivated South American potato species. *J. Food Compost. Anal.* 40: 78–85.
- Bauw, G., Nielsen, H.V., Emmersen, J., Nielsen, K.L., Jørgensen, M., Welinder, K.G. (2006). Patatin, Kunitz protease inhibitors and other major proteins in tuber of potato cv. Kuras. *FEBS J.* 273: 3569–3584.
- Beardmore, T., Wetzal, S., Burgess, D., Charest, P.J. (1996). Characterization of seed storage proteins in *Populus* and their homology with *Populus* vegetative storage proteins. *Tree Physiol.* 16: 833–840.

- Bennett, T., Scheres, B. (2010). Root development-two meristems for the price of one? *Curr. Top. Dev. Biol.* 91: 67–102.
- Berckmans, B., de Veylder, L. (2009). Transcriptional control of the cell cycle. *Plant Biol.* 12: 599–605.
- Bernal, J., López-Pedrouso, M., Franco, D., Bravo, S., García, L., Zapata, C. (2017). Identification and mapping of phosphorylated isoforms of the major storage protein of potato based on two-dimensional electrophoresis. In: Jimenez- Lopez, J.C. (ed.), *Advances in Seed Biology* (pp. 65–82). Rijeka, Croatia: InTech.
- Bernal, J., Mouzo, D., López-Pedrouso, M., García, L., Franco, D., Zapata, C. (2019). The major storage protein in potato tuber is mobilized by a mechanism dependent on its phosphorylation status. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 1889.
- Bevan, M., Barker, R., Goldsbrough, A., Jarvis, M., Kavanagh, T., Iturriaga, G. (1986). The structure and transcription start site of a major potato tuber protein gene. *Nucleic Acids Res.* 14: 4625–4638.
- Bini, L., Pallini, V., Hochstrasser, D.F., Sanchez, J-C. (2007). From genome to proteome: back to the future. *Proteomics* 7: 1561–1563.
- Borisjuk, L., Neuberger, T., Schwender, J, Heinzl, N., Sunderhaus, S., Fuchs, J., Hay, J.O., Tschiersch, H., Braun, H-P., Denolf, P., Lambert, B., Jakob, P.M., H. Rolletschka. (2013). Seed architecture shapes embryo metabolism in oilseed rape. *Plant Cell* 25: 1625–1640.
- Burton, W.G. (1989). *The Potato*. Essex (UK): Longman Scientific and Technical.
- Calliope, S.R., Lobo, M.O., Sammán, N.C. (2018). Biodiversity of andean potatoes: morphological, nutritional and functional characterization. *Food Chem.* 238: 42–50.
- Calvete, J. (2014). Challenges and prospects of proteomics of non-model organisms. *J. Proteomics* 105: 1-4.
- Campbell, M.A., Suttle, J.C., Sell, T.W. (1996). Changes in cell cycle status and expression of p34cdc2 kinase during potato tuber meristem dormancy. *Physiol. Plant.* 98: 743–752.

- Campbell, M., Segear, E., Beers, L., Knauber, D., Suttle, J. (2008). Dormancy in potato tuber meristems: chemically induced cessation in dormancy matches the natural process based on transcript profiles. *Funct. Integr. Genomics* 8: 317–328.
- Capraro, J., Scarafoni, A., Magni, C., Consonni, A., Duranti, M.M. (2011). Proteomic studies on the lupin seed storage proteins phosphorylation. In: International Conference on Food-omics. Cesena, Italy.
- Carpentier, S.C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R., Panis, B. (2005). Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics* 5: 2497–2507.
- Chao, W.S., Foley, M.E., Horvath, D.P., Anderson, J.V. (2007). Signals regulating dormancy in vegetative buds. *Int. J. Plant Devel. Biol.* 1: 49–56.
- Chibani, K., Ali-Rachedi, S., Job, C., Job, D., Jullien, M., Grappin, P. (2006). Proteomic analysis of seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 142: 1493–1510.
- CIP (2018). International Potato Center. URL <https://cipotato.org/crops/potato/potato-facts-and-figures/>, visitado julio de 2018.
- Claassens, M.M.J., Vreugdenhil, D. (2000). Is dormancy breaking of potato tubers the reserve of tuber initiation? *Potato Res.* 43: 347–369.
- Dam, S., Thaysen-Andersen, M., Stenkjær, E., Lorentzen, A., Roepstorff, P., Packer, N.H., Stougaard, J. (2013). Combined N-glycome and N-glycoproteome analysis of the *Lotus japonicus* seed globulin fraction shows conservation of protein structure and glycosylation in legumes. *J. Proteome Res.* 12: 3383–3392.
- Debast, S., Nunes-Nesi, A., Hajirezaei, M.R., Hofmann, J., Sonnewald, U., Fernie, A.R., Börnke, F. (2011) Altering trehalose-6-phosphate content in transgenic potato tubers affects tuber growth and alters responsiveness to hormones during sprouting. *Plant Physiol.* 156:1754–1771.
- de la Fuente, M., Borrajo, A., Bermúdez, J., Lores, M., Alonso, J., López, M., Santalla, M., de Ron, A.M., Zapata, C., Alvarez, G. (2011). 2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *J. Proteomics* 74: 262–267.

- de la Fuente, M., López-Pedrouso, M., Alonso, J., Santalla, M., de Ron, A.M., Alvarez, G., Zapata, C. (2012). In-depth characterization of the phaseolin protein diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) based on two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Food Technol. Biotechnol.* 50: 315–325.
- Deng, Z.Y., Gong, C.Y., Wang, T. (2013). Use of proteomics to understand seed development in rice. *Proteomics* 13: 1784–1800.
- Desiré, S., Couillerot, J.P., Helbert, J.L., Vasseur, J. (1995). Protein changes in *Solanum tuberosum* during storage and dormancy breaking of *in vitro* microtubers. *Plant Physiol. Biochem.* 33: 479–487.
- de Souza Cândido, E., Pinto, M.F.S., Pelegrini, P.B., Lima, T.B., Silva, O.N., Pogue, R., Grossi-de-Sá, M.F., Franco, O.L. (2011). Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *FASEB J.* 25: 3290–3305.
- Dong, K., Zhen, S., Cheng, Z., Cao, H., Ge, P., Yah, Y. (2015). Proteomic analysis reveals key proteins and phosphoproteins upon seed germination of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Front. Plant Sci.* 6: 1017.
- Dunaevsky, Y.F., Belozersky, M.A. (1989). The role of cysteine proteinase and carboxypeptidase in the breakdown of storage proteins in buckwheat seeds. *Planta* 179: 316–322.
- Duranti, M., Scarafoni, A., Gius, C., Negri, A., Faoro, F. (1994). Heat-induced synthesis and tunicamycin-sensitive secretion of the putative storage glycoprotein conglutin γ from mature lupin seeds. *Eur. J. Biochem.* 222: 387–393.
- Dutt, S., Manjul, A.S., Raigond, P., Singh, B., Siddappa, S., Bhardwaj, V., Kawar, P.G., Patil, V.U., Kardile, H.B. (2017). Key players associated with tuberization in potato: potential candidates for genetic engineering. *Crit. Rev. Biotechnol.* 37: 942–957.
- Efron, B. (1982). *The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans*. CBMS-NSF Regional Conference Series in Applied Mathematics No. 38. Philadelphia: Society for Industrial and Applied Mathematics.
- Facchiano, A.M., Colonna, G., Chiosi, E., Illiano, G., Spina, A., Lafiandra, D., Buonocore, F. (1999). *In vitro* phosphorylation of high molecular weight glutenin subunits from wheat endosperm. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 931–938.

- FAOSTAT (2013) FAO Statistical data base for agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). URL <http://faostat.fao.org>, visitado julio de 2018.
- FAOSTAT (2016) FAO Statistical data base for agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). URL <http://faostat.fao.org>, visitado julio de 2018.
- Faurobert, M., Pelpoir, E., Chaïb, J. (2007). Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. *Methods Mol. Biol.* 355: 9–14.
- Franco, D., Mato, A., Salgado, F.J., López-Pedrouso, M., Carrera, M., Bravo, S., Parrado, M., Gallardo, J.M., Zapata, C. (2015). Tackling proteome changes in the *longissimus thoracis* bovine muscle in response to pre-slaughter stress. *J. Proteomics* 122: 73–85.
- Friso, G., van Wijk, K.J. (2015). Posttranslational protein modifications in plant metabolism. *Plant Physiol.* 169: 1469–1487.
- Fujiwara, T., Nambara, E., Yamagishi, K., Goto, D.B., Naito, S. (2002). Storage proteins. *Arabidopsis Book* 1: e0020.
- Gacek, K., Bartkowiak-Broda, I., Batley, J. (2018). Genetic and molecular regulation of seed storage protein nutritional value of oilseed rape (*Brassica napus* L.) seeds. *Front. Plant Sci.* 9: 890.
- Gallardo, K., Job, C., Groot, S.P., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., Job, D. (2002). Proteomics of *Arabidopsis* seed germination. A comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. *Plant Physiol.* 129: 823–837.
- Gallardo, K., Firnhaber, C., Zuber, H., Hélicher, D., Belghazi, M., Henry, C., Küster, H., Thompson, R. (2007). A combined proteome and transcriptome analysis of developing *Medicago truncatula* seeds evidence for metabolic specialization of maternal and filial tissues. *Mol. Cell. Proteomics* 6: 2165–2179.
- Ganal, M.W., Bonierbale, M.W., Roeder, M.S., Park, W.D., Tanksley, S.D. (1991). Genetic and physical mapping of the patatin genes in potato and tomato. *Mol. Gen. Genet.* 225: 501–509.

- Gao, J., Thelen, J. J., Dunker, K., Xu, D. (2010). Musite, a tool for global prediction of general and kinase-specific phosphorylation sites. *Mol. Cell Proteomics* 9: 2586-2600.
- Ghatak, A., Chaturvedi, P., Paul, P., Agrawal, G.K., Rakwal, R., Kim, S.T., Weckwerth, W., Gupta, R. (2017). Proteomics survey of Solanaceae family: current status and challenges ahead. *J. Proteomics* 169: 41–57.
- Ghelis, T., Bolbach, G., Clodic, G., Habricot, Y., Miginiac, E., Sotta, B., Jeannette, E. (2008). Protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases are involved in abscisic acid-dependent processes in *Arabidopsis* seeds and suspension cells. *Plant Physiol.* 148: 1668–1680.
- Goday, A., Jensen, A.B., Culláñez-Macià, F.A., Albà, M.M., Figueras, M., Serratos, J., Torrent, M., Pagès, M. (1994). The maize abscisic acid-responsive protein rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell* 6: 351–360.
- Gonzalez-Sanchez, M.B., Lanucara, F., Helm, M., Evers, C.E. (2013). Attempting to rewrite history: challenges with the analysis of histidine-phosphorylated peptides. *Biochem. Soc. Trans.* 41: 1089–1095.
- Görg, A., Weiss, W., Dunn, M.J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4: 3665–3685.
- Görg, A., Drews, O., Lück, C., Weiland, F., Weiss, W. (2009). 2-DE with IPGs. *Electrophoresis* 30: S122–S132.
- Gosti, F., Beaudoin, N., Serizet, C., Webb, A.A., Vartanian, N., Giraudat, J. (1999). ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell* 11, 1897–1910.
- Grupta, R., Min, C.W., Wang, Y., Kim, Y.C., Agrawal, G.K., Rakwal, R., Kim, S.T. (2016). Expect the unexpected enrichment of “hidden proteome” of seeds and tubers by depletion of storage proteins. *Front. Plant Sci.* 7: 761.
- Guo, G., LV, D., Yan, X., Subburaj, S., Ge, P., Li, X., Hu, Y., Yan, Y. (2012). Proteome characterization of developing grains in bread wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biol.* 12: 147.

- Han, C., Wang, K., Yang, P. (2014). Gel-based comparative phosphoproteomic analysis on rice during germination. *Plant Cell Physiol.* 55: 1376–1394.
- Hancock, R.D., Roberts, A.G., Viola, R. (2008). A role for symplastic gating in the control of the potato tuber life cycle. *Plant Signal. Behav.* 3: 27–29.
- Hartmann, A., Senning, M., Hedden, P., Sonnewald, U., Sonnewald, S. (2011). Reactivation of meristem activity and sprout growth in potato tubers require both cytokinin and gibberellin. *Plant Physiol.* 155: 776–796.
- Hashiguchi, A., Komatsu, S. (2017). Posttranslational modifications and plant-environment interaction. *Methods Enzymol.* 586: 97–113.
- Hemberg, T. (1985). Potato rest. In: Li, P.H. (ed.), *Potato Physiology* (pp. 354–388). Orlando, USA: Academic Press.
- Hendriks, T., Vreugdenhil, D., Stiekema, W. J. (1991). Patatin and four serine proteinase inhibitor genes are differentially expressed during potato tuber development. *Plant Mol. Biol.* 17: 385–394.
- Huber, S.C. (2007). Exploring the role of protein phosphorylation in plants: from signalling to metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* 35: 28–32.
- Irar, S., Oliveira, E., Montserrat, P., Goday, A. (2006). Towards the identification of late-embryogenic-abundant phosphoproteome in *Arabidopsis* by 2-DE and MS. *Proteomics* 6: S175–S185.
- Jensen, O.N., Wilm, M., Shevchenko, A., Mann, M. (1999). Sample preparation methods for mass spectrometric peptide mapping directly from 2-DE gels. *Methods Mol. Biol.* 112: 513–30.
- Jørgensen, M., Stensballe, A., Wellinder, K.G. (2011). Extensive post-translational processing of potato tuber storage proteins and vacuolar targeting. *FEBS J.* 278: 4070–4087.
- Jorrín-Novo, J.V. (2014). Seed proteomics. In: Jorrin-Novo, J. V., Komatsu, S., Weckwerth, W., Wienkoop, S. (eds.), *Plant Proteomics: Methods and Protocols* (pp. 3–13). New York, USA: Humana Press.

- Kärenlampi, S.O., White, P.J. (2009). Potato, proteins, lipids, and minerals. In: Singh, J., Kaur, L., (Eds.), *Advances in potato chemistry and technology* (pp. 99–125). Amsterdam, The Netherlands: Academic Press.
- Kersten, B., Agrawal, G.K., Durek, P., Neigenfind, J., Schulze, W., Walther, D., Rakwal, R. (2009). Plant phosphoproteomics: an update. *Proteomics* 9: 964–988.
- Kita, K., Okumura, N., Takao, T., Watanabe, M., Matsubara, T., Nishimura, O., Nagai, K. (2006). Evidence for phosphorylation of rat liver glucose-regulated protein 58, GRP58/ERp57/ER-60, induced by fasting and leptin. *FEBS Lett.* 580: 199–205.
- Kloosterman, B., Vorst, O., Hall, R.D., Visser, R.G.F., Bachem, C.W. (2005). Tuber on a chip: differential gene expression during potato tuber development. *Plant Biotechnol. J.* 3: 505–519.
- Korableva, N.P. Platonova, T.A. (1995). Biochemical aspects of hormonal regulation of plant dormancy and immunity. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 31: 103–114.
- Kovaleva, V., Cramer, R., Krynytskyy, H., Gout, I., Gout, A. (2013). Analysis of tyrosine phosphorylation and phosphotyrosine-binding proteins in germinating seeds from Scots pine. *Plant Physiol. Biochem.* 67: 33–40.
- Kumar, G.N., Houtz, R.L., Knowles, N.R. (1999). Induced protein modifications and increased proteolysis in potato seed-tubers. *Plant Physiol.* 119: 88–99.
- Kumari, N., Kofi, K.J., Grimbs, S., D'Souza, R.N., Kuhnert, N., Vrancken, G., Ullrich, M.S. (2016). Biochemical fate of vicilin storage protein during fermentation and drying of cocoa beans. *Food Res. Int.* 90: 53–65.
- Kuyama, H., Toda, C., Watanabe, M., Tanaka, K., Nishimura, O. (2003). An efficient chemical method for dephosphorylation of phosphopeptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17: 1493–1496.
- Lachman, J., Hamouz, K., Orsák, M. (2005). The effect of selected factors on the content of protein and nitrates in potato tubers. *Plant Soil Environ.* 51: 431–438.
- Lang, G.A., Early, J.D., Martin, G.C., Darnell, R.L. (1987). Endo-, para- and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience* 22: 371–377.

- Lattová, E., Brabcová, A., Bartová, V., Potěšil, D., Bárta, J., Zdráhal, Z. (2015). N-Glycome profiling of patatins from different potato species of *Solanum* genus. *J. Agric. Food Chem.* 63: 3243–3250.
- Lehesranta, S.J., Davies, H.V., Shepherd, L.V.T., Nunan, N., McNicol, J.W., Auriola, S., Koistinen, K.M., Suomalainen, S., Kokko, H.J., Kärenlampi, S.O. (2005). Comparison of tuber proteomes of potato varieties landraces, and genetically modified lines. *Plant Physiol.* 138: 1690–1699.
- Lehesranta, S.J., Davies, H.V., Shepherd, L.V.T., Koistinen, N.M., Massat, N., Nunan, N., McNicol, J.W., Kärenlampi, S.O. (2006). Proteomic analysis of the potato tuber life cycle. *Proteomics* 6: 6042–6052.
- Lessard, P.A., Allen, R.D., Bernier, F., Crispino, J.D., Fujiwara, T., Beachy, R.N. (1991). Multiple nuclear factors interact with upstream sequences of differentially regulated β -conglycinin genes. *Plant Mol. Biol.* 16: 397–413.
- Li, Z-L., Xu, Z-S., Chen, Y., He, G.-Y., Yang, G.-X., Chen, M., Li, L-C., Ma, Y-Z. (2013). A novel role for *Arabidopsis* CBL1 in affecting plant responses to glucose and gibberellin during germination and seedling development. *PLoS One* 8: e56412.
- Lin, S.K., Chang, M.C., Tsai, Y.G., Lur, H.S. (2005). Proteomic analysis of the expression of proteins related to rice quality during caryopsis development and the effect of high temperature on expression. *Proteomics* 5: 2140–2156.
- Lioi, L., Bollini, R. (1984). Contribution of processing events to the molecular heterogeneity of four banding types of phaseolin, the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol. Biol.* 3: 345–353.
- Liu, Y-W., Han, C-H., Lee, M-H., Hsu, F-L., Hou, W-C. (2003). Patatin, the tuber protein of potato (*Solanum tuberosum* L.) exhibits antioxidant activity *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4389–4393.
- López-Otín, C., Bond, J.S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol. Chem.* 283: 30433–30437.
- López-Pedrouso, M., Alonso, J., Zapata, C. (2014a). Evidence for phosphorylation of the major seed storage protein of the common bean and its phosphorylation-dependent degradation during germination. *Plant Mol. Biol.* 84: 415–28.

- López-Pedrouso, M., Bernal, J., Franco, D., Zapata, C. (2014b). Evaluating Two-dimensional electrophoresis profiles of the protein phaseolin as markers of genetic differentiation and seed protein quality in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *J. Agric. Food Chem.* 62: 7200–7208.
- Ludwików, A. (2015). Targeting proteins for proteasomal degradation—a new function of Arabidopsis ABI1 protein phosphatase 2C. *Front. Plant Sci.* 6: 310.
- Macdonald, M.M., Osborne, D.J. (1988). Synthesis of nucleic acids and protein in tuber buds of *Solanum tuberosum* during dormancy and early sprouting. *Physiol. Plant* 73: 392–400.
- Mani, F., Bettaieb, T., Doudech, N., Hannachi, C. (2014). Physiological mechanisms for potato dormancy release and sprouting: a review. *Afr. Crop Sci. J.* 2: 155–174.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912–1934.
- Mehta-D'souza, P. (2012). Detection of glycoproteins in polyacrylamide gels using Pro-Q Emerald 300 Dye, a fluorescent periodate schiff-base stain. *Methods Mol. Biol.* 869: 561–566.
- Meyer, L.J., Gao, J., Xu, D., Thelen, J.J. (2012). Phosphoproteomic analysis of seed maturation in *Arabidopsis*, rapeseed, and soybean. *Plant Physiol.* 159: 517–528.
- Miernyk, J.A. (2014). Seed proteomics. In: Jorin-Novo, J. V., Komatsu, S., Weckwerth, W., Wienkoop, S. (eds.), *Plant Proteomics: Methods and Protocols* (pp. 361–377). New York, USA: Humana Press.
- Miernyk, J.A., Hajduch, M. (2011). Seed proteomics. *J. Proteomics* 74: 389–400.
- Mignery, G.A., Pikaard, C.S., Hannapel, D.J., Park, W.D. (1984). Isolation and sequence analysis of cDNAs for the major tuber protein, patatin. *Nucleic Acids Res.* 12: 7987–8000.
- Mignery, G.A., Pikaard, C.S., Park, W.D. (1988). Molecular characterization of the patatin multigene family of potato. *Gene* 62: 27–44.

- Mitrus, J., Stankiewicz, Steć, E., Kamecki, M., Starczewski, J. (2003). The influence of selected cultivation on the content of total protein and amino acids in the potato tubers. *Plant Soil Environ.* 49: 131–134.
- Monternarh, M., Götz, C. (2018). Ecto-protein kinase CK2, the neglected form of CK2 (Review). *Biomed. Rep.* 8: 307–313.
- Mouzo, D., Bernal, J., López-Pedrouso, M., Franco, D., Zapata, C. (2018a). Advances in the biology of seed and vegetative storage proteins based on two-dimensional electrophoresis coupled to mass spectrometry. *Molecules* 23: 2462.
- Mouzo, D., López-Pedrouso, M., Bernal, J., García, L., Franco, D., Zapata, C. (2018b). Association of patatin-based proteomic distances with potato (*Solanum tuberosum* L.) quality traits. *J. Agric. Food Chem.* 66: 11864–11872.
- Mulekar, J.J., Huq, E. (2014). Expanding roles of protein kinase CK2 in regulating plant growth and development. *J. Exp. Bot.* 65: 2883–2893.
- Mullins, E., Milbourne, D., Petti, C., Doyle-Prestwich, B.M., Meade, C. (2006). Potato in the age of biotechnology. *Trends Plant Sci.* 11: 254–260.
- Müntz, K. (1998). Deposition of storage proteins. *Plant Mol. Biol.* 38: 77–99.
- Müntz, K., Belozersky, M.A., Dunaevsky, Y.E., Schlereth, A., Tiedemann, J. (2001). Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *J. Exp. Bot.* 52: 1741–1752.
- NCBI (1975). National Center for Biotechnology Information (NCBI). URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh?Db=mesh&Cmd=DetailsSearch&Term=%22Isoelectric+Point%22%5BMeSH+Terms%5D>, visitado julio de 2018.
- NCBI (1999). National Center for Biotechnology Information (NCBI). URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh?Db=mesh&Cmd=DetailsSearch&Term=%22Protein+Isoforms%22%5BMeSH+Terms%5D>, visitado julio de 2018.
- O'Farrell. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007–4021.
- Ortea, I., O'Connor, G., Maquet, A. (2016). Review on proteomics for food authentication. *J. Proteomics* 147: 212–225.

- Paaren, H.E., Slightom, J.L., Hall, T.C., Inglis, A.S., Blagrove, R.J. (1987). Purification of a seed glycoprotein: N-terminal and deglycosylation analysis of phaseolin. *Phytochemistry* 26: 335–343.
- Paiva, E., Lister, R.M., Park, W.D. (1983). Induction and accumulation of major tuber proteins of potato in stems and petioles. *Plant Physiol.* 71: 161–168.
- Park, W.D., Blackwood, C., Mignery, G.A., Hermodson, M.A., Lister, R.M. (1983). Analysis of the heterogeneity of the 40,000 molecular weight tuber glycoprotein of potatoes by immunological methods and by NH₂-terminal sequence analysis. *Plant Physiol.* 71: 156–160.
- Peterson, L., Barker, W.G., Howarth, M.J. (1985). Development and structure of tubers. In: Li, P.H. (ed.), *Potato physiology* (pp. 123–152). Orlando, USA: Academic Press.
- Pikaard, C.S., Brusca, J.S., Hannapel, D.J., Park, W.D. (1987). The two classes of genes for the major potato tuber protein, patatin, are differentially expressed in tubers and roots. *Nucleic Acids Res.* 15: 1979–1994.
- Plana, M., Itarte, E., Eritja, R., Goday, A., Pagès, M., Martínez, M.C. (1991). Phosphorylation of maize rab-17 protein by casein kinase 2. *J. Biol. Chem.* 33: 22510–22514.
- Pots, A.M., de Jongh, H.H.J., Gruppen, H., Hamer, R.J., Voragen, A.G.J. (1998). Heat-induced conformational changes of patatin, the major potato tuber protein. *Eur. J. Biochem.* 252: 66–72.
- Pots, A.M., Gruppen, H., Hessing, M., van Boekel, M.A.J.S., Voragen, A.G.J. (1999a). Isolation and characterization of patatin isoforms. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4587–4592.
- Pots, A.M., Gruppen, H., van Diepenbeek, R., van der Lee, J.J., van Boekel, M.A.J.S., Wijngaards, G., Voragen, A.G.J. (1999b). The effect of storage of whole potatoes of three cultivars on the patatin and protease inhibitor content; a study using capillary electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* 79: 1557–1564.
- Quiroga, I., Regente, M., Pagnussat, L., Maldonado, A., Jorrín, J., de la Canal, L. (2013). Phosphorylated 11S globulins in sunflower seeds. *Seed Sci. Res.* 23: 199–204.

- Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., Lelong, C. (2010). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future. *J. Proteomics*, 73, 2064–2077.
- Rabilloud, T. (2014). How to use 2D gel electrophoresis in plant proteomics. In: Jorriin-Novo, J. V., Komatsu, S., Weckwerth, W., Wienkoop, S. (eds.), *Plant Proteomics: Methods and Protocols* (pp. 43–50). New York, USA: Humana Press.
- Rabilloud, T., Lelong, C. (2011). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *J. Proteomics* 74: 1829–1841.
- Racusen, D., Foote, M. (1980). A major soluble glycoprotein of potato tubers. *J. Food Biochem.* 4: 43–52.
- Racusen, D., Weller, D. L. (1984). Molecular weight of patatin, a major potato tuber protein. *J. Food Biochem.* 8: 103–107.
- Ralet, M-C., Guéguen, J. (2000). Fractionation of potato proteins: solubility, thermal coagulation and emulsifying properties. *Lebensm. Wiss. Technol.* 33: 380–387.
- Rodríguez Amado, I., Franco, D., Sánchez, M., Zapata, C., Vázquez, J.A. (2014). Optimisation of antioxidant extraction from *Solanum tuberosum* potato peel waste by surface response methodology. *Food Chem.* 165: 290–299.
- Ronning, C.M., Stegalkina, S.S., Ascenzi, R.A., Bougri, O., Hart, A.L., Utterbach, T.R., Vanaken, S.E., Riedmuller, S.B., White, J.A., Cho, J., *et al.* (2003). Comparative analyses of potato expressed sequence tag libraries. *Plant Physiol.* 131: 419–429.
- Rydel, T. J., Williams, J. M., Krieger, E., Moshiri, F., Stallings, W. C., Brown, S. M., Pershing, J. C., Purcell, J. P., Alibhai, M. F. (2003). The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad. *Biochemistry* 42: 6696–6708.
- Santin, F., Bhogale, S., Fantino, E., Grandellis, C., Banerjee, A.K., Ulloa, R.M. (2017). *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. *Physiol. Plant.* 159: 244–261.

- Santos, C.N., Alves, M., Oliveira, A., Ferreira, R.B. (2013). β -N-acetylhexosaminidase involvement in α -conglutin mobilization in *Lupinus albus*. *J. Plant Physiol.* 170: 1047–1056.
- Saravanan, R.S., Rose, J.K.C. (2004). A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* 4: 2522–32.
- Schlereth, A., Standhardt, D., Mock, H-P., Müntz, K. (2001). Stored cysteine proteinases start globulin mobilization in protein bodies of embryonic axes and cotyledons during vetch (*Vicia sativa* L.) seed germination. *Planta* 212: 718–727.
- Schulze, W.X., Yao, Q., Xu, D. (2015). Databases for plant phosphoproteomics. In: Schulze, W.X. (ed.), *Plant Phosphoproteomics: Methods and Protocols* (pp. 207–216). New York, USA: Humana Press.
- Senning, M., Sonnewald, U., Sonnewald, S. (2010). Deoxyuridine triphosphatase expression defines the transition from dormant to sprouting potato tuber buds. *Mol. Breeding* 26: 525–531.
- Shewry, P.R.; Napier, J.A.; Tatham, A.S. (1995). Seed storage proteins: Structures and biosynthesis. *Plant Cell* 7: 945–956.
- Shewry, P.R. (2003). Tuber storage proteins. *Ann. Bot.* 91: 755–769.
- Shutov, A.D., Vaintraub, I.A. (1987). Degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry* 26: 1557–1566.
- Silva-Sanchez, C., Li, H., Chen, S. (2015). Recent advances and challenges in plant phosphoproteomics. *Proteomics* 15: 1127–1141.
- Sonnewald, S., Sonnewald, U. (2014). Regulation of potato tuber sprouting. *Planta* 239: 27–38.
- Sonnewald, U., Studer, D., Rocha-Sosa, M., Willmitzer, L. (1989a). Immunocytochemical localization of patatin, the major glycoprotein in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Planta* 178: 176–183.
- Sonnewald, U., Sturm, A., Chrispeels, M.J., Willmitzer, L. (1989b). Targeting and glycosylation of patatin the major potato tuber protein in leaves of transgenic tobacco. *Planta* 179: 171–180.

- Staswick, P.E. (1990). Novel regulation of vegetative storage protein genes. *Plant Cell* 2: 1–6.
- Stiekema, W. J., Heidekamp, F., Dirkse, W. G., van Beckum, J., de Haan, P., ten Bosch, C., Louwerse, J. D. (1988). Molecular cloning and analysis of four potato tuber mRNAs. *Plant Mol. Biol.* 11: 255–269.
- Strasser, R. (2014). Biological significance of complex N-glycans in plants and their impact on plant physiology. *Front. Plant Sci.* 5, 363.
- Strasser, R. (2016). Plant protein glycosylation. *Glycobiology* 26, 926–939.
- Stupar, R.M., Beaubien, K.A., Jin, W., Song, J., Lee, M-K., Wu, C., Zhang, H-B., Han, B., Jiang, J. (2006). Structural diversity and differential transcription of the patatin multigene family during potato tuber development. *Genetics* 72: 1263–1275.
- Suttle, J.C. (2004). Physiological regulation of potato tuber dormancy. *Am. J. Potato Res.* 81: 253–262.
- Suttle, J.C. (2007). Dormancy and Sprouting. In: Vreugdenhil D (ed), *Potato biology and biotechnology: advances and perspectives* (pp. 287–309). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Takáč, T., Šamajová, O., Šamaj, J. (2017). Integrating cell biology and proteomic approaches in plants. *J. Proteomics* 169: 165–175.
- Tan, L., Chen, S., Wang, T., Dai, S. (2013). Proteomic insights into seed germination in response to environmental factors. *Proteomics* 13: 1850–1870.
- Tan, B.C., Lim, Y.S., Lau, S-E. (2017). Proteomics in commercial crops: an overview. *J. Proteomics* 169: 176-188.
- Tan-Wilson, A.L., Wilson, K.A. (2012). Mobilization of seed protein reserves. *Physiol. Plant.* 145: 140–153.
- Tarentino, A.L., Gómez, C.M., Plummer, T.H. (1985). Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide: N-Glycosidase F. *Biochemistry* 24: 4665–4671.
- Teper-Bamnolker, P., Buskila, Y., Lopesco, Y., Ben-Dor, S., Saad, I., Holdengreber, V., Belausov, E., Zemach, H., Ori, N., Lers, A., Eshel, D. (2012). Release of apical dominance in potato tuber is accompanied by programmed cell death in the apical bud meristem. *Plant Physiol.* 158: 2053–2067.

- The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796–815.
- The Potato Genome Sequencing Consortium. (2011). Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* 475: 189–195.
- Tilley, K.A., Schofield, J.D. (1995). Detection of phosphotyrosine in the high M_r subunits of wheat glutenin. *J. Cereal Sci.* 22: 17–19.
- Touzet, P., Riccardi, F., Morin, C., Damerval, C., Huet, J-C., Pernollet, J-C., Zivy, M., de Vienne, D. (1996). The maize two-dimensional gel protein database: towards an integrated genome analysis program. *Theor. Appl. Genet.* 93: 997–1005.
- Twell, D., Ooms, G. (1988). Structural diversity of the patatin gene family in potato cv. Desiree. *Mol. Gen. Genet.* 212: 325–336.
- UniProt (2018). Universal Protein Resource. URL <https://www.uniprot.org/>, visitado julio de 2018.
- Van't Hof, J. (1973). The regulation of cell division in higher plants. *Brookhaven Symp. Biol.* 25: 152–165.
- Viola, R., Roberts, A.G., Haupt, S., Gazzani, S., Hancock, R.D., Marmiroli, N., Machray, G.C., Oparka, K.J. (2001). Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. *Plant Cell* 13: 385–398.
- Viola, R., Pelloux, J., van der Ploeg, A., Gillespie, T., Roberts, A.G., Hancock, R.D. (2007). Symplastic connection is required for bud outgrowth following dormancy in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Plant Cell Environ.* 30: 973–983.
- Visser, R.G.F., Vreugdenhil, D., Hendriks, T., Jacobsen, E.J. (1994). Gene expression and carbohydrate content during stolon to tuber transition in potatoes (*Solanum tuberosum*). *Physiol. Plant.* 90: 285–292.
- Vitela, B., Pagés, M., Riera, M. (2015). Emerging roles of protein kinase CK2 in abscisic acid signaling. *Front. Plant Sci.* 6: 966.
- Vreugdenhil, D., Struik, P.C. (1989). An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol. Plant.* 75: 525–531.

- Wan, L., Ross, A.R.S., Yang, J., Hegedus, D.D., Kermode, A.R. (2007). Phosphorylation of the 12 S globulin cruciferin in wild-type and *abi1-1* mutant *Arabidopsis thaliana* (thale cress) seeds. *Biochem. J.* 404: 247–256.
- Weber, H., Borisjuk, L., Wobus, U. (2005). Molecular physiology of legume seed development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 253–279.
- Weeda, S.M., Kumar, G.N.M., Knowles, N.R. (2009). Developmentally linked changes in proteases and protease inhibitors suggest a role for potato multicystatin in regulating protein content of potato tubers. *Planta* 230: 73–84.
- Weeda, S.M., Kumar, G.N.M., Knowles, N.R. (2010). Correlative changes in proteases and protease inhibitors during mobilization of protein from potato (*Solanum tuberosum* L.) seed tubers. *Funct. Plant Biol.* 37: 32–42.
- Weiss, W., Görg, A. (2007). Two-dimensional electrophoresis for plant proteomics. *Methods Mol. Biol.* 355, 121–143.
- Wellinder, K.G., Jørgensen, M. (2009). Covalent structures of potato tuber lipases (patatins) and implications for vacuolar import. *J. Biol. Chem.* 284: 9764–9769.
- Wu, R., Dephoure, N., Haas, W., Huttlin, E.L., Zhai, B., Sowa, M.E., Gygi, S.P. (2011). Correct interpretation of comprehensive phosphorylation dynamics requires normalization by protein expression changes. *Mol. Cell Proteomics* 10: M111.009654.
- Yao, Q., Bollinger, C., Gao, J., Xu, D., Thelen, J.J. (2012). P3DB: an integrated database for plant protein phosphorylation. *Front. Plant Sci.* 3: 206.
- Yin, X., Wang, X., Komatsu, S. (2018). Phosphoproteomics: Protein phosphorylation in regulation of seed germination and plant growth. *Curr. Protein Pept. Sci.* 19: 401–412.
- Zhu, K., Zhao, J., Lubman, D.M. (2005). Protein pI shifts due to posttranslational modifications in the separation and characterization of proteins. *Anal. Chem.* 77: 2745–2755.





8. ANEXOS



Anexo I. Identificación de las isoformas de patatina en los *spots* 2-DE de tubérculos de patata de la variedad cv. Kennebec en estado de rotura de brote empleando la técnica MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF.

Spot No. ^a	Protein identity (abbrev.)	Accession	Mascot Score	Match/Cov (%) ^b	Peptides identified	
					[M+H] ⁺	Sequence
1	Patatin-3-Kuras 1 (PT3K1)	PT3K1_SOLTU	191	7/24	1,047.55	TNKPVIIFTK
					1,167.57	YLMQVLQEK
					1,289.64	LAQEDPAFASIK
					1,499.76	IFEPSGFHLVEPK
					1,720.77	SVSEDNHETYEVALK
					1,757.90	VHQALTEVAISSFDIK
					1,825.87	QMLLLSLGTGTNSEFAK
2	Patatin-3-Kuras 1 (PT3K1)	PT3K1_SOLTU	571	13/58	773.39	TPELDAK
					1,047.60	TNKPVIIFTK
					1,167.60	YLMQVLQEK
					1,289.67	LAQEDPAFASIK
					1,448.72	DIIPFYFDHGPK
					1,499.78	IFEPSGFHLVEPK
					1,720.80	SVSEDNHETYEVALK
					1,757.93	VHQALTEVAISSFDIK
					1,825.91	QMLLLSLGTGTNSEFAK
					1,864.87	WGILQWMSPLWEMR
					3,121.43	SAASSYMNDYYLSTVFQALDSQNNYLR
					3,137.41	SAASSYMNDYYLSTVFQALDSQNNYLR

Spot No. ^a	Protein identity (abbrev.)	Accession	Mascot Score	Match/Cov (%) ^b	Peptides identified
					[M+H] ⁺ Sequence
					3,475.54 VQENALTGTATTFDDASVANMILLVQVGENLLK
					3,612.79 LADYFDVIGGTGTGGLLTAMITTPNENNRPFAAAK
3	-	-			- -
4	Patatin-3-Kuras 1 (PT3K1)	PT3K1_SOLTU	158	5/16	1,167.63 YLMQVLQEK
					1,289.70 LAQEDPAFASIK
					1,448.76 DIIPFYFDHGPK
					1,499.82 IFEPSGFHLVEPK
					1,757.90 VHQALTEVAISSFDIK
5	Patatin-08	PAT08_SOLTU	106	3/8	876.42 DPAFASIR
	Patatin-D2	PATD2_SOLTU			1,013.49 TYTAEETAK
	Patatin-D3	PATD3_SOLTU			1,709.79 YLMQVLQENLGETR
6	Patatin-B1	PATB1_SOLTU	187	5/21	1,031.48 HSQNNYLR
	Patatin B2	PATB2_SOLTU			1,133.61 YLLQVLQEK
	Patatin-2-Kuras 1	PT2K1_SOLTU			1,305.63 LAQEDPAFSSIK
	Others	-			1,757.88 VHQALTEVAISSFDIK
					3,642.73 LADYFDVIGGTSTGGLLTAMITTPNENNRPFAAAK
7	Patatin-08	PAT08_SOLTU	200	11/40	876.43 DPAFASIR
	Patatin-D2	PATD2_SOLTU			1,013.49 TYTAEETAK
	Patatin-D3	PATD3_SOLTU			1,709.82 YLMQVLQENLGETR

Spot No. ^a	Protein identity (abbrev.)	Accession	Mascot Score	Match/Cov (%) ^b	Peptides identified
					[M+H] ⁺ Sequence
8	Patatin-04	PAT04_SOLTU	297	6/25	1,031.49 HSQNYYLR
	Patatin-06	PAT06_SOLTU			1,133.62 YLLQVLQEK
	Patatin-2-Kuras 1	PT2K1_SOLTU			1,305.65 LAQEDPAFSSIK
	Others	-			1,757.91 VHQALTEVAISSFDIK
					1,869.88 QMLLLSLGTGTNSEFDK
				3,642.78 LADYFDVIGGTSTGGLLTAMITTPNENNRPFAAAK	
9	Patatin-04	PAT04_SOLTU	324	7/28	759.37 SPELDAK
	Patatin-06	PAT06_SOLTU			982.44 TYTAQEAAK
	Patatin-2-Kuras 1	PT2K1_SOLTU			1,031.49 HSQNYYLR
	Others	-			1,133.64 YLLQVLQEK
					1,305.65 LAQEDPAFSSIK
10	Patatin-14	PAT14_SOLTU	199	5/11	759.37 SPELDAK
	Patatin group M-1	PATM1_SOLTU			948.43 FAKLLSNR
	Patatin group M-2	PATM2_SOLTU			982.44 TYTAQEAAK
	Others	-			1,031.49 HSQNYYLR
					1,047.56 TNKPVIFTK
					1,133.61 YLLQVLQEK
					1,305.64 LAQEDPAFSSIK
					1,437.67 DSPETYEEALKR

Spot No. ^a	Protein identity (abbrev.)	Accession	Mascot Score	Match/Cov (%) ^b	Peptides identified [M+H] ⁺ Sequence
11	Patatin-06	PAT06_SOLTU	337	9/32	922.36 MDNNADAR
	Patatin group J-1	PATJ1_SOLTU			1,031.49 HSQNNYLR
	Patatin group M-1	PATM1_SOLTU			1,047.58 TNKPVIFTK
	Others	-			1,167.58 YLMQVLQEK
					1,305.65 LAQEDPAFSSIK
					1,757.92 VHQALTEVAISSFDIK
					1,853.89 QMLLLSLGTGTNSEFDK
					1,856.02 GIIPGTILEFLEGQLQK
					1,869.88 QMLLLSLGTGTNSEFDK
					3,306.61 WMLAIQQMTNAASSYMT
12	Patatin-06	PAT06_SOLTU	298	8/30	759.37 SPELDAK
	Patatin group M-1	PATM1_SOLTU			1,031.49 HSQNNYLR
	Patatin-2-Kuras 1	PT2K1_SOLTU			1,047.57 TNKPVIFTK
	Others	-			1,133.64 YLLQVLQEK
					1,305.65 LAQEDPAFSSIK
					1,757.91 VHQALTEVAISSFDIK
					1,869.88 QMLLLSLGTGTNSEFDK
		3,642.79 LADYFDVIGGTSTGGLLTAMITTPNENNRPFAAAK			

Spot No. ^a	Protein identity (abbrev.)	Accession	Mascot Score	Match/Cov (%) ^b	Peptides identified	
					[M+H] ⁺ Sequence	
13	Patatin-14	PAT14_SOLTU	475	9/31	759.36	SPELDAK
	Patatin group M-1	PATM1_SOLTU			1,031.49	HSQNNYLR
	Patatin group M-1	PATM1_SOLTU			1,047.58	TNKPVIFTK
	Others	-			1,133.64	YLLQVLQEK
					1,305.64	LAQEDPAFSSIK
					1,437.67	DSPETYEEALKR
					1,757.91	VHQALTEVAISSFDIK
					1,804.93	KLEEMVTVLSIDGGGIK
					1,869.87	QMLLLSLGTGTNSEFDK
					3,642.78	LADYFDVIGGTSTGGLLTAMITTPNENNRPFAAAK
14	Patatin-03	PAT03_SOLTU	267	9/31	759.37	SPELDAK
	Patatin-05	PAT05_SOLTU			982.46	TYTAQEAAK
	Patatin-07	PAT07_SOLTU			1,031.49	HSQNNYLR
	Others	-			1,047.58	TNKPVIFTK
					1,133.64	YLLQVLQEK
					1,305.64	LAQEDPAFSSIK
					1,757.88	VHQALTEVAISSFDIK
					1,869.87	QMLLLSLGTGTNSEFDK
					3,642.78	LADYFDVIGGTSTGGLLTAMITTPNENNRPFAAAK

Spot No. ^a	Protein identity (abbrev.)	Accession	Mascot Score	Match/Cov (%) ^b	Peptides identified [M+H] ⁺ Sequence
15	Patatin-04	PAT04_SOLTU	103	2/11	1,031.45 HSQNNYLR
	Patatin-2-Kuras 1	PT2K1_SOLTU			3,642.67 LADYFDVIGGTSTGGLLTAMITTPNENNRPF ⁺ AAAK
	Patatin-2-Kuras 4	PT2K4_SOLTU			
	Others	-			
16	Patatin-04	PAT04_SOLTU	440	10/40	759.32 SPELDAK
	Patatin-B2	PATB2_SOLTU			983.41 TYTAE ⁺ EAAK
	Patatin-2-Kuras 1	PT2K1_SOLTU			1,031.45 HSQNNYLR
	Others	-			1,047.55 TNKPVIFTK
					1,133.59 YLLQVLQEK
					1,305.59 LAQEDPAFSSIK
17	Patatin-03	PAT03_SOLTU	123	5/25	1,757.84 VHQALTEVAISSFDIK
	Patatin-05	PAT05_SOLTU			1,869.81 QMLLLSLGTGTNSEFDK
	Patatin-07	PAT07_SOLTU			3,579.31 VQENALNGTTTEMDDASEANMELLVQVGETLLK
	Others	-			3,642.63 LADYFDVIGGTSTGGLLTAMITTPNENNRPF ⁺ AAAK
					922.30 MDNNADAR
					1,167.52 YLMQVLQEK
					1,205.50 AEEDPAFASIR
					1,757.81 VHQALTEVAISSFDIK
		2,274.93 ADDASEANMELLVQVGENLLK			

Spot No. ^a	Protein identity (abbrev.)	Accession	Mascot Score	Match/Cov (%) ^b	Peptides identified	
					[M+H] ⁺ Sequence	
18	Patatin-03	PAT03_SOLTU	259	9/31	759.32	SPELDAK
	Patatin-05	PAT05_SOLTU			922.30	MDNNADAR
	Patatin-07	PAT07_SOLTU			1,047.53	TNKPVIFTK
	Others	–			1,167.52	YLMQVLQEK
					1,205.50	AEEDPAFASIR
					1,757.83	VHQALTEVAISSFDIK
					1,835.84	QLLLLSLGTGTNSEFDK
					2,274.97	ADDASEANMELLVQVGENLLK
19	Patatin-04	PAT04_SOLTU	129	3/9	1,031.46	HSQNNYLR
	Patatin group J-1	PATJ1_SOLTU			1,305.61	LAQEDPAFSSIK
	Patatin group M-1	PATM1_SOLTU			1,757.86	VHQALTEVAISSFDIK
	Others	–				
20	Patatin-06	PAT06_SOLTU	550	10/41	759.33	SPELDAK
	Patatin-15	PAT15_SOLTU			982.42	TYTAEAAK
	Patatin-2-Kuras 1	PT2K1_SOLTU			1,031.45	HSQNNYLR
	Others	–			1,047.55	TNKPVIFTK
					1,133.59	YLLQVLQEK
					1,305.59	LAQEDPAFSSIK
					1,757.85	VHQALTEVAISSFDIK
					1,869.82	QMLLLSLGTGTNSEFDK
					3,582.54	VQENALTGTTTEMDDAS
					3,642.67	LADYFDVIGGTSTGGLLTAMITTPNENNRPFAAAK

^a Gel position of assigned spots is shown in Figure 3. ^b Matched peptides and percentage of the polypeptide sequence covered by matched peptides.

Anexo II. Valores promedio (\pm SE) de la tasa de fosforilación (*PR*) de los *spots* 2-DE de patatina en perfiles de tubérculos de patata (cv. Kennebec) en estado de rotura de brote.

Spot no. ^a	<i>pI</i>	Volume without treatment HF-P				Volume with treatment HF-P				Mean (\pm SE) <i>PR</i>
		R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	
1	4.84	12,982	10,768	9,667	14,782	8,617	6,001	6,035	8,346	39.75 \pm 2.53
2	4.88	54,603	29,627	31,339	51,900	36,660	15,311	22,204	23,620	41.21 \pm 6.07
3	4.90	5,090	8,111	6,355	6,691	3,291	4,114	3,572	3,760	43.05 \pm 2.88
4	4.93	8,828	16,644	13,963	18,883	14,427	11,241	16,016	14,396	28.11 \pm 4.35
5	4.96	19,475	18,671	19,653	22,697	11,947	9,651	11,470	13,005	42.83 \pm 2.02
6	4.96	10,896	7,460	7,499	18,605	5,628	2,847	4,527	8,194	52.34 \pm 4.10
7	5.02	68,889	35,244	35,098	59,392	37,805	22,215	25,196	32,236	39.01 \pm 4.11
8	5.02	55,292	28,361	31,520	49,663	36,264	18,362	22,698	44,159	27.19 \pm 5.61
9	5.05	30,946	35,051	40,394	64,355	20,514	21,717	26,164	49,585	32.48 \pm 3.30
10	5.12	289,167	157,253	185,251	216,772	191,991	90,518	144,091	165,461	30.48 \pm 4.72
11	5.12	104,620	197,295	223,046	239,980	82,356	129,998	189,584	167,684	25.13 \pm 4.31
12	5.13	39,756	21,813	34,572	65,008	25,326	10,682	15,197	24,585	51.39 \pm 5.52
13	5.14	165,844	91,260	85,764	179,618	161,590	132,201	123,294	167,684	4.60 \pm 2.04
14	5.16	7,541	8,959	14,856	20,990	6,266	3,676	7,533	10,038	44.34 \pm 9.37
15	5.20	101,458	148,517	113,522	201,221	61,260	83,698	76,036	98,208	41.87 \pm 3.80
16	5.20	69,188	121,543	78,318	130,761	43,583	108,943	101,195	86,820	26.99 \pm 8.37
17	5.23	17,093	21,994	28,224	35,043	11,085	14,442	19,330	20,034	35.96 \pm 2.42
18	5.25	23,685	28,077	33,483	47,056	18,445	16,858	21,382	28,975	34.16 \pm 4.09
19	5.29	N/A ^b	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
20	5.27	46,405	89,560	63,343	98,768	42,091	84,548	64,673	78,077	11.95 \pm 4.63

^a Gel position of assigned spots is shown in Figure 6. ^b N/A= not available, weakly stained spot with a volume below the limit of detection.

Anexo III. Identificación de las isoformas de patatina en los *spots* 2-DE de tubérculos de patata de la variedad cv. Kennebec en estado de endodormancia empleando la técnica MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF. Fuente: Bernal *et al.* (2019).

Spot No. ^a	Protein identity (abbrev.)	Accession	Mascot Score	Match/Cov (%) ^b	Peptides identified	
					[M+H] ⁺	Sequence
2	Patatin-3-Kuras 1 (PT3K1)	PT3K1_SOLTU	571	13/58	773.39	TPELDAK
					1,047.60	TNKPVIFTK
					1,167.60	YLMQVLQEK
					1,289.67	LAQEDPAFASIK
					1,448.72	DIIPFYFDHGPK
					1,499.78	IFEPSGFHLVEPK
					1,720.80	SVSEDNHETYEVALK
					1,757.93	VHQALTEVAISSFDIK
					1,825.91	QMLLSLGTGTNSEFAK
					1,864.87	WGILQWMSPLWEMR
					3,137.41	SAASSYMNDYYLSTVFQALDSQNNYLR
					3,475.54	VQENALTGTATTFDDASVANMILLVQVGENLLK
					3,612.79	LADYFDVIGGTGTGGLLTAMITTPNENNRPFAAAK
5	Patatin-08	PAT08_SOLTU	106	3/8	876.42	DPAFASIR
					1,013.49	TYTAEETAK
					1,709.79	YLMQVLQENLGETR
6	-	-	-	-	-	-

Spot No. ^a	Protein identity (abbrev.)	Accession	Mascot Score	Match/Cov (%) ^b	Peptides identified	
					[M+H] ⁺	Sequence
7	Patatin-08	PAT08_SOLTU	200	11/40	759.36	SPELDAK
	Patatin-D2	PATD2_SOLTU			876.43	DPAFASIR
	Patatin-D3	PATD3_SOLTU			922.34	MDNNADAR
					1,013.49	TYTAEETAK
					1,047.58	TNKPVIFTK
					1,308.60	DNPETYEEALK
					1,709.82	YLMQVLQENLGETR
					1,728.83	MLLSLGTGTTSEFDK
					1,757.91	VHQALTEVAISSFDIK
					2,882.16	MTDAASSYMTDYLLSTVVFQAQNSQK
					3,569.59	VQENALTGTTTEMDDASEANMESLVQVGENLLK
8	Patatin-2-Kuras 1 (pt2k1)	PT2K1_SOLTU	299	6/25	1,031.49	HSQNNYLR
	Patatin-B1	PATB1_SOLTU			1,133.62	YLLQVLQEK
	Patatin-04	PAT04_SOLTU			1,305.65	LAQEDPAFSSIK
	Others	–			1,757.91	VHQALTEVAISSFDIK
					1,869.88	QMLLSLGTGTNSEFDK
		3,642.78	LADYFDVIGGTSTGGLLTAMITTPNENNRPFAAAK			

Spot No. ^a	Protein identity (abbrev.)	Accession	Mascot Score	Match/Cov (%) ^b	Peptides identified	
					[M+H] ⁺	Sequence
9	Patatin-2-Kuras 1 (PT2K1)	PT2K1_SOLTU	324	7/28	759.35	SPELDAK
	Patatin-B1	PATB1_SOLTU			1,031.49	HSQNNYLR
	Patatin-04	PAT04_SOLTU			1,133.64	YLLQVLQEK
	Others	-			1,305.65	LAQEDPAFSSIK
					1,757.90	VHQALTEVAISSFDIK
					1,869.88	QMLLSLGTGTNSEFDK
10	Patatin-2-Kuras 1 (pt2k1)	PT2K1_SOLTU	135	10/28	3,642.76	QMLLSLGTGTNSEFDKAMITTPNENNRPFAAAK
	Patatin-04	PAT04_SOLTU			758.38	SPELDAK
	Patatin-15	PAT15_SOLTU			948.52	FAKLLSDR
	Others	-			1,030.49	HSQNNYLR
					1,046.61	TNKPVIFTK
					1,062.43	TYTAEAAK
					1,132.65	YLLQVLQEK
					1,304.66	LAQEDPAFSSIK
					1,436.68	DSPETYEEALKR
					1,756.94	VHQALTEVAISSFDIK
		1,868.92	QMLLSLGTGTNSEFDK			

Spot No. ^a	Protein identity (abbrev.)	Accession	Mascot Score	Match/Cov (%) ^b	Peptides identified	
					[M+H] ⁺	Sequence
11	Patatin group J1	PATJ1_SOLTU	337	9/32	922.36	MDNNADAR
	Patatin-04	PAT04_SOLTU			1,031.49	HSQNNYLR
	Patatin-06	PAT06_SOLTU			1,047.58	TNKPVIFTK
	Others	–			1,167.58	YLMQVLQEK
		–			1,305.65	LAQEDPAFSSIK
		–			1,757.92	VHQALTEVAISSFDIK
		–			1,853.90	QMLLSLGTGTNSEFDK
		–			1,856.02	GIIPGTILEFLEGQLQK
		–			3,306.61	WMLAIQQMTNAASSYMTDYYISTVVFQAR
		–			–	–
12	Patatin-B2	PATB2_SOLTU	127	10/19	704.28	SLDYK
	Patatin-2-Kuras 1 (PT2K1)	PT2K1_SOLTU			706.28	ANKASH
	Patatin-04	PAT04_SOLTU			758.38	SPELDAK
	Others	–			1,030.49	HSQNNYLR
		–			1,046.61	TNKPVIFTK
		–			1,062.43	TYTAEAAK
		–			1,132.65	YLLQVLQEK
		–			1,304.66	LAQEDPAFSSIK
–	1,360.54	DSPETYEEALK				
–	1,436.68	DSPETYEEALKR				

Spot No. ^a	Protein identity (abbrev.)	Accession	Mascot Score	Match/Cov (%) ^b	Peptides identified	
					[M+H] ⁺	Sequence
13	Patatin-2-Kuras 1 (PT2K1)	PT2K1_SOLTU	178	10/26	759.38	SPELDAK
	Patatin-04	PAT04_SOLTU			1,030.49	HSQNNYLR
	Patatin-06	PAT06_SOLTU			1,046.61	TNKPVIFTK
	Others	-			1,062.43	TYTAEAAK
					1,132.65	YLLQVLQEK
					1,304.66	LAQEDPAFSSIK
					1,360.54	DSPETYEEALK
					1,436.68	DSPETYEEALKR
					1,756.94	VHQALTEVAISSFDIK
					1,868.92	QMLLSLGTGTNSEFDK
14	Patatin-03	PAT03_SOLTU	267	9/31	759.37	SPELDAK
	Patatin-05	PAT05_SOLTU			982.46	TYTAQAAK
	Patatin-07	PAT07_SOLTU			1,031.49	HSQNNYLR
	Others	-			1,047.58	TNKPVIFTK
					1,133.64	YLLQVLQEK
					1,305.64	LAQEDPAFSSIK
					1,757.88	VHQALTEVAISSFDIK
					1,869.87	QMLLSLGTGTNSEFDK
					3,642.78	LADYFDVIGGTSTGGLLTAMITTPNENRPFAAAK

Spot No. ^a	Protein identity (abbrev.)	Accession	Mascot Score	Match/Cov (%) ^b	Peptides identified	
					[M+H] ⁺	Sequence
15	Patatin-2-Kuras 1 (PT2K1)	PT2K1_SOLTU	146	7/17	758.38	SPELDAK
	Patatin-04	PAT04_SOLTU			1,030.49	HSQNYYLR
	Patatin-B2	PATB2_SOLTU			1,046.61	TNKPVIFTK
	Others	-			1,062.55	TYTAEAAK
					1,132.65	YLLQVLQEK
					1,304.66	LAQEDPAFSSIK
					1,436.68	DSPETYEEALKR
16	Patatin-B1	PATB1_SOLTU	294	12/27	758.38	SPELDAK
	Patatin-06	PAT06_SOLTU			947.56	FAKLLSNR
	Patatin-2-Kuras 1 (PT2K1)	PT2K1_SOLTU			1,030.49	HSQNYYLR
	Others	-			1,046.61	TNKPVIFTK
					1,062.43	TYTAEAAK
					1,126.58	TNKPVIFTK
					1,132.65	YLLQVLQEK
					1,280.58	DSPETYEEALK
					1,304.66	LAQEDPAFSSIK
					1,436.68	DSPETYEEALKR
		1,756.94	VHQALTEVAISSFDIK			
		1,868.92	QMLLLSLGTGTNSEFDK			

Spot No. ^a	Protein identity (abbrev.)	Accession	Mascot Score	Match/Cov (%) ^b	Peptides identified	
					[M+H] ⁺	Sequence
17	Patatin-13	PAT13_SOLTU	181	8/20	758.44	SPELDAK
	Patatin-05	PAT05_SOLTU			921.36	MDNNADAR
	Patatin-03	PAT03_SOLTU			1,046.61	TNKPVIFTK
	Others	-			1,065.45	THTAQETAK
					1,204.57	AEEDPAFASIR
					1,261.65	VQENALTGTTTK
					1,360.67	RAEEDPAFASIR
18	Patatin-03	PAT03_SOLTU	251	13/34	1,436.68	DSPETYEEALKR
	Patatin-05	PAT05_SOLTU			758.38	SPELDAK
	Patatin-07	PAT07_SOLTU			921.36	MDNNADAR
	Others				1,046.61	TNKPVIFTK
					1,166.60	YLMQVLQEK
					1,204.57	AEEDPAFASIR
					1,261.65	VQENALTGTTTK
					1,360.67	RAEEDPAFASIR
					1,463.69	DNPETYEEALKR
					1,706.9	YLMQVLQEKLGETR
					1,756.94	VHQALTEVAISSFDIK
					1,789.74	YDGKYLQVLQEK
					1,834.98	QLLLSLGTGTNSEFDK
					2,274.15	ADDASEANMELLVQVGENLLK

Spot No. ^a	Protein identity (abbrev.)	Accession	Mascot Score	Match/Cov (%) ^b	Peptides identified	
					[M+H] ⁺	Sequence
19	–	–			–	–
20	Patatin-B1	PATB1_SOLTU	215	10/27	758.38	SPELDAK
	Patatin-06	PAT06_SOLTU			947.56	FAKLLSNR
	Patatin-2-Kuras 1 (PT2K1)	PT2K1_SOLTU			1,030.49	HSQNNYLR
	Others	–			1,046.61	TNKPVIFTK
					1,062.43	TYTAEAAK
					1,132.65	YLLQVLQEK
					1,304.66	LAQEDPAFSSIK
					1,436.68	DSPETYEEALKR
					1,756.94	VHQALTEVAISSFDIK
					1,868.92	QMLLLSLGTGTNSEFDK

^a Gel position of assigned spots is shown in Figure 8. ^b Matched peptides and percentage of the polypeptide sequence covered by matched peptides.

Anexo IV. Valores promedio (\pm SE) del volumen de los *spots* de patatina obtenidos en tubérculos de patata (cv. Kennebec) en cada una de las siguientes etapas de su ciclo de vida: endodormancia, rotura de brote, brotación y crecimiento de la planta.

Spot No. ^a	pI ^b	Volume				Mean (\pm SE)
		Endodormancy	Bud Break	Sprouting	Plant Growth	
1	4.84	N/A	12,050 \pm 1,142	15,723 \pm 1,026	14,181 \pm 1,548	13,985 \pm 1,065
2	4.88	10,732 \pm 3,108	41,867 \pm 6,605	52,352 \pm 4,589	43,124 \pm 9,139	37,019 \pm 9,069
3	4.90	N/A	6,562 \pm 621	N/A	N/A	6,562
4	4.93	N/A	14,580 \pm 2,165	16,359 \pm 3,352	12,041 \pm 1,532	14,327 \pm 1,253
5	4.96	16,567 \pm 2,399	20,124 \pm 884	47,632 \pm 4,740	28,141 \pm 4,706	28,117 \pm 6,941
6	4.96	4,367 \pm 1,078	11,115 \pm 2,623	23,960 \pm 2,472	15,874 \pm 1,290	13,829 \pm 4,120
7	5.02	25,718 \pm 1,864	49,656 \pm 8,585	57,000 \pm 5,878	44,531 \pm 4,391	44,226 \pm 6,679
8	5.02	29,058 \pm 3,399	41,209 \pm 6,638	84,447 \pm 27,174	74,025 \pm 7,132	57,185 \pm 13,144
9	5.05	38,651 \pm 3,841	42,687 \pm 7,477	81,641 \pm 12,434	48,856 \pm 8,811	52,959 \pm 9,788
10	5.12	127,074 \pm 12,545	212,111 \pm 28,417	194,709 \pm 20,987	203,463 \pm 21,496	184,339 \pm 19,416
11	5.12	184,421 \pm 10,173	191,235 \pm 30,176	212,584 \pm 14,805	149,824 \pm 18,564	184,516 \pm 13,027
12	5.13	29,886 \pm 1,647	40,287 \pm 9,062	53,083 \pm 9,119	57,128 \pm 8,961	45,096 \pm 6,212
13	5.14	56,120 \pm 8,600	130,622 \pm 24,500	71,544 \pm 11,279	73,049 \pm 8,274	82,834 \pm 16,382
14	5.16	15,477 \pm 2,289	13,087 \pm 3,074	45,092 \pm 5,892	30,191 \pm 6,300	25,962 \pm 7,414

Spot No. ^a	pI ^b	Volume				Mean (\pm SE)
		Endodormancy	Bud Break	Sprouting	Plant Growth	
15	5.20	88,487 \pm 3,452	141,180 \pm 22,364	98,921 \pm 8,566	67,200 \pm 10,762	98,947 \pm 15,548
16	5.20	76,364 \pm 12,313	99,953 \pm 15,356	146,326 \pm 22,966	90,283 \pm 8,177	103,231 \pm 15,159
17	5.23	22,560 \pm 3,018	25,589 \pm 3,888	32,293 \pm 4,031	29,025 \pm 6,539	27,367 \pm 2,107
18	5.25	47,433 \pm 5,222	33,075 \pm 5,073	45,834 \pm 5,890	47,751 \pm 6,288	43,523 \pm 3,508
19	5.29	6,778 \pm 1,033	19,938 \pm 4,147	N/A	N/A	13,858 \pm 6,580
20	5.27	17,078 \pm 1,023	74,519 \pm 12,005	108,063 \pm 11,664	72,308 \pm 8,002	67,992 \pm 18,840
Mean (\pm SE)		46,869 \pm 11,705	61,072 \pm 13,776	77,087 \pm 13,440	61,167 \pm 11,452	

^a Gel position of assigned spots is shown in Figure 8.

^b Experimental pI value.

N/A = not accessible, spot signal of volume under the limit of detection.