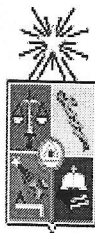


FC
tecnología
961



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

Laboratorio de Bioquímica Vegetal

**Estudio sobre la Percepción del Acortamiento del Fotoperíodo
en Hojas de *Vitis vinifera* L. cv. Thompson Seedless**

Seminario de título

Entregado a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por

Nathalie Alexandra Kühn Weber

Director de Memoria de Título: Dr. Francisco Pérez Correa

Mayo, 2009

Santiago – Chile





INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta.:

NATHALIE ALEXANDRA KÜHN WEBER

**“Estudio sobre la Percepción del Acortamiento del Fotoperíodo
en Hojas de *Vitis vinifera* L. cv. Thompson Seedless”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Francisco Pérez Correa

Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dra. Liliana Cardemil Oliva



Presidente Comisión

Dra. Claudia Stange

Correctora

Santiago de Chile, 08 de Mayo de 2009



Nací en Santiago el 25 de Enero del año 1982. Muy pequeñita me fui a vivir a Coya, un pueblito que queda en los faldeos de la cordillera en la Sexta Región. Me gustaba mucho explorar y a veces se me pasaban las horas y llegaba de noche a mi casa, cuando ya los carabineros me estaban buscando. Jugaba hartito con la Katy, mi hermana, y con mi amigo Douglas, con quien llevaba a cabo algunas de mis expediciones.

A los 6 años ingresé al Colegio Sagrado Corazón, en el cual estuve durante 12 largos años. Al cumplir los 9 años nos mudamos a Machalí, pueblo que queda cerca de Rancagua. La casa de Machalí, que aún hoy es mi casa, era diferente a la de Coya: habían murallas y ya no se podía salir a explorar.

El tiempo fue pasando y a los 11 años tuve mi primera fiesta, y a los 12 mi primer pololo. A los 15 conocí a Sebastián Reyes, el papá de mi hijo Benjamín, con quien pololié durante 8 años. Este período, desde los 15 hasta los 18 años aproximadamente, fue difícil pero de todos modos fue muy lindo, lleno de experiencias inolvidables con Sebastián y con mi amiga Paulina Sasmay.

A los 18 entré a la U y comenzó el largo proceso de estudiar Biotecnología. Cuando aún tenía 18 años el Benja decidió saltar de su nube. La noticia de su llegada fue recibida de diversas maneras, con sorpresa, preocupación y un poquito de duda. Con el Seba demostramos que aunque éramos chicos podíamos hacernos cargo del “guatón” y además seguir estudiando. Ahora el Benja está esperando a su hermanita Alexandra que tiene cerca de 4 meses de vida intrauterina. Su papá, Víctor Álamos, también la está esperando ansiosamente.



Dedicatoria

Esta Memoria o Seminario de Título o Tesis está dedicada a cualquier miembro de la familia perteneciente al futuro que esté leyendo estas páginas en este momento, ya sea Benja, Alex, o algún sobrinito potencial, o ahijado... A ti, que ahora ya eres grande te digo que la investigación es bonita porque nos hace sentir que estamos despiertos. No hay rutina cuando hay un dilema que resolver. Que la ciencia esté contigo.



ÍNDICE



1. ÍNDICE.....	5
2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	6
3. RESUMEN.....	7
4. ABSTRACT.....	9
5. ABREVIATURAS.....	11
6. INTRODUCCIÓN.....	12
• Hipótesis.....	24
• Objetivo general.....	24
• Objetivos específicos.....	24
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
• Material vegetal.....	25
• Estimaciones de la extensión del período de luz.....	25
• Diseño de partidores específicos.....	25
• Extracción de RNA.....	27
• Síntesis de cDNA.....	28
• PCR.....	28
• Determinación de la abundancia de transcritos.....	29
• Secuenciación y caracterización de los fragmentos amplificados.....	29
• Caracterización de la familia tipo CO en el genoma de <i>V. vinifera</i>	30
8. RESULTADOS.....	31
• Aislamiento e identificación de los transcritos <i>VvPHYA</i> , <i>VvPHYB</i> , <i>VvCO</i> , <i>VvFT</i> y <i>VvMADS8</i> en hojas de <i>V. vinifera</i> L. cv. Thompson Seedless.....	31
• Familia de factores de transcripción tipo CO en <i>V. vinifera</i>	37
• Estudio sobre el efecto del acortamiento del fotoperíodo en el patrón de expresión de <i>VvPHYA</i> y <i>VvPHYB</i> en hojas de <i>V. vinifera</i>	41
• Estudio sobre el efecto del acortamiento del fotoperíodo en el patrón de expresión de <i>VvFT</i> , <i>VvCO</i> y <i>VvMADS8</i> en hojas de <i>V. vinifera</i>	43
9. DISCUSIÓN.....	45
10. CONCLUSIONES.....	51
11. BIBLIOGRAFÍA.....	53
12. AGRADECIMIENTOS.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS



Figura 1.....	32
Figura 2.....	34
Figura 3.....	35
Figura 4.....	37
Figura 5.....	40
Figura 6.....	42
Figura 7.....	44
Tabla 1.....	26
Tabla 2.....	32
Tabla 3.....	34
Tabla 4.....	39

RESUMEN

Las plantas de climas templados perciben las variaciones del fotoperíodo para anticiparse a los cambios estacionales que tienen lugar durante el año. Existe una gran cantidad de respuestas gatilladas por las variaciones del fotoperíodo, de las cuales la mejor estudiada ha sido la floración en *A. thaliana* inducida por el alargamiento del fotoperíodo. También se conocen la tuberización en la papa y el cese del crecimiento y la formación de yemas en el álamo, inducidas por condiciones de día corto. Todas estas respuestas, que ocurren en organismos con hábitos de crecimiento tan distintos, tienen en común el que pueden ser explicadas por un mismo modelo de percepción de las variaciones del fotoperíodo: el modelo de la coincidencia externa. Estudios recientes han logrado establecer que a nivel molecular el vínculo entre estas respuestas es la acción que ejercen los factores de transcripción CONSTANS (CO) y FLOWERING LOCUS T (FT), que junto a los fitocromos son los principales actores en el mecanismo de percepción del largo del día. En este trabajo se identificaron los genes *VvPHYA*, *VvPHYB*, *VvCO*, *VvFT* y *VvMADS8* en el genoma de *V. vinifera* L. cv. Thompson Seedless, homólogos de los genes de *A. thaliana* *PHYTOCHROME A (PHYA)*, *PHYTOCHROME B (PHYB)*, *CONSTANS (CO)*, *FLOWERING LOCUS T (FT)* y *SUPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS (SOC1)*, un gen cuya expresión es inducida por FT. En el cultivar Thompson Seedless la inducción de la endodormancia de yemas es una respuesta gatillada exclusivamente por el acortamiento del fotoperíodo y se ha establecido que el fotoperíodo crítico para esta respuesta es de aproximadamente 14 h, lo cual tiene lugar en el último tercio del mes de Enero, ocurriendo en este período la transición del estado paradormante (PD) de las yemas

hacia el estado endodormante (ED). Dado que el acortamiento del fotoperíodo es percibido en las hojas, muestras de hoja fueron colectadas aproximadamente cada 3-6 h, durante un ciclo de 24 h, el 21 de Diciembre, el 23 de Enero y el 12 de Abril, cuando las yemas aún están en estado PD, en la transición hacia el estado ED y cuando las yemas ya se encuentran en estado ED, respectivamente. Los resultados muestran que la expresión de *VvPHYA*, *VvPHYB*, *VvFT* y *VvMADS8* es regulada por los cambios en el fotoperíodo, mientras que la expresión de *VvCO* no cambia con esta variable.

ABSTRACT

Temperate perennial plants have the ability to perceive the change of photoperiod in order to anticipate seasonal changes occurring through the year. There are many photoperiod dependent responses, induced either by increasing or decreasing photoperiod. The best studied photoperiodical response is flowering in *A. thaliana* induced by long days. Also other responses are known such as tuberization in potato and growth cessation and bud set in poplar, which are induced by short days. All of these responses, that occur in organisms with very different growing habits, have in common the fact that they can be explained by only one model: the external coincidence model. Recent works have established that the link between all these different responses is the action that exert the transcription factors *CONSTANS* (CO) and *FLOWERING LOCUS T* (FT), which in concert with phytochromes regulate the mechanism of daylength perception. In this work it was identified the *VvPHYA*, *VvPHYB*, *VvCO*, *VvFT* and *VvMADS8* genes in the *V. vinifera* L. cv. Thompson Seedless genome, homologues to the *A. thaliana* genes *PHYTOCHROME A* (*PHYA*), *PHYTOCHROME B* (*PHYB*), *CONSTANS* (*CO*), *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) y *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS* (*SOC1*), a gene whose expression depends on FT induction. It has been demonstrated that in *V. vinifera* L. cv. Thompson Seedless shortening photoperiod is the only environmental cue that induces the entrance of buds into the endodormant (ED) state, and it has been established that the critical photoperiod for this response is close to 14 h, which happens in last third of January. So in this period transition from paradormant (PD) state of buds to endodormant (ED) state occurs. Given that it is well known that changes in photoperiod are perceived in leaves,

leaf samples were collected every 3-6 h approximately in a 24 h cycle in December 21, January 23 and April 12, when buds are still in PD state, in the transition to ED state and when buds are in ED state. Results show that *VvPHYA*, *VvPHYB*, *VvFT* and *VvMADS8* expression is regulated by decreasing photoperiod, while *VvCO* expression is not affected by it.

ABREVIATURAS

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): Herramienta de búsqueda de alineamiento básico local

BLAT (BLAST Like Alignment Tool) search: Herramienta de búsqueda de alineamiento tipo BLAST

dNTP (deoxyNucleotide TriPhosphate): Deoxinucleótido trifosfato

DEPC: Dietilpirocarbonato

EST (Expressed Sequence Tag): Marcador de secuencia expresada

GFP (Green Fluorescent Protein): Proteína fluorescente verde

óligo(dT) (oligodeoxythymidylic acid): Ácido oligodeoxitimidílico

pb: Pares de bases

PCR (Polymerase Chain Reaction): Reacción en cadena de la polimerasa

P_r: Conformación de los fitocromos que absorbe luz roja

P_{fr}: Conformación de los fitocromos que absorbe luz del rojo lejano

RT (Reverse Transcriptase): Transcriptasa reversa

Taq DNA Polymerase: *Thermus aquaticus* DNA polimerasa

UV-A: Ultravioleta tipo A (luz)

Vv: *Vitis vinifera*

INTRODUCCIÓN

Respuestas adaptativas de las plantas en un mundo cambiante

Los organismos crecen y se desarrollan en un mundo con variables ambientales cambiantes. Las condiciones de temperatura y luz cambian con los ciclos de luz y oscuridad y también varían a lo largo del año, de modo que los organismos para estar en armonía con su medio ambiente se han adaptado generando mecanismos para percibir estos cambios y ajustar sus procesos metabólicos y de desarrollo a éstos. Las plantas por ser organismos sésiles no pueden desplazarse en búsqueda de refugio frente a condiciones adversas o en búsqueda de la ubicación óptima para su adecuado crecimiento y desarrollo, por lo que su proceso adaptativo es más complejo que el de otros organismos, lo que explica a su vez el gran número de genes que poseen (Sterck y col., 2007). En el caso de plantas de climas tropicales, éstas crecen y se desarrollan bajo condiciones climáticas favorables durante prácticamente todo el año y la mayor dificultad que experimentan radica en la competencia por la luz. Por este motivo las plantas tropicales han generado mecanismos para percibir los cambios en la calidad de la luz con el fin de maximizar su tasa fotosintética. En el caso de las plantas de climas templados el proceso adaptativo es más complejo ya que éstas deben sincronizar su ciclo de vida con los cambios estacionales que tienen lugar a lo largo del año. Las principales variables sensadas por estas plantas son la temperatura y la luz (Downs y Bevington, 1981; Henderson y Dean, 2004; Franklin y Whitelamb, 2004). Las plantas perennes de climas templados, que se caracterizan por tener un ciclo de vida de varios años, perciben los cambios estacionales de estas variables y responden a éstos alternando ciclos de crecimiento y desarrollo con ciclos de receso.

Rol del fotoperíodo en las respuestas de las plantas de climas templados a los cambios estacionales

Las plantas de climas templados presentan respuestas fisiológicas en común con las plantas de climas tropicales, como la respuesta de competencia por la luz. Sin embargo, adicionalmente las plantas de climas templados perciben y responden a las variaciones de la extensión del período de luz o fotoperíodo, lo que constituye una característica exclusiva de estas plantas. El fotoperíodo a una latitud determinada es una fuente de información confiable para las plantas de climas templados pues depende del movimiento traslacional de la tierra, a diferencia de la temperatura que depende de múltiples variables. De este modo, el fotoperíodo es un factor importante para la ocurrencia de ciertos procesos del desarrollo de las plantas de climas templados.

La importancia del fotoperíodo fue evidenciada inicialmente en estudios realizados a principios del siglo pasado, en los cuales se concluyó que más que la intensidad de la luz el factor determinante para la ocurrencia de respuestas a los cambios estacionales es el fotoperíodo (Tournois, 1912; Klebs, 1913). Posteriormente, se llevaron a cabo los primeros experimentos bajo condiciones controladas en los cuales se demostró que muchas plantas florecen ya sea en respuesta al alargamiento o al acortamiento del fotoperíodo (Garner y Allard, 1920). Los trabajos posteriores se enfocaron en la respuesta de floración de diversas especies de plantas y permitieron clasificarlas en tres categorías fotoperiódicas: aquéllas que florecen en respuesta al alargamiento del fotoperíodo, aquéllas que lo hacen ante el acortamiento de éste, y aquéllas que son insensibles a los cambios del fotoperíodo, las que se conocen como plantas de día largo, plantas de día corto y plantas neutrales,

respectivamente (Thomas y Vince-Prue, 1997). De la mano de estos primeros experimentos se introdujo el término fotoperiodismo, el cual se define como la habilidad de las plantas para generar respuestas frente a las variaciones del fotoperíodo. También se introdujo el término fotoperíodo crítico que corresponde a la extensión umbral del período de luz que se debe alcanzar para que ocurra una determinada respuesta fisiológica.

Cómo es percibida la información lumínica por las plantas

Las plantas perciben tres tipos de información lumínica: intensidad, calidad y extensión del período de luz o fotoperíodo. Para responder adecuadamente a los cambios en las condiciones lumínicas, las plantas han desarrollado tres tipos de pigmentos proteicos llamados fotorreceptores: los fitocromos (Phys), que sensan las señales de la zona del espectro correspondiente a la luz roja (LR) y a la luz del rojo lejano (LFR), los criptocromos (CRYs) y las fototropinas (PHOTs), que sensan la luz azul y la luz UV-A (Chen y col., 2004). Los fotorreceptores son esenciales en la transducción de la información lumínica en información biológica, lo cual se fundamenta en la propiedad de estas moléculas de experimentar cambios químicos o conformacionales al percibir la luz. En el caso de los Phys, al percibir la luz cambian su conformación proteica y su localización subcelular, pasando del citoplasma al núcleo (Huq y Quail, 2005). Los CRYs responden a la luz azul autofosforilándose y formando dímeros lo cual es importante para su actividad (Lin y Shalitin, 2003; Sang y col., 2005). Las PHOTs también responden a la luz azul auto-fosforilándose (Salomon y col., 2000). Entre los fotorreceptores, los Phys son únicos debido a que existen en dos conformaciones capaces de absorber luz: la conformación P_r en la cual absorben LR y la conformación P_{fr} en la cual absorben LFR.

Esto es posible ya que los Phys están covalentemente unidos a un cromóforo de bilina el cual experimenta una isomerización al recibir LR o LFR, lo que altera la conformación proteica de los Phys reversiblemente, proceso denominado fotoconversión (Gärtner y Braslavsky, 2003).

Los fitocromos participan en las respuestas dependientes de los cambios en el fotoperíodo

Los primeros experimentos que dieron luces sobre la participación de los Phys en las respuestas dependientes del fotoperíodo fueron aquéllos donde se estudió el efecto de pulsos de luz de diferentes longitudes de onda suministrados en el período de oscuridad sobre la respuesta de floración. Se vio que los pulsos de LR eran los más efectivos en promover la floración en plantas que responden a días largos, mientras que los pulsos de LFR eran los más efectivos en inhibirla, precisamente la luz de la zona del espectro donde los Phys absorben (Parker y Borthwick, 1950; Borthwick y col., 1952). El rol de los Phys en las respuestas fotoperiódicas fue corroborado posteriormente en un gran número de especies donde se vio que el efecto que causaban los pulsos de LR era revertido al aplicar pulsos de LFR, lo que concuerda con las propiedades de los Phys (Downs y col., 1956).

A pesar del temprano descubrimiento de que en las plantas existen mecanismos para percibir y distinguir la información lumínica, el cómo las plantas de climas templados perciben y responden específicamente a los cambios en el fotoperíodo no fue comprendido sino hasta que fue planteado un modelo capaz de explicar los datos experimentales, conocido como modelo de la coincidencia externa (Pittendrigh, 1960).

El modelo de la coincidencia externa da cuenta de cómo las plantas de climas templados responden a las variaciones en el fotoperíodo

La base teórica del modelo de coincidencia externa fue establecida por Bünning en la década de 1930. Bünning tenía conocimiento de que en las plantas existían ritmos endógenos que eran independientes de las condiciones externas. Con anterioridad se había demostrado que existía un mecanismo interno en las plantas que mantenía ciertos procesos con un período aproximado de 24 h, precisamente para estar en sincronía con el movimiento rotacional de la tierra que origina los ciclos de luz y oscuridad, al cual se le denominó ciclo o reloj circadiano. El ciclo circadiano fue estudiado a partir del siglo XVIII en plantas de *Mimosa pudica* (heliótropo) en las que se observó que el movimiento de las hojas, que normalmente presenta una periodicidad característica cercana a 24 h, se mantenía incluso en condiciones de oscuridad constante (de Marian, 1729; Zinn, 1759; Hill, 1757). Bünning, dos siglos después, estudiando el movimiento de las hojas de plántulas de poroto, hizo un aporte fundamental al demostrar que los ritmos endógenos de las plantas pueden ser modificados, pues observó que en ausencia del componente rojo del espectro de luz las plántulas perdían la sincronía del movimiento de sus hojas (Bünning y Stern, 1930). Basado en estos resultados Bünning planteó que los ritmos biológicos sólo son parcialmente independientes del ciclo de luz y oscuridad, y que existe por tanto una interacción entre los ritmos endógenos y los ritmos externos que es relevante para el desarrollo de las plantas. Posteriormente, Bünning propuso que el control fotoperiódico del proceso de floración podría ser un muy buen ejemplo de esta interacción. En su hipótesis, un día puede ser dividido en una fase sensible a la luz y otra insensible a la luz, lo que depende de la regulación dada por el ciclo circadiano. La presencia o ausencia de luz

durante estas fases es lo que le indicaría a la planta si las condiciones son de día corto o día largo y por tanto si puede o no florecer (Bünning, 1936). Bünning propuso que debía existir un regulador de la floración controlado por el ciclo circadiano. En la década de 1960, Pittendrigh formalizó y expandió la hipótesis de Bünning y acuñó el término "coincidencia externa", dado que el modelo propone que la respuesta fotoperiódica sólo se genera cuando una fase externa, ya sea de luz u oscuridad, coincide con una fase del ciclo interno. El modelo de la coincidencia externa es capaz de dar cuenta de respuestas fotoperiódicas tan diversas como la floración en *Arabidopsis thaliana* dependiente de días largos (Suárez-López y col., 2001; Yanovsky y Kay, 2002), la floración en arroz dependiente de días cortos (Hayama y col., 2003), la tuberización en la papa en respuesta a días cortos (Martínez-García y col., 2002; Rodríguez-Falcón y col., 2006) y el cese del crecimiento y formación de yemas inducidos por días cortos en el álamo, *Populus sp.*, una planta perenne leñosa (Böhlenius y col., 2006).

Bases moleculares del modelo de coincidencia externa y la teoría del florígeno

Las respuestas fotoperiódicas han sido estudiadas principalmente en *A. thaliana* por ser un organismo genéticamente simple. *A. thaliana* es una planta herbácea de ciclo anual que florece en respuesta al alargamiento del fotoperíodo, aunque también puede hacerlo en días cortos aunque de manera tardía (Wilson y col., 1992), por lo que se dice que es una planta de días largos facultativa (Yanovsky y Kay, 2002). *A. thaliana* también puede florecer en respuesta a la exposición prolongada a bajas temperaturas lo que se conoce como vernalización (Michaels y Amasino, 2000), en respuesta a factores endógenos propios del

desarrollo, lo que corresponde a la vía autónoma de floración (Putterill y col., 2004) y en respuesta a hormonas, específicamente giberelinas (Moon y col., 2003).

Inicialmente, los genes involucrados en la respuesta fotoperiódica de floración fueron identificados gracias a mutantes que florecían de manera defectuosa ante condiciones inductivas de día largo. De este modo, fueron identificados los genes *GIGANTEA (GI)*, *CONSTANS (CO)* y *FLOWERING LOCUS T (FT)*, los cuales conforman el centro de la vía fotoperiódica (Koornneef y col. 1991). Si bien la función bioquímica de la proteína GI es desconocida, se sabe que forma parte del ciclo circadiano y que regula la expresión del gen *CO* (Fowler y col., 1999). *CO* codifica para una proteína nuclear que posee dominios tipo dedos de zinc de interacción proteína-proteína, y se ha demostrado que la proteína CO directamente promueve la transcripción de *FT* en presencia de luz (Kardailsky y col., 1999). *FT* codifica para una proteína que presenta homología con inhibidores de RAF-kinasa, presentes en animales. La proteína FT indirectamente promueve la floración, sin embargo su función bioquímica aún no es clara (Kobayashi y col. 1999).

El gen *GI* presenta una ritmicidad en su expresión dado que forma parte del ciclo circadiano. Bajo condiciones de fotoperíodo largo el transcrito *GI* alcanza su máxima abundancia alrededor de 12 h después del amanecer y en este momento promueve la expresión del gen *CO*, cuyo transcrito alcanza su máxima abundancia al atardecer. En días cortos el gen *CO* se expresa a la misma hora que en días largos, pero la máxima abundancia del transcrito *CO* se presenta en la oscuridad pues el fotoperíodo se ha acortado (Fowler y col., 1999; Suárez-López y col., 2001; Yanovsky y Kay, 2002).

Además de la regulación de la expresión del gen *CO* por el ciclo circadiano a través de *GI*, *CO* también experimenta una regulación post-transcripcional. Esta regulación es llevada a

cabo por los fotorreceptores CRY1, CRY2, PhyA y PhyB, los que regulan la abundancia de la proteína CO. Los CRYs y PhyA estabilizan a la proteína CO en presencia de luz azul y LFR respectivamente, principalmente en los períodos cercanos a la oscuridad, mientras que PhyB promueve su degradación en presencia de LR, lo que ocurre durante el día (Valverde y col., 2004). En días largos, el efecto de degradación de CO dependiente de PhyB es contrarrestado al atardecer por la acción de los CRYs y PhyA, y de este modo la proteína CO se acumula (Valverde y col., 2004). En días cortos el gen *CO* se expresa en la oscuridad, por lo tanto la proteína CO no puede acumularse ya que es rápidamente reclutada al proteosoma por la proteína SUPPRESSOR OF PHYA-105-1 (SPA1) (Laubinger y col., 2006), la cual posee un dominio característico de proteínas involucradas en reclutamiento al proteosoma (Callis y Vierstra, 2000) e interactúa con la ubiquitina ligasa tipo E3, CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 (COP1) (Hoecker y Quail, 2001). De este modo, el regulador de la floración sensible a la luz y regulado por el ciclo circadiano propuesto por Bünning en 1936 en realidad existe: es la proteína CO.

Todos estos eventos ocurren en la hoja, sin embargo la respuesta fotoperiódica tiene lugar en el meristema apical del tallo. Mucho antes del descubrimiento de los genes *GI*, *CO* y *FT*, se sabía que la señal fotoperiódica era percibida en las hojas y que desde este tejido era emitida una señal hacia el ápice, la cual fue denominada florigeno (Knott, 1934). Las pruebas más contundentes de la llamada teoría del florigeno fueron aquéllas en las que se injertaron hojas inducidas fotoperiódicamente sobre plantas no inducidas y se vio que estas últimas florecían incluso después de varias semanas sin el estímulo fotoperiódico (Zeevaart, 1958). Sin embargo, la naturaleza del florigeno en ese entonces seguía siendo desconocida y se pensaba que podía corresponder a hormonas o azúcares. La conexión

entre la teoría del florígeno y el módulo CO/FT fue evidente cuando fueron identificados los tejidos en los cuales CO y FT actuaban para regular la floración. Estudios realizados utilizando fusiones CO-GFP mostraron que el patrón de expresión espacial de la proteína CO está restringido al floema; además se observó que al expresar el gen *CO* de manera ectópica en el ápice no promovía la floración, pero sí lo hacía al inducir la expresión de *FT* en las células del floema de la hoja (Roussot y col., 2004). Dado que *FT* no se expresa en el meristema apical, se sugirió un movimiento del mRNA o de la proteína desde las hojas hacia el ápice, como proponía la teoría del florígeno. Actualmente se sabe que la proteína FT podría al menos en parte contribuir a la señal del florígeno (Corbesier y col., 2007). FT en el ápice del tallo induce la expresión de diversos factores de transcripción caracterizados por presentar la caja MADS de unión a DNA, los cuales a su vez promueven la expresión de los genes de identidad floral *APETALA 1 (API)* y *FRUITFUL (FUL)*, entre otros (Wigge y col., 2005). Uno de estos factores de transcripción es el codificado por el gen *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS (SOC1)*, el cual ha sido extensamente estudiado por ser considerado el integrador floral de las vías fotoperiódica, autónoma, de vernalización y dependiente de giberelinas en *A. thaliana* (Lee y col., 2000; Moon y col., 2003; Hepworth y col., 2002).

Percepción de las variaciones del fotoperíodo y modelo de coincidencia externa en las plantas perennes de climas templados

Las plantas perennes de climas templados se caracterizan por poseer un ciclo de vida de varios años y una etapa juvenil bastante larga, a diferencia de *A. thaliana* o los cereales, que presentan un ciclo de vida anual o bianual. Para asegurar su supervivencia, las plantas

perennes se han adaptado a las condiciones adversas de su entorno para poder alcanzar la etapa adulta, en la cual puede tener lugar el ciclo reproductivo. Así, las plantas perennes además de responder con la floración ante condiciones inductivas de día largo, responden a las condiciones de día corto con una serie de respuestas conocidas en su conjunto como síndrome otoñal, que según la especie puede incluir el cese del crecimiento, la aclimatación al frío, la abscisión de las hojas y del ápice del tallo, la formación de yemas y la inducción de la endodormancia de éstas (Fuchigami y col., 1971; Proebsting y col. 1976; Spencer y Titus, 1972; Doorembos, 1953). Las yemas latentes son estructuras meristemáticas en las que tiene lugar el desarrollo inicial de tejidos como las inflorescencias o las hojas, y que poseen la capacidad de entrar en un estado de inactividad, conocido como endodormancia (Lang y col., 1987). Las yemas durante el verano se encuentran en estado paradormante (PD), en el cual la inhibición del crecimiento depende de factores hormonales, y luego éstas transitan al estado endodormante (ED), en el cual la inhibición del crecimiento proviene de un factor endógeno, propio de la yema (Lang y col., 1987). El desarrollo de yemas en las plantas perennes es sin duda un éxito adaptativo que les ha asegurado la supervivencia, pues en este estado las yemas pueden resistir las severas condiciones del invierno hasta la llegada de la temporada favorable, cuando se reinicia el crecimiento (J.E., Olsen, 2006). Tempranamente fue propuesto que el acortamiento del fotoperíodo es percibido en las hojas y que en ellas se produce una señal que es transmitida a las yemas induciendo su dormancia (Hemberg, 1949; Wareing, 1956). En general, el acortamiento del fotoperíodo induce la dormancia de yemas en diversos tipos de plantas perennes como el álamo, *Populus sp.* (Howe y col., 1996), el abedul, *betula sp.* (Li y col.,

2003), la vid rústica, *Vitis riparia*, (Wake y Fennell, 2000) y el telefio, *Sedum telephium*, (Heide, 2001).

En los últimos años se ha demostrado que las respuestas de las plantas perennes al acortamiento del fotoperíodo requieren de la participación de los Phys. Experimentos realizados en *Populus trichocarpa* muestran que pulsos de LR suministrados durante el ciclo de oscuridad inhiben completamente la dormancia de las yemas, y que esta inhibición puede ser revertida por pulsos de LFR (Howe y col., 1996). Adicionalmente, plantas transgénicas de *Populus tremula* × *Populus tremuloides* que sobreexpresan el gen PHYA se comportan como si estuvieran en días largos y no experimentan el síndrome otoñal (Olsen y col., 1997).

Uno de los avances más significativos del último tiempo relacionado con el modelo de percepción del largo del día, es el descubrimiento de que el módulo CO/FT es un elemento central en las respuestas dependientes de fotoperíodo no sólo en plantas de ciclo anual sino que también en plantas perennes (Böhlenius y col. 2006), lo cual pone en evidencia que la percepción de las variaciones fotoperiódicas es una respuesta adaptativa sumamente conservada a nivel molecular entre plantas con hábitos de crecimiento tan diferentes como *A. thaliana*, una planta herbácea anual, y *Populus sp.*, una planta perenne leñosa.

Genes involucrados en la percepción de los cambios en el fotoperíodo en *Vitis vinifera*, una planta perenne leñosa

Vitis vinifera es un frutal caducifolio en el que la entrada en el estado ED de las yemas es una respuesta inducida por el acortamiento del fotoperíodo o las bajas temperaturas o ambos estímulos (Schnabel y Wample, 1987; Salzman et al, 1996). En *V. vinifera* L. cv.

Cabernet Sauvignon fueron aislados y secuenciados dos genes asociados a la percepción del cambio en el fotoperíodo, *VvFT* y *VvMADS8*, homólogos de los genes *FT* y *SOC1* de *A. thaliana* (Sreekantan y Thomas, 2006). Sin embargo, en este cultivar el estudio de *VvFT* y *VvMADS8* se ha enfocado solamente en la respuesta de floración (Boss y col., 2006; Sreekantan y Thomas, 2006). Estudios recientes en el cultivar Thompson Seedless han mostrado que la entrada en el estado ED de las yemas es gatillada exclusivamente por el acortamiento del fotoperíodo, y se ha determinado que el fotoperíodo crítico para esta respuesta es cercano a 14 h, lo que tiene lugar durante el último tercio del mes de Enero (Kühn y col., 2009). De este modo, dado que el fotoperíodo es la única variable ambiental que induce la entrada en el estado ED de las yemas de *V. vinifera* L. cv. Thompson Seedless, este cultivar puede constituir un buen modelo para estudiar el rol de los fitocromos y del módulo CO/FT en la percepción de los cambios en el fotoperíodo en plantas perennes leñosas.

Hipótesis

En *V. vinifera* L. cv. Thompson Seedless la entrada en el estado endodormante (ED) de las yemas es inducida exclusivamente por el acortamiento del fotoperíodo. Dado que se ha demostrado que los *Phys* y el módulo CO/FT juegan un rol clave en respuestas dependientes del fotoperíodo, se postula: “El patrón de expresión diario de los transcritos *VvPHYA*, *VvPHYB*, *VvFT* y *VvMADS8* debe modificarse con la entrada de las yemas en el estado ED, mientras que *VvCO*, por ser un gen cuya expresión está regulada por el ciclo circadiano, no debiera modificar su patrón diario de expresión con los cambios en el fotoperíodo”.

Objetivo general

Estudiar en hojas de *V. vinifera* L. cv. Thompson Seedless el efecto del acortamiento del fotoperíodo en el patrón de expresión diario de los genes *VvPHYA*, *VvPHYB*, *VvCO*, *VvFT* y *VvMADS8*, antes, durante y después del período en el cual ocurre la entrada de las yemas en el estado ED.

Objetivos específicos

1. Muestrear hojas del cultivar Thompson Seedless cada 3-6 h, durante un ciclo completo de 24 h, el 21 de Diciembre, el 23 de enero y el 12 de Abril.
2. Evaluar la expresión de los genes *VvPHYA*, *VvPHYB*, *VvCO*, *VvFT* y *VvMADS8* en condiciones de fotoperíodo largo (21 de Diciembre), en la transición hacia el estado ED de yemas (23 de Enero) y en condiciones de fotoperíodo corto (12 de Abril).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las hojas de vid (*V. vinifera* L. cv. Thompson Seedless) fueron obtenidas de plantas de 8 años, crecidas en condiciones naturales en la estación experimental La Platina, del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) ubicado en Santiago (33°34'S). Las hojas fueron colectadas cada 3-6 h aproximadamente, durante un ciclo de 24 h, en tres fechas correspondientes al 21 de Diciembre, 23 de Enero y 12 de Abril, cuando las yemas latentes se encuentran en el estado paradormante (PD), lo que corresponde a condiciones de fotoperíodo largo, en la transición hacia el estado endodormante (ED) y cuando las yemas latentes se encuentran en el estado ED, lo que corresponde a condiciones de fotoperíodo corto, respectivamente.

Estimaciones de la extensión del período de luz

La extensión del período de luz fue estimada a la latitud de Santiago de Chile (33°34'S) el 21 de Diciembre, el 23 de Enero y el 12 de Abril. Los valores de la extensión del período de luz se obtuvieron de la página *web* <http://www.moonstick.com/sunrisetset.htm>, en la cual, para el cálculo de estos valores, se utiliza un método que considera como variables la salida y puesta del sol, la longitud eclíptica, la declinación y ascensión del sol, la ecuación de tiempo y la longitud y latitud del lugar.

Diseño de partidores específicos

Para el diseño de partidores específicos de *VvFT* y *VvMADS8* se utilizaron las secuencias encontradas en la base de datos de NCBI de *VvFT* (n° de acceso gb DQ504308) y

VvMADS8 (n° de acceso gb DQ504309). Los partidores se diseñaron utilizando el programa primer3 (Rozen and Skasletsky, 2000).

Las secuencias *VvPHYA*, *VvPHYB* y *VvCO* no se encuentran reportadas en las bases de datos públicas, de modo que para el diseño de partidores específicos para *VvPHYA*, *VvPHYB* y *VvCO* se utilizó una estrategia que consistió en hacer un BLAT (BLAST-like alignment tool) search (Kent, 2002) en la base de datos del genoma de *V. vinifera*, GENOSCOPE (<http://www.genoscope.cns.fr>), con las secuencias completas de cDNA de *PHYA*, *PHYB* y *CO* de *A. thaliana* obtenidas de la base de datos de NCBI. La herramienta BLAT search es similar al BLAST convencional, pero para realizar los alineamientos requiere al menos 40 nucleótidos similares (el BLAST sólo requiere 10) y una identidad mayor al 80% (el BLAST no considera la identidad para realizar los alineamientos). La secuencia de cDNA putativa obtenida en GENOSCOPE se utilizó para el diseño de partidores específicos. Los partidores se diseñaron utilizando el programa primer3 (Rozen y Skasletsky, 2000) (Tabla 1).

Óligo	Secuencia partidior directo	Secuencia partidoor inverso
<i>Vvphya</i>	5' AGCTTGGAAGGCTTTGTGA 3'	5' TGACATGGATGGCAAACACT 3'
<i>Vvphyb</i>	5' CTCATTAGCGATGGCTGTCA 3'	5' TGGGACCGAAACCAGAATAG 3'
<i>Vvco</i>	5' TGTTGCTGAACCCAGTGAAG 3'	5' GCCTGAGAAAAGGTCGATTG 3'
<i>Vvft</i>	5' ACATTGGAGGGGATGACTTG 3'	5' ATTGCGGATTATGCTTCACC 3'
<i>Vvmads8</i>	5' ACGATATCAACGGCACACAA 3'	5' TGGACCCCTTCATCAGTTTC 3'

Tabla 1: Secuencia de los partidores inverso y directo de *Vvphya*, *Vvphyb*, *Vvco*, *Vvft* y *Vvmads8*.

Extracción de RNA

El RNA total de hojas maduras de vid fue extraído de 0.5-0.7 g de tejido, de acuerdo a una modificación del protocolo de extracción de RNA desarrollado por Chang y col. (1993) descrita en Noriega y col. (2007). El tejido se muele utilizando nitrógeno líquido y luego es mezclado en un tubo que contiene buffer CTAB (2% p/v CTAB, 2% p/v PVP, 0.1M Tris pH 8.0, 25mM EDTA, 2M NaCl, agua DEPC) y β -mercaptoetanol 2% v/v. La mezcla se mantiene a 65°C por 30 min., y se agita cada 10 min. Posteriormente, se traspasa a un tubo que contiene lana de vidrio el cual se encuentra dentro un tubo colector y se centrifuga a 400 g durante de 10 min. a 4°C. A continuación, el filtrado se lava con 1 volumen de cloroformo : alcohol isoamílico (24 : 1) dos veces y se centrifuga a 2000 g por 20 min. a 4°C. La fase superior se recupera y se mezcla con 2.0 - 2.5 volúmenes de etanol 100% v/v para la precipitación del RNA durante la noche a -20°C. Posteriormente, el RNA se centrifuga a 2000 g por 20 min. a 4°C, y el sobrenadante se lava con 1 mL de etanol 70% v/v. Luego se resuspende en 200 μ L de agua DEPC. Los extractos se tratan con 5 U de DNasa 10 U/ μ L (Winkler) por μ g de RNA durante 1 h a 37°C, y luego se llevan a 85°C por dos minutos para inactivar la enzima. Mediante PCR se chequea que el DNA haya sido degradado, y para esto se utilizan partidores del gen de actina de *V. vinifera* (n° de acceso gi: AY680701). Dado que los extractos presentan ciertos contaminantes, se procede a realizar una purificación de RNA con sílica, la cual consiste en mezclar el RNA con 1 volumen de NaI 6M, 0.5 volúmenes de etanol 100% v/v y 25 μ L de sílica en NaI 3M (100 mg/mL). La mezcla se mantiene a temperatura ambiente por 10 min. y se agita cada 2, luego se centrifuga durante 1 min. a 13.000 g. Posteriormente, el precipitado se lava 3 veces con 500 mL de buffer de lavado (10mM Tris pH 7.5, 50mM NaCl, 2.5mM EDTA,

50% v/v etanol), y es centrifugado 1 min. a 13.000 g después de cada lavado. Luego de la última centrifugación, el sobrenadante se descarta y el precipitado se deja secar durante 30 min. Finalmente, el RNA purificado se resuspende en 80 μ L de agua DEPC, se deja durante 5 min. a temperatura ambiente y luego se centrifuga por 2 min. a 13.000 g para que precipite la sílica. El RNA purificado se almacena a -80°C .

Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se utilizaron 5 μ g de RNA, 1 μ L oligo(dT)_{12-18} 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1 μ L dNTP Mix 10mM, y agua DEPC hasta completar un volumen de 14 μ L. Esta mezcla se llevó a un termociclador (Thermocycler MJ Research PTC-150) por 15 min. a 65°C . Posteriormente, se utilizó el kit SuperScript™ III RT (Invitrogen, USA) y se agregó 1 μ L de SuperScript™ III RT 200 U/ μ L, 4 μ L de 5X Buffer (250mM Tris-HCl pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl_2) y 1 μ L de DTT 0.1M. La mezcla se llevó al termociclador por 30 min. a 50°C para la síntesis y por 15 min. a 70°C para la inactivación de la reacción.

PCR

Para la reacción de PCR se utilizó 1 μ L de cDNA, en un volumen final de 12.5 μ L. Se añadió 0.25 μ L de cada partidor (preparados a una concentración de 10 μ M), 0.2 μ L de Platinum® Taq DNA Polymerase 5 U/ μ L (Invitrogen, USA), 0.25 μ L de dNTP Mix 10mM, 1.25 μ L de 10X PCR Buffer (Tris-HCl 200mM pH 8.4 y KCl 500mM), 0.3 μ L de MgCl_2 50mM y 9.1 μ L de agua DEPC. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (Thermocycler MJ Research PTC-150), programado para realizar 35 ciclos de PCR, siendo cada uno de ellos de 30 s a 94°C , 30 s a 55°C y 45 s a 72°C . La extensión

final se hizo a 72°C por 10 min. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa 1.5 % el que fue corrido en Buffer TAE 1X (0.038M Tris, 1mM EDTA, 1.1 % v/v ácido acético glacial) a 70 Volts. Éstos fueron visualizados mediante tinción con Bromuro de Etidio (10 mg/mL). Se utilizó como control de PCR una reacción con partidores del gen de actina de *V. vinifera* (n° de acceso gi: AY680701). Dado que el objetivo de este trabajo es evaluar una tendencia en el comportamiento de los transcritos en una primera aproximación, sólo se realizó un PCR por cada muestra colectada.

Determinación de la abundancia de transcritos

La abundancia de los transcritos se determinó con el programa MCID analysis (InterFocus Imaging Ltda. UK), que entrega la intensidad de color de la bandas en el gel.

Secuenciación y caracterización de los fragmentos amplificados

Para realizar la secuenciación de los fragmentos amplificados mediante PCR, éstos fueron purificados usando el sistema Montage PCR Filter Units (Millipore, Amicon USA). Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo usando 2 µL de producto de PCR con una concentración de 20 ng/µL, 5 pmol de partidor 10µM y 2 µL de DYENAMIC ET Terminator cycle kit (Amersham Bioscience) en un volumen de reacción de 10 µL. Los fragmentos a secuenciar se analizaron con un secuenciador de 4 capilares ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se editaron, eliminando los extremos donde la secuenciación no logró identificar nucleótidos correctamente. Las secuencias resultantes, denominadas *VvPHYA*, *VvPHYB*, *VvCO*, *VvFT* y *VvMADS8* se analizaron en las bases de datos disponibles en la *web*. Dado que las

secuencias de los genes *VvPHYA*, *VvPHYB* y *VvCO* no están reportadas en las bases de datos públicas, para la caracterización de los fragmentos amplificados se realizaron alineamientos múltiples entre las secuencias aminoacídicas deducidas de *VvPHYA*, *VvPHYB* y *VvCO* y las secuencias de los 6 productos proteicos que presentaron los valores de *score* más altos al realizar un BLASTx contra la base de datos de NCBI. La herramienta BLASTx realiza alineamientos en la base de datos de proteínas a partir de una secuencia nucleotídica traducida. Los alineamientos múltiples se hicieron utilizando la herramienta ClustalW Multiple Aligment del programa BioEdit. Con este mismo programa se obtuvo un cladograma, que agrupa las secuencias aminoacídicas según el grado de similitud.

Caracterización de la familia tipo CO en el genoma de *V. vinifera*

Con el fin de averiguar la extensión de la familia de factores de transcripción tipo CO en el genoma de *V. vinifera*, se ingresó a la base de datos de EST de factores de transcripción de *V. vinifera* (<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/web/index.php?sp=vv>). En esta base de datos se encontraron 20 EST asignados como factores de transcripción tipo CO. A continuación se hizo un BLAT search contra la base de datos del genoma de *V. vinifera*, GENOSCOPE y se identificaron 11 loci en el genoma de *V. vinifera* que alineaban con las secuencias EST. Con las secuencias aminoacídicas deducidas de cada uno de los loci identificados se realizaron alineamientos con las secuencias aminoacídicas de CO, COL1 (CO LIKE 1) hasta COL16 (CO LIKE 16) de *A. thaliana* encontradas en la base de datos de NCBI. La homología entre estas secuencias y las secuencias aminoacídicas deducidas de los loci se estimó calculando los valores de similitud entre los dominios funcionales, que corresponden a las denominadas cajas B (cajas B 1 y B 2), utilizando el programa BioEdit.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de los transcritos de *VvPHYA*, *VvPHYB*, *VvCO*, *VvFT* y *VvMADS8* en hojas de *V. vinifera* L. cv. Thompson Seedless

*Aislamiento e identificación de los transcritos *VvFT* y *VvMADS8**

Para el diseño de partidores específicos de *VvFT* (n° de acceso gb DQ504308) y *VvMADS8* (n° de acceso gb DQ504309) se utilizaron las secuencias completas de cDNA encontradas en la base de datos de NCBI. Los amplificados de PCR obtenidos con estos partidores se secuenciaron y se obtuvieron fragmentos que fueron denominados *VvFT* y *VvMADS8* de 261 pb y 412 pb, respectivamente. Con estas secuencias se hizo un BLAT (BLAST-like alignment tool) search (Kent, 2002) en la base de datos del genoma de *V. vinifera*, GENOSCOPE. Se identificaron dos loci, uno ubicado en un cromosoma desconocido y el otro en el cromosoma 15 y éstos fueron asignados como los genes putativos de *VvFT* y *VvMADS8*, respectivamente (Tabla 2). Los análisis de identidad de las secuencias nucleotídicas de los fragmentos amplificados dieron en ambos casos 100% de identidad con las secuencias secuencias completas de cDNA de *VvFT* y *VvMADS8* encontradas en la base de datos de NCBI (Fig. 1).

Los fragmentos amplificados mediante PCR aislados desde extractos de cDNA y DNA de hojas de *V. vinifera* presentaron claras diferencias de tamaño, tanto en el caso de *VvFT* como de *VvMADS8*, lo que se explica por la existencia de secuencias intrónicas en la secuencia de los fragmentos amplificados obtenidos desde extractos de DNA entre los partidores (Fig. 4).

<i>A. thaliana</i>		<i>V. Vinifera</i>			
Gen	Nº de acceso gi (NCBI)	Loci (GENOSCOPE)	Nº cromosoma	Nº de intrones	Nº de exones
<i>PHYA</i>	15217562	GSVIVT00022486001	14	3	4
<i>PHYB</i>	15224231	GSVIVT00033144001	5	3	4
<i>CO</i>	15242402	GSVIVT00038119001	14	3	3
<i>FT</i>	_*	GSVIVT00012870001	No identificado	3	4
<i>MADS8</i>	_*	GSVIVT00026312001	15	6	7

Tabla 2: Identificación y caracterización de loci en el genoma de *V. vinifera* a partir de la secuencia completa de cDNA de *PHYA*, *PHYB* y *CO* de *A. thaliana* y de *VvFT* y *VvMADS8* de *V. vinifera*. El nº de acceso gb de la secuencia completa de cDNA de *VvFT* y *VvMADS8* se encuentra en materiales y métodos.

A

VvFT	1	-----CTAGTCAGCCAACCTAGGGTGGACATTGGAGGGGA	35
DQ504308	181	TGGCTGTGAGTTCAGACCCTCTCAGCTAGTAAGCCAACCTAGGGTGGACATTGGAGGGGA	240
VvFT	36	TGACTTGAGGACCTTCTATACTTTGGTTATGGTGGACCCTGACGCTCCAAGCCCCAGTAA	95
DQ504308	241	TGACTTGAGGACCTTCTATACTTTGGTTATGGTGGACCCTGACGCTCCAAGCCCCAGTAA	300
VvFT	96	TCCGAACCTAAGGGAGTACTTACATTGGTTGGTGGACTGATATTCCAGCAACTACTGGGGC	155
DQ504308	301	TCCGAACCTAAGGGAGTACTTACATTGGTTGGTGGACTGATATTCCAGCAACTACTGGGGC	360
VvFT	156	AAACTTCGGCCAAGAGATTGTGTGTTATGAGAGCCCACGCCAACACCTGGGATTCATCG	215
DQ504308	361	AAACTTCGGCCAAGAGATTGTGTGTTATGAGAGCCCACGCCAACACCTGGGATTCATCG	420
VvFT	216	CTTTGTTTTTGTATTGTTTCGCCAACTGGGTAGGCAGACAGTGTAT-----	261
DQ504308	421	CTTTGTTTTTGTATTGTTTCGCCAACTGGGTAGGCAGACAGTGTATGCACCAGGGTGGCG	480

B

VvMADS8	1	-----ACAAGACTACCGAACATAACATGCAGCATTGAAGCATGAAG	42
DQ504309	541	ATGTTTCATACCAACAACACAAGACTACCGAACATAACATGCAGCATTGAAGCATGAAG	600
VvMADS8	43	CAGCAAATATGGCAAAGAAGATAGAGCTTCTTGAAATTTCCAACGGAAACTCTTAGGAG	102
DQ504309	601	CAGCAAATATGGCAAAGAAGATAGAGCTTCTTGAAATTTCCAACGGAAACTCTTAGGAG	660
VvMADS8	103	AAGGTTTGGGGTCATGCTCCATTGAAGAATAACAACAGATAGAACAACAGTTGGAGCGCA	162
DQ504309	661	AAGGTTTGGGGTCATGCTCCATTGAAGAATAACAACAGATAGAACAACAGTTGGAGCGCA	720
VvMADS8	163	GCGTAAGCAGCATCCGAGCAAGAAAGAAATCAGGTTTTCAAGGAACAAATCGAGCAACTGA	222
DQ504309	721	GCGTAAGCAGCATCCGAGCAAGAAAGAAATCAGGTTTTCAAGGAACAAATCGAGCAACTGA	780
VvMADS8	223	AAGAAAAGGAGAAAAGCCCTAGCAGCTGAAAAATGCAATGCTGTGTGAAAAGTGTGGGGTGC	282
DQ504309	781	AAGAAAAGGAGAAAAGCCCTAGCAGCTGAAAAATGCAATGCTGTGTGAAAAGTGTGGGGTGC	840
VvMADS8	283	AACCGTATCAAGCTCCGAATCAAGAGAATGAAACTTTGCCTAGTGCAGAGAGAAGCCAAA	342
DQ504309	841	AACCGTATCAAGCTCCGAATCAAGAGAATGAAACTTTGCCTAGTGCAGAGAGAAGCCAAA	900
VvMADS8	343	ATTCAGATGTCTCCACTGACTTGTTCATTGGACTGCCTGAGGGGAGAGCCAAGCGCCTCC	402
DQ504309	901	ATTCAGATGTCTCCACTGACTTGTTCATTGGACTGCCTGAGGGGAGAGCCAAGCGCCTCC	960
VvMADS8	403	TATTGGGAAA-----	412
DQ504309	961	TATTGGGAAACTGATGAAGGGGTCCATGCTCAGCAACACTGCTATATACTATGAGTTGCA	1020

Fig. 1: Alineamiento de secuencias nucleotídicas entre los fragmentos amplificados *VvFT* y *VvMADS8* y las secuencias de cDNA deducidas de los loci correspondientes a los genes putativos *VvFT* (A) y *VvMADS8* (B). En ambos casos se obtuvo 100% de identidad de secuencia nucleotídica.

Aislamiento e identificación de los transcritos VvPHYA, VvPHYB y VvCO

Las secuencias *VvPHYA*, *VvPHYB* y *VvCO* no se encuentran reportadas en las bases de datos públicas, de modo que para el diseño de partidores específicos se utilizó una estrategia que consistió en hacer un BLAT search en la base de datos del genoma de *V. vinifera*, GENOSCOPE, con las secuencias completas de cDNA de *PHYA*, *PHYB* y *CO* de *A. thaliana*. Las secuencias de putativas de cDNA obtenidas de GENOSCOPE se utilizaron para el diseño de partidores. Los amplificadores de PCR obtenidos con los partidores específicos se secuenciaron y se obtuvieron fragmentos que fueron denominados *VvPHYA*, *VvPHYB* y *VvCO* de 458, de 333 y 240 pares de bases, respectivamente.

Estas secuencias se buscaron en GENOSCOPE mediante un BLAT search, identificándose tres loci ubicados en los cromosomas 14, 5 y 14, los que fueron asignados como los genes putativos *VvPHYA*, *VvPHYB* y *VvCO*, respectivamente (Tabla 2). La identidad de secuencia obtenida con la herramienta BLAT search de GENOSCOPE entre los fragmentos amplificados *VvPHYA*, *VvPHYB* y *VvCO* y los genes putativos *VvPHYA*, *VvPHYB* y *VvCO* identificados en GENOSCOPE fue de 98.7%, 98.8% y 100%, respectivamente. Los resultados de los análisis de identidad entre las secuencias aminoacídicas deducidas de *VvPHYA*, *VvPHYB* y *VvCO* y las secuencias de los productos proteicos obtenidos al realizar un BLASTx contra la base de datos de NCBI se resumen en la Tabla 3. La similitud entre estas secuencias se esquematiza en los respectivos cladogramas de la Figura 2. Los alineamientos múltiples entre estas secuencias se muestran en la Figura 3.

<i>VvPHYA</i>			<i>VvPHYB</i>			<i>VvCO</i>		
Productos proteicos	Nº de acceso	% de ident.	Productos proteicos	Nº de acceso	% de ident.	Productos proteicos	Nº de acceso	% de ident.
Prot. hipotética de <i>Vitis vinifera</i>	CAN76586	95	Prot. no asignada de <i>Vitis vinifera</i>	CAO44915	97	Prot. hipotética de <i>Vitis vinifera</i>	CAN74840	97
PhyA de <i>Orobancha densiflora</i>	CAJ80948	76	PhyB de <i>Averrhoa carambola</i>	AAG49048	95	Prot. no asignada de <i>Vitis vinifera</i>	CAO49246	98
PhyA de <i>Xanthorhiza simplicissima</i>	AAK20993	90	PhyB1 de <i>Populus balsamifera</i>	AAG25725	94	CO2 de <i>Populus deltoides</i>	AAS00055	69
PhyA de <i>Heuchera canadiensis</i>	AAK20967	89	PhyB2 de <i>Populus tremula</i>	CAJ21307	94	Prot. no asignada de <i>Populus trichocarpa</i>	ABK95723	66
PhyA de <i>Solanum lycopersicum</i>	CAA05086	90	PhyB2 de <i>Populus balsamifera</i>	AAG25726	93	CO1 de <i>Populus deltoides</i>	AAS00054	66
PhyA de <i>Solanum tuberosum</i>	ABA46868	89	PhyB de <i>Celastrus canadensis</i>	AAG49062	93	CO1 de <i>Chenopodium rubrum</i>	ACB36911	68

Tabla 3: Identidad entre las secuencias aminoacídicas deducidas de *VvPHYA*, *VvPHYB* y *VvCO* y los productos proteicos que presentaron mayor *score* al realizar un BLASTx contra la base de datos de NCBI. En la tabla se ordenan los productos proteicos de mayor a menor *score* (el *score* considera el largo del alineamiento y el porcentaje de identidad).

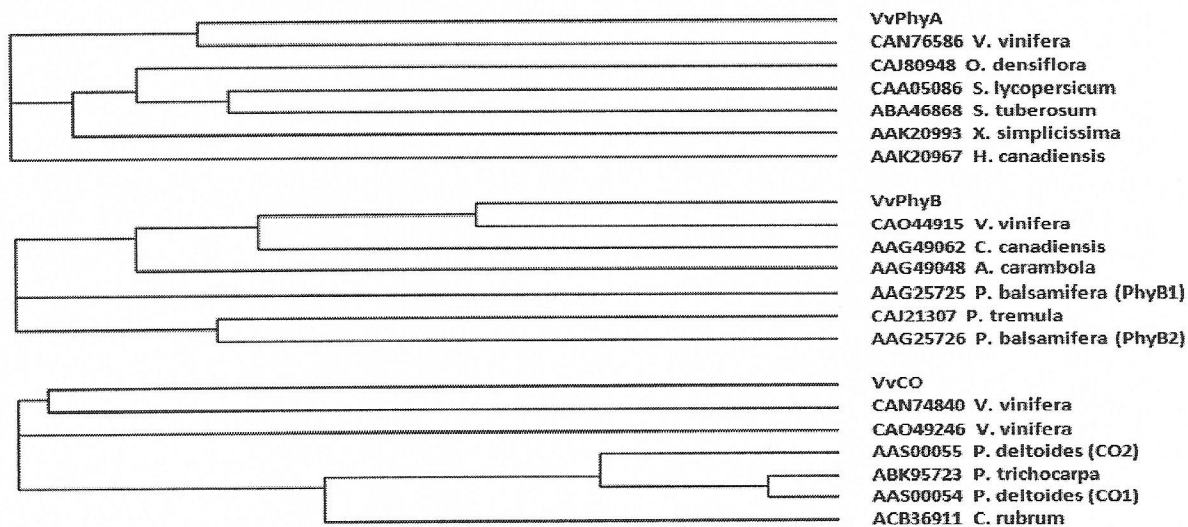


Figura 2: Cladograma que esquematiza cómo se agrupan las secuencias que presentaron mayor similitud.

A

VvPhyA	1	-----CSQALKPKYVGLHYPATDIPQAARFLFMKNKVRMICDCRAKHIQV	44
CAN76586 V. vinifera	240	AYKFHDDDHGEVVSSEITKPGLEPYLGLHYPATDIPQAARFLFMKNKVRMICDCRAKHIQV	299
CAJ80948 O. densiflo	79	IYKFHDDDHGEVVSSEITKPGLEPYLGLHYPATDIPQAARFLFMKNKVRMICDCRAKHIQV	138
AAK20993 X. simplicif	79	VYKFHDDDHGEVVSSEITKPGLEPYLGLHYPATDIPQAARFLFMKNKVRMICDCRAKHIQV	138
AAK20967 H. canadens	79	AYKFHDDDHGEVVSSEITKPGLEPYLGLHYPATDIPQAARFLFMKNKVRMICDCRAKHIQV	138
CAA05086 S. lycopers	241	GKFKHDDDHGEVVSSEITKPGLEPYLGLHYPATDIPQAARFLFMKNKVRMICDCRAKHIQV	300
ABA46868 S. tuberosu	241	GKFKHDDDHGEVVSSEITKPGLEPYLGLHYPATDIPQAARFLFMKNKVRMICDCRAKHIQV	300
VvPhyA	45	LQDEKLPFDLTLGCGTLRAPHSCHVQYMNENMNSIASLVMVAVVNDGDEEGESSNSGQPPQK	104
CAN76586 V. vinifera	300	LQDEKLPFDLTLGCGTLRAPHSCHVQYMNENMNSIASLVMVAVVNDGDEEGESSNSGQPPQK	359
CAJ80948 O. densiflo	139	VQDDNLPFDLALCGSTLRAPHGCHLQYMNENMNSIASLVMVAVVNDGDEEGESSNSGQPPQK	197
AAK20993 X. simplicif	139	LQDEKLPFDLTLGCGTLRAPHSCHVQYMNENMNSIASLVMVAVVNDGDEEGESSNSGQPPQK	198
AAK20967 H. canadens	139	LQDEKLPFDLTLGCGTLRAPHSCHVQYMNENMNSIASLVMVAVVNDGDEEGESSNSGQPPQK	198
CAA05086 S. lycopers	301	VQDEKLPFDLTLGCGTLRAPHSCHVQYMNENMNSIASLVMVAVVNDGDEEGESSNSGQPPQK	360
ABA46868 S. tuberosu	301	VQDEKLPFDLTLGCGTLRAPHSCHVQYMNENMNSIASLVMVAVVNDGDEEGESSNSGQPPQK	360
VvPhyA	105	RKRLWGLVVCHHTTLRFVPE-----	123
CAN76586 V. vinifera	360	RKRLWGLVVCHHTTPRFVPPFLRYACEFLAQVFAIHVNKELELENSQILEKNIILRTQTLLC	419
CAJ80948 O. densiflo	198	RKRLWGLVVCHHTTPRFVPPFLRYACEFLAQVFAIHVNKELELENSQILEKNIILRTQTLLC	257
AAK20993 X. simplicif	199	RKRLWGLVVCHHTTPRFVPPFLRYACEFLAQVFAIHVNKELELENSQILEKNIILRTQTLLC	258
AAK20967 H. canadens	199	RKRLWGLVVCHHTTPRFVPPFLRYACEFLAQVFAIHVNKELELENSQILEKNIILRTQTLLC	258
CAA05086 S. lycopers	361	RKRLWGLVVCHHTTPRFVPPFLRYACEFLAQVFAIHVNKELELENSQILEKNIILRTQTLLC	420
ABA46868 S. tuberosu	361	RKRLWGLVVCHHTTPRFVPPFLRYACEFLAQVFAIHVNKELELENSQILEKNIILRTQTLLC	420

B

VvPhyB	1	-----NLMRLWGLVVCHPTTSARCIFFPLRYACEFLMQAFGLQLNMELQLASQLSEK	51
CAO44915 V. vinifera	354	NDEEATGGRNLMRLWGLVVCHHTSARCIFFPLRYACEFLMQAFGLQLNMELQLASQLSEK	413
AAG49048 A. carambol	156	NDEEATGGRNSMRLWGLVVCHHTSARCIFFPLRYACEFLMQAFGLQLNMELQLASQLSEK	215
AAG25725 P. balsamif	361	NDEEATGGRNSTRLWGLVVCHHTSARCIFFPLRYACEFLMQAFGLQLNMELQLASQLSEK	420
CAJ21307 P. tremula	359	NDEEATGGRNSMRLWGLVVCHHTSARCIFFPLRYACEFLMQAFGLQLNMELQLASQLSEK	418
AAG25726 P. balsamif	359	NDEEATGGRNSMRLWGLVVCHHTSARCIFFPLRYACEFLMQAFGLQLNMELQLASQLSEK	418
AAG49062 C. scandens	156	TDEEVIGGRNATRLWGLVVCHHTSARCIFFPLRYACEFLMQAFGLQLNMELQLASQLSEK	215
VvPhyB	52	HVLRQTOTLLCDMLLRDSPTGIVTQSPSMDLVKCDGAALYYQCKYYPVGVTPTEAQIKD	110
CAO44915 V. vinifera	414	HVLRQTOTLLCDMLLRDSPTGIVTQSPSMDLVKCDGAALYYQCKYYPVGVTPTEAQIKDI	473
AAG49048 A. carambol	216	HVLRQTOTLLCDMLLRDSPTGIVTQSPSMDLVKCDGAALYYQCKYYPVGVTPTEAQIKDI	275
AAG25725 P. balsamif	421	HVLRQTOTLLCDMLLRDSPTGIVTQSPSMDLVKCDGAALYYQCKYYPVGVTPTEAQIKDI	480
CAJ21307 P. tremula	419	HVLRQTOTLLCDMLLRDSPTGIVTQSPSMDLVKCDGAALYYQCKYYPVGVTPTEAQIKDI	478
AAG25726 P. balsamif	419	HVLRQTOTLLCDMLLRDSPTGIVTQSPSMDLVKCDGAALYYQCKYYPVGVTPTEAQIKDI	478
AAG49062 C. scandens	216	HVLRQTOTLLCDMLLRDSPTGIVTQSPSMDLVKCDGAALYYQCKYYPVGVTPTEAQIKDI	275

C

VvCO	1	G-EVDEYLDLVEYNSCPENQFSDOYNQQPPPHYSVPHKKNYGGDRVVPVQCGEARQQLHQ	59
CAN74840 V. vinifera	181	G-EVDEYLDLVEYNSCPENQFSDOYNQQPPPHYSVPHKKNYGGDXVVPVQCGEARQQLHQ	239
CAO49246 V. vinifera	163	G-EVDEYLDLVEYNSCPENQFSDOYNQQPPPHYSVPHKKNYGGDRVVPVQCGEARQQLHQ	221
AAS00055 P. deltoide	170	G-EVDEYLDLVEYNSCPENQFSDOYNQQPPPHYSVPHKKNYGGDRVVPVQCGEARQQLHQ	224
ABK95723 P. trichoca	40	G-EVDEYLDLVEYNSCAENQYSDOYNQQPPPHYSVPHKKNYGGDRVVPVQCGEARQQLHQ	94
AAS00054 P. deltoide	218	G-EVDEYLDLVEYNSCAENQYSDOYNQQPPPHYSVPHKKNYGGDRVVPVQCGEARQQLHQ	272
ACB36911 C. rubrum	166	G-EVDEYLDLVEYNSCAENQFSDOYNQQPPPHYSVPHKKNYGGDRVVPVQCGEARQQLHQ	222
VvCO	60	QH-QQQGFHLGMEYBSSKAAAY	79
CAN74840 V. vinifera	240	QH-QQQGFHLGMEYBSSKAAAY	259
CAO49246 V. vinifera	222	QH-QQQGFHLGMDHSVSVSSM	241
AAS00055 P. deltoide	225	R--OYHNFQLGMEYBSSKAAAY	243
ABK95723 P. trichoca	95	QQQHHNFQLGMEYBPAKAAAY	105
AAS00054 P. deltoide	273	QQQOYHNFQLGMEYBPAKAAAY	293
ACB36911 C. rubrum	223	---YQNFLGMECET-RSEY	238

Figura 3: Alineamientos múltiples entre las secuencias aminoacídicas deducidas de (A) *VvPHYA*, (B) *VvPHYB*, (C) *VvCO* y los productos proteicos encontrados al realizar un BLASTx contra la base de datos de NCBI

Las secuencias de cDNA de los productos proteicos de *V. vinifera* encontrados al realizar el BLASTx se analizaron en GENOSCOPE. Al realizar un BLAT search en GENOSCOPE con la secuencia de cDNA de la proteína designada como proteína hipotética de *V. vinifera* (n° de acceso: CAN76586) se obtuvo un 100% de identidad con el locus GSVIVT00022486001, asignado como el gen putativo de *VvPHYA*. Al realizar un BLAT search en GENOSCOPE con la secuencia de cDNA de la proteína no asignada de *V. vinifera* (n° de acceso: CAO44915) se obtuvo un 100% de identidad con el locus GSVIVT00033144001, asignado como el gen putativo de *VvPHYB*. Al realizar un BLAT search en GENOSCOPE con la secuencia de cDNA de la proteína designada como proteína hipotética de *V. vinifera* (n° de acceso: CAN74840) y con la proteína no asignada de *V. vinifera* (n° de acceso: CAO49246) se obtuvo en ambos casos un 100% de identidad con el locus GSVIVT00038119001, asignado como gen putativo de *VvCO*.

Dado que se sabe que en tomate y otras especies hay dos isoformas de fitocromos, PhyB1 y PhyB2, se busco si hay más de una secuencia *PHYB* en el genoma de *V. vinifera*, para lo cual se hizo un BLAT search en GENOSCOPE con las secuencias nucleotídicas de las proteínas PhyB1 y PhyB2 de tomate. Se encontró que ambas secuencias se alineaban con el locus GSVIVT00033144001, el cual corresponde al gen putativo *VvPHYB* (resultados no mostrados), lo que indica que en el genoma de *V. vinifera* sólo hay un gen *PHYB*.

Los fragmentos amplificados mediante PCR aislados desde extractos de cDNA y DNA de hojas de *V. vinifera* presentaron el mismo tamaño, tanto en el caso de *VvPHYA* como de *VvPHYB*, lo que indica la ausencia de intrones en la zona amplificada (Fig. 4). En el caso de *VvCO*, el tamaño de los fragmentos difiere pues hay secuencias intrónicas en la secuencia de los fragmentos amplificados aislados desde extractos de DNA (Fig. 4).

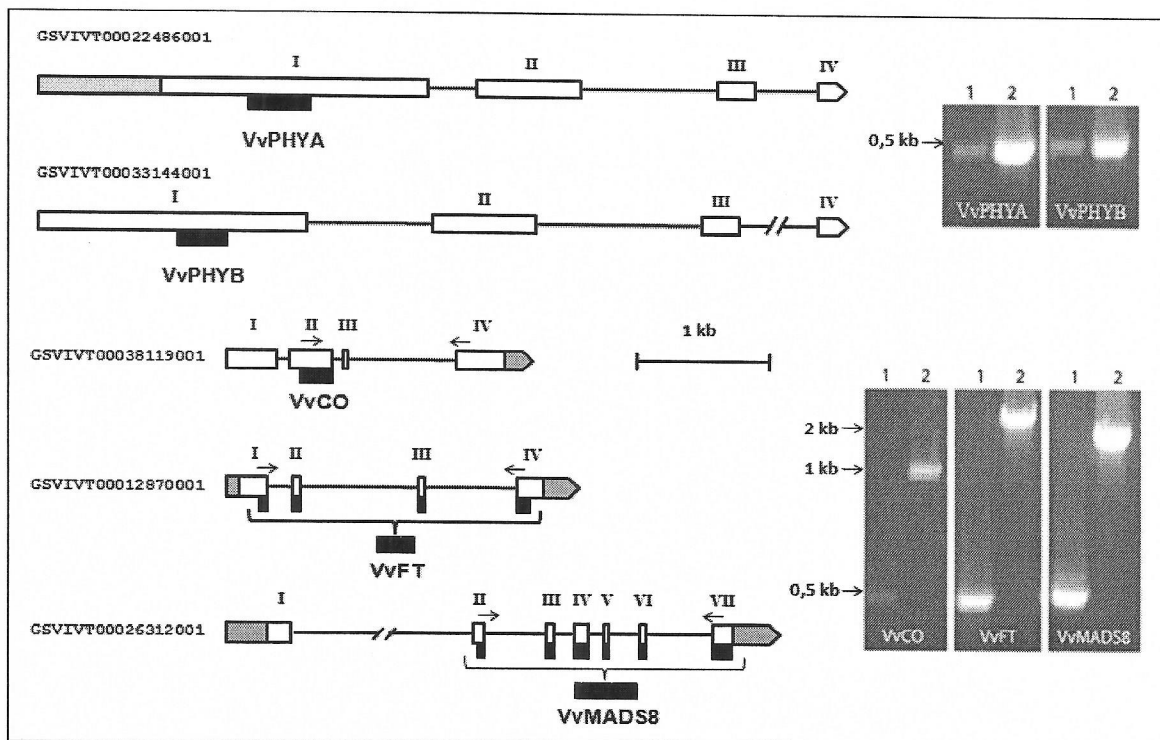


Fig. 4: Esquema del alineamiento entre los fragmentos amplificados y los loci correspondientes a los genes putativos *VvPHYA*, *VvPHYA*, *VvPHYB*, *VvCO*, *VvFT* y *VvMADS8*, identificados en la base de datos del genoma de *V. vinifera*, GENOSCOPE. Las cajas blancas representan exones; las cajas grises representan la región 5' UTR; las cajas grises terminadas en punta representan la región 3' UTR; las cajas negras representan los fragmentos amplificados; las líneas corresponden a intrones y las flechas a los partidores directo e inverso. A la derecha se muestran los fragmentos amplificados a partir de cDNA (1) y DNA (2).

Familia de factores de transcripción tipo CO en *V. vinifera*

Con el fin de averiguar la extensión de la familia de factores de transcripción tipo CO, se ingresó en la base de datos de EST de factores de transcripción de *V. vinifera*, Grape Transcription Factor Database (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/web/index.php?sp=vv>). Con las secuencias EST asignadas como factores de transcripción tipo CO, se llevó a cabo un BLAT search en GENOSCOPE y se identificaron 11 loci en el genoma de *V. vinifera* que podrían corresponder a factores de transcripción tipo CO.

En *Arabidopsis* la familia de factores de transcripción tipo CO está compuesta por 16 proteínas, que tienen en común el presentar las denominadas cajas B, similares a dominios tipo dedos de zinc, que regulan las interacciones proteína-proteína en muchos factores de transcripción animales (Coupland y col., 2003). Estas cajas son sumamente conservadas entre diferentes especies y definen tres grupos de factores de transcripción tipo CO. En *Arabidopsis* el grupo I incluye a CO, COL1-COL5, proteínas que se caracterizan por tener las cajas B 1 y B 2, y un motivo distintivo de 6 aminoácidos (secuencia consenso G-I/V-V-P-S/T-F). Dentro del grupo I hay un subgrupo denominado grupo Ia, que en *Arabidopsis* incluye a las proteínas CO, COL1 y COL2, las cuales presentan alta similitud entre ellas. Las proteínas del grupo II, que incluye a COL6-COL8 y COL16 en *Arabidopsis*, poseen sólo la caja B 2. Las proteínas del grupo III, que incluye a COL9-COL15 en *Arabidopsis*, posee la caja B 2 y un dominio tipo dedos de zinc (ZFD). Además de las cajas B existe otro dominio altamente conservado en la familia de factores de transcripción tipo CO, el cual corresponde a una región de 43 aminoácidos cercana al carboxilo terminal, llamada dominio CCT (CO, CO-like, TOC1).

Para caracterizar los 11 loci encontrados en el genoma de *V. vinifera* se llevaron a cabo alineamientos entre las secuencias aminoacídicas deducidas de estos loci y las secuencias de CO, COL1-COL16 de *A. thaliana*. La clasificación de los loci se hizo considerando la presencia o ausencia de cajas B en las correspondientes secuencias aminoacídicas y por la presencia de el ZFD. Aquéllos loci que no se alineaban con las secuencias de CO, COL1-COL16 ni presentaban cajas B, se caracterizaron realizando un BLASTx contra la base de datos de NCBI. La homología entre las secuencias clasificadas como pertenecientes al grupo I en *V. vinifera* y las secuencias del grupo I de *A. thaliana* fue determinada

estimando los valores de similitud entre los dominios funcionales correspondientes a las cajas B (caja B 1 y B 2). En el caso de las secuencias pertenecientes al grupo II y III sólo se consideró la caja B 2. Los resultados muestran que 6 de los 11 loci corresponden a genes de factores de transcripción tipo CO, entre los cuales uno, el locus GSVIVP000381190, que corresponde al gen putativo *VvCO*, presenta homología con los factores de transcripción del grupo Ia de *A. thaliana* (Tabla 4). Los loci que no fueron clasificados como genes de factores de transcripción tipo CO sólo presentan el dominio CCT y corresponden a los genes *TIME OF CAB EXPRESSION (TOC1)*, el cual forma parte del ciclo circadiano, *PSEUDO RESPONSE REGULATOR 5, 7 y 9 (PRR5, PRR7 y PRR9)*, reguladores del ciclo circadiano, y al gen que codifica para una proteína putativa tipo dedos de zinc (Tabla 4).

<i>Loci de V. vinifera</i>		<i>Caracterización de las secuencias aminoacídicas derivadas de los loci</i>					
Locus	Crom.	Grupo	Cajas B	Motivo grupo I	Homólogo de <i>A. thaliana</i>	% similitud caja B 1	% similitud caja B 2
GSVIVP0003033800	1	II	2	No	COL6/COL16	-	96/94
GSVIVP0000880300	4	I	1-2	Sí	COL3/COL4	93/98	100/100
GSVIVP0003146400	11	??*	2	??*	COL3/COL4	-	98/98
GSVIVP0002060000	14	-	-	No	PZFP	-	-
GSVIVP0003811900	14	I	1-2	Sí	COL1/COL2/CO	100/95/93	98/98/95
GSVIVP0002617100	15	-	-	No	PRR9	-	-
GSVIVP0003716900	16	-	-	No	PRR5	-	-
GSVIVP0002444400	17	-	-	No	PRR7	-	-
GSVIVP0000427800	n. i.*	III	2-ZFD	No	COL9/ COL11	-	100/93
GSVIVP0001629600	17	-	-	No	TOC1	-	-
GSVIVP0001767000	19	II	2	No	COL6/COL16	-	94/92

Tabla 4: Caracterización de la familia tipo CO en *V. vinifera*. La homología de secuencias aminoacídicas entre *V. vinifera* y *A. thaliana* fue establecida calculando los valores de similitud entre las cajas B. PZFP, proteína tipo dedos de zinc. *n. i.: no identificado en la base de datos GENOSCOPE. **?: La secuencia aminoacídica del locus del cromosoma 11 posee sólo la caja B 2, por lo que debería pertenecer al grupo II. Sin embargo, la secuencia de esta caja presentó mayor similitud con las del grupo I. Así, no se puede afirmar a cuál de estos dos grupos pertenece.

En la figura 5 se muestra el alineamiento de secuencias aminoacídicas entre la secuencia traducida de *VvCO* y las secuencias de CO, COL1 y COL2 de *A. thaliana*. Se destacan las cajas B 1 y B 2, altamente conservadas, el motivo característico del grupo 1, que resultó ser idéntico en las tres secuencias, y el dominio CCT.

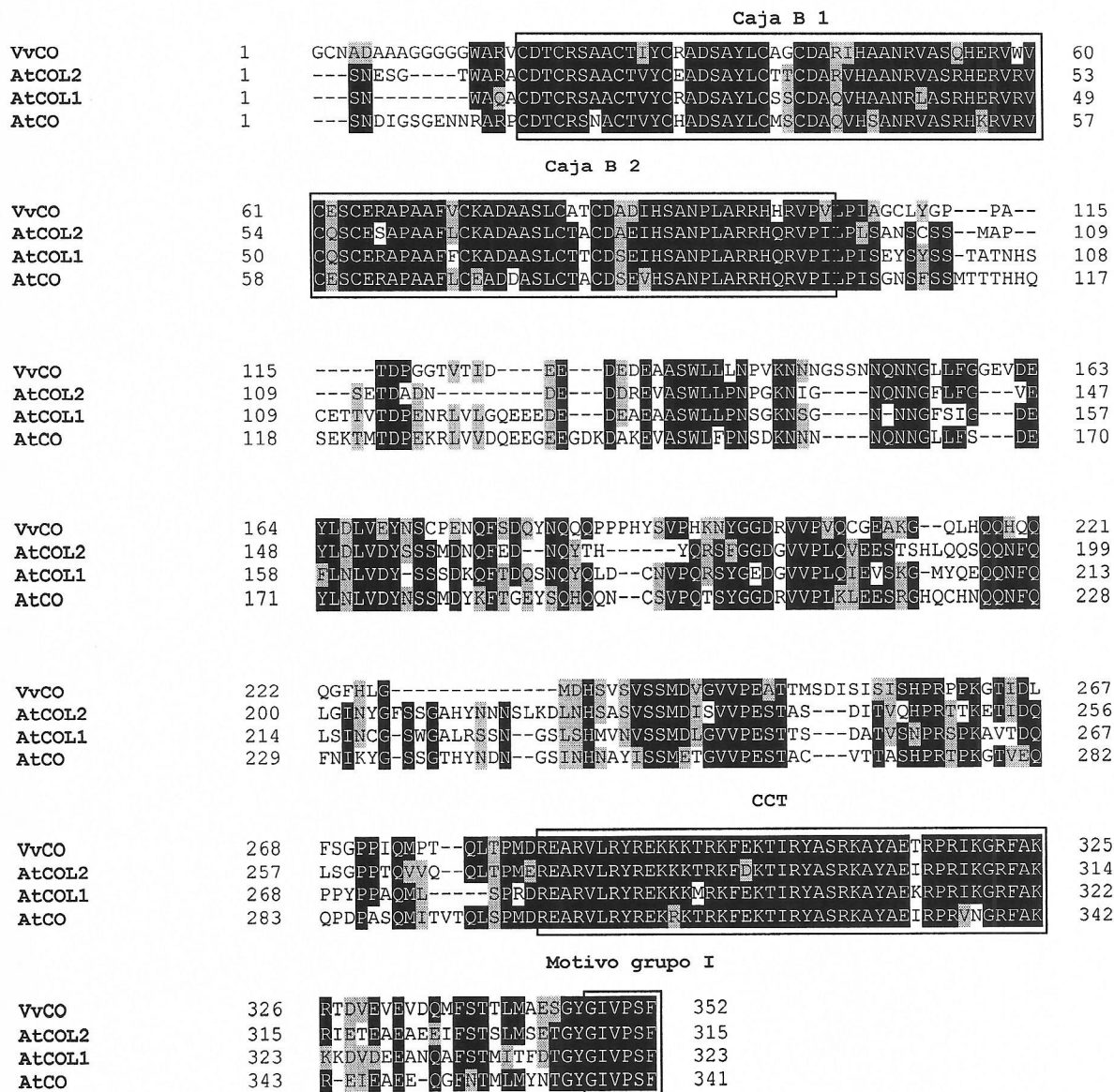
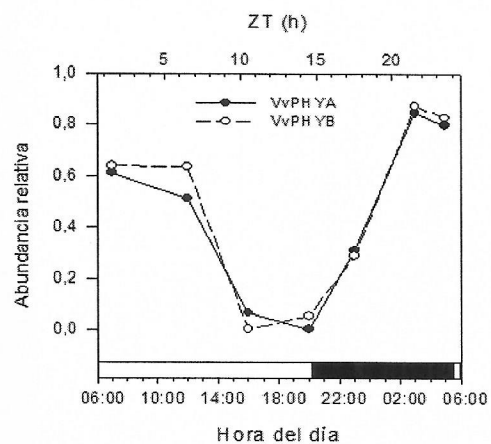


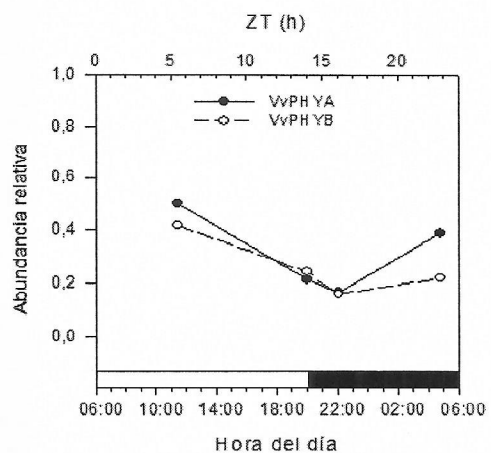
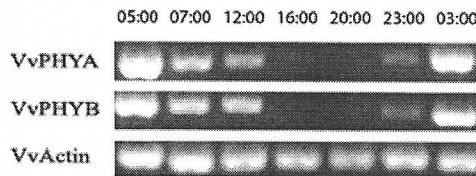
Fig. 5: Alineamiento entre la secuencia aminoacídica deducida de *VvCO* y las secuencias de las proteínas CO, COL1 y COL2 de *A. thaliana*. Se destacan dentro de cuadros las cajas B 1 y B 2, el dominio CCT y el motivo característico del grupo I.

Estudio sobre el efecto del acortamiento del fotoperíodo en el patrón de expresión de *VvPHYA* y *VvPHYB* en hojas de *V. vinifera*

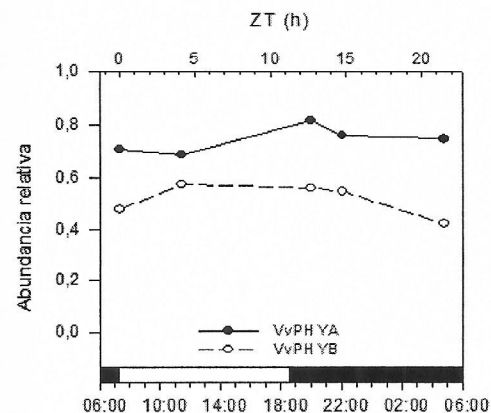
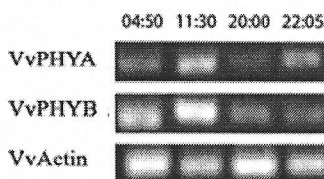
Se estudió el efecto del acortamiento del fotoperíodo en condiciones naturales en la abundancia de los transcritos *VvPHYA* y *VvPHYB* en hojas de *V. vinifera* en un ciclo de 24 h. La abundancia de estos transcritos fue monitoreada en tres fechas correspondientes al 21 de Diciembre, 23 de Enero y 12 de Abril, cuando las yemas latentes se encontraban en el estado paradormante (PD), en la transición hacia el estado endodormante (ED) y cuando las yemas latentes se encontraban en el estado ED, respectivamente. Los resultados muestran una posible tendencia en la cual los transcritos *VvPHYA* y *VvPHYB* presentan una expresión rítmica en el ciclo de 24 h en condiciones de fotoperíodo largo (21 de Diciembre, largo del día de 14 h 40 min.). En estas condiciones la abundancia de los transcritos es máxima previo al amanecer, luego ésta disminuye drásticamente durante el período de luz y alcanza los mínimos niveles después del atardecer, y vuelve a aumentar durante la noche (Fig. 6 A). En la transición hacia el estado ED (23 de Enero, largo del día de 14 h 7 min.), se observa que el ritmo de abundancia de *VvPHYA* y *VvPHYB* se mantiene similar a lo observado el 21 de Diciembre, pero la tasa de desaparición de los transcritos en el período de luz es más lenta y los niveles mínimos tienen lugar después del atardecer, a diferencia de los que ocurre el 21 de Diciembre (Fig. 6 B). En condiciones de día corto (12 de Abril, largo del día de 11 h 12 min.), el patrón de expresión rítmico de los transcritos *VvPHYA* y *VvPHYB* desaparece y la abundancia se mantiene constante, presentando altos niveles a lo largo de todo el ciclo diario (Fig. 6 C).



A



B



C

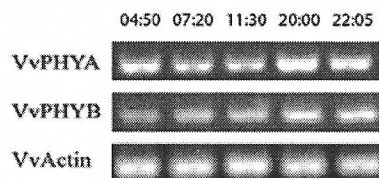


Fig. 6: Patrón de expresión diario de los transcritos *VvPHYA* y *VvPHYB* de hojas de vid obtenidas de plantas crecidas en condiciones naturales en Santiago (33°34'S). Las hojas fueron colectadas cada 3-6 h aproximadamente en: (A) 21 de Diciembre (largo del día 14 h 40 min.), (B) 23 de Enero (largo del día 14 h 7 min.) y (C) 12 de Abril (largo del día 11 h 12 min.). Las barras blancas y negras representan el período de luz y oscuridad, respectivamente. ZT corresponde al período de tiempo comprendido entre la salida del sol y la colecta de las muestras. La abundancia relativa corresponde a los valores de intensidad de color de las bandas de los transcritos *VvPHYA* y *VvPHYB* normalizados con los correspondientes al gen de actina de *V. vinifera*.

Estudio sobre el efecto del acortamiento del fotoperíodo en el patrón de expresión de *VvFT*, *VvCO* y *VvMADS8* en hojas de *V. vinifera*

Los resultados muestran una posible tendencia en la cual la abundancia del transcrito *VvFT* en condiciones de fotoperíodo largo (21 de Diciembre, largo del día de 14 h 40 min.) se mantiene alta y constante a lo largo del todo el ciclo de 24 h. Sin embargo, durante el período de transición hacia el estado ED de las yemas (23 de Enero, largo del día de 14 h 7 min.) se observa que los niveles de abundancia de *VvFT* disminuyen drásticamente, y esta condición se mantiene bajo condiciones de fotoperíodo corto (12 de Abril, largo del día de 11 h 12 min.) (Fig. 7 A).

En el caso de *VvMADS8*, bajo condiciones de fotoperíodo largo se observa que la abundancia de este transcrito oscila con ritmos diarios que presentan la máxima abundancia previo al amanecer y durante las primeras horas de la mañana, disminuyendo drásticamente hasta alcanzar los mínimos niveles de expresión durante la tarde, para aumentar nuevamente al atardecer y durante la noche. Los resultados muestran, en esta primera aproximación, que el patrón rítmico de la expresión del transcrito *VvMADS8* se pierde completamente en el período de transición hacia el estado ED de las yemas, observándose que la abundancia de este transcrito se mantiene constante, presentando altos niveles a lo largo de todo el ciclo diario (Fig. 7 B).

Los resultados muestran una posible tendencia en la cual la expresión de *VvCO* presenta un patrón de expresión rítmico, en el cual la abundancia posee los mínimos niveles en horas de la tarde y en el crepúsculo, para luego aumentar durante la noche, alcanzando la máxima abundancia próximo al amanecer. Se observa que este patrón de expresión no se modifica mayormente bajo las distintas condiciones de fotoperíodo (Fig. 7 C).

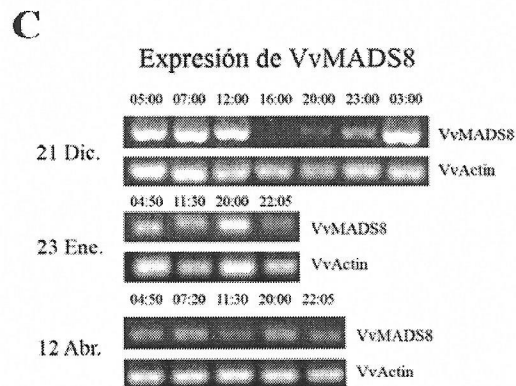
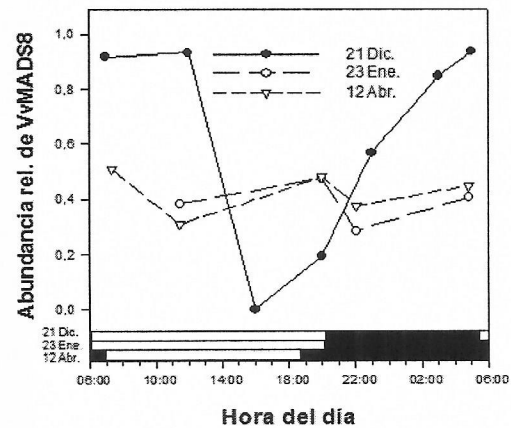
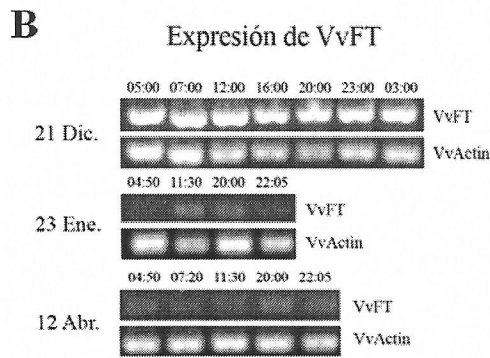
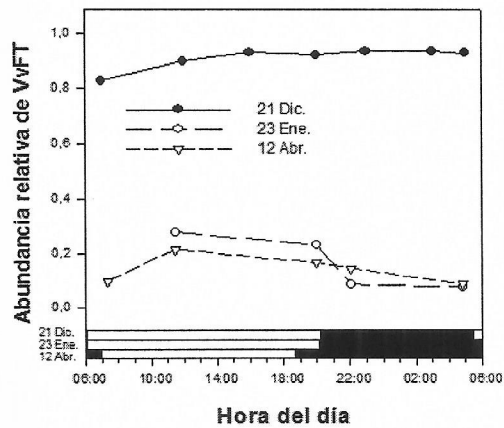
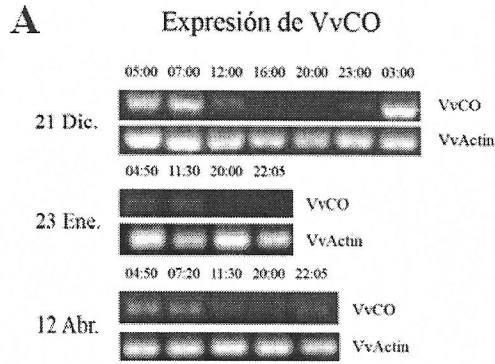
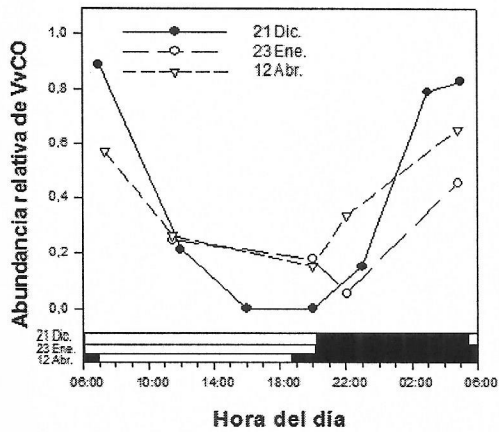


Fig. 7: Patrón de expresión diario de los transcritos *VvCO* (A), *VvFT* (B) y *VvMADS8* (C) en hojas de vid obtenidas de plantas crecidas en condiciones naturales en Santiago (33°34'S) en tres condiciones fotoperiódicas: 21 de Diciembre (largo del día 14 h 40 min.), 23 de Enero (largo del día 14 h 7 min.) y 12 de Abril 12 (largo del día 11 h 12 min.). En cada gráfico se incluye la duración del período de luz y oscuridad (barras blancas y negras) en cada fecha. La abundancia relativa corresponde a los valores de intensidad de color de las bandas de los transcritos *VvFT*, *VvMADS8* y *VvCO* normalizados con los correspondientes al gen de actina de *V. vinifera*.

DISCUSIÓN

El modelo de Bünning que explica cómo las plantas de climas templados perciben y responden a los cambios en el fotoperíodo se basa en la existencia de un regulador de la respuesta fotoperiódica controlado endógenamente y sensible a la luz (Bünning, 1936). Gracias a los estudios del efecto del fotoperíodo sobre la inducción de la floración llevados a cabo en *A. thaliana* se logró establecer que este regulador de la respuesta fotoperiódica es la proteína CONSTANS (CO), lo cual pone a esta proteína en el centro del modelo de la coincidencia externa (Suárez-López y col., 2001; Yanovsky y Kay, 2002). Por otra parte el rol de los fitocromos (Phys) consiste en mediar la percepción del fotoperíodo inductivo para la floración a través de la regulación de la estabilidad de la proteína CO (Valverde y col., 2004).

Aislamiento e identificación de los genes *VvPHYA*, *VvPHYB*, *VvCO*, *VvFT* y *VvMADS8* en el genoma de *V. vinifera*

Los alineamientos realizados muestran que los fragmentos amplificados *VvPHYA*, *VvPHYB* y *VvCO* efectivamente son homólogos de los genes *PHYA*, *PHYB* y *CO* de diversas especies. Tanto en el caso de *VvPHYA* como de *VvPHYB* y *VvCO*, los mayores porcentajes de identidad se obtuvieron al realizar alineamientos con los productos proteicos de *V. vinifera* (Tabla 3). El alineamiento realizado entre los fragmentos amplificados *VvFT* y *VvMADS8* y las secuencias nucleotídicas de los genes *VvFT* y *VvMADS8* de *V. vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon, muestran que existe homología entre ellos.

El fotoperíodo modifica el patrón diario de expresión de *VvPHYA* y *VvPHYB* en las hojas de *V. vinifera*

A pesar de la importancia de los Phys en la percepción de los cambios en el fotoperíodo, es muy poco lo que se conoce acerca de cómo actúan y menos aún cómo es regulada su expresión. Nuestros resultados muestran, en una primera aproximación, que la expresión de *VvPHYA* y *VvPHYB* depende del cambio en el fotoperíodo, lo cual contrasta con los resultados obtenidos en *A. thaliana* y en plantas de tabaco, los que muestran que la expresión de *PHYA* y *PHYB* es controlada por el ciclo circadiano (Kozma-Bognár et al., 1999; Hall et al., 2001; Tóth et al., 2001). En dichos trabajos, con el fin de demostrar que la expresión de los *PHYs* sigue un comportamiento circadiano, sólo se estudió su expresión bajo condiciones artificiales de fotoperíodo largo y bajo condiciones de iluminación y oscuridad constante, y no fue estudiado el efecto del acortamiento o alargamiento del fotoperíodo en su expresión. Nuestros resultados muestran una posible tendencia en la cual la expresión de *VvPHYA* y *VvPHYB* presenta un patrón diurno oscilante en días largos, lo que concuerda en parte con los resultados obtenidos en *A. thaliana* y tabaco. Sin embargo, en días cortos este patrón de expresión se modifica y la ritmicidad de la expresión se pierde, lo que sugiere que las variaciones del fotoperíodo controlan la expresión de estos genes (Fig. 6). A continuación, es válido preguntarse si efectivamente el fotoperíodo regula la expresión de los *PHYs* o si son los períodos de penumbra, que tienen lugar antes de la salida y después de la puesta de sol, los cuales también varían en extensión según la estación y la latitud y se caracterizan por presentar una composición LR/LFR diferente a la que posee la luz el resto del día (Smith, 1982). Resultados obtenidos en tomate podrían confirmar la importancia de los períodos de penumbra, ya que muestran que hay una

diferencia en la fase de acumulación del transcrito *PHYBI* entre condiciones naturales de crecimiento y condiciones artificiales (Hauser y col., 1998; Facella y col., 2008). Dado que en general la composición de la luz es determinante en la expresión de los *PHYS* (Finlayson y col., 2006), es posible especular que un período de penumbra largo, como el que tiene lugar en verano, tenga un efecto distinto sobre la expresión de los *PHYS* que un período de penumbra corto. Sin embargo, el efecto de la penumbra sobre la expresión de los *PHYS* pareciera no ser del todo cierto. En la *web* se encuentra disponible una base de datos de ritmos diarios de expresión de distintos genes de *A. thaliana*, arroz y *Populus sp.*, obtenidos bajo diferentes condiciones de iluminación, elaborada a partir de los estudios llevados a cabo por Mockler y col. (2008), denominada Diurnal Project (<http://diurnal.cgrb.oregonstate.edu/>). En esta base de datos se ingresaron los identificadores (locus tag) de los genes *PHYA* y *PHYB* de *A. thaliana* y se eligieron condiciones de fotoperíodo largo (16 h de luz/ 8 h de oscuridad, 22°C) y fotoperíodo corto (8 h de luz/ 16 h de oscuridad, 22°C) para analizar la expresión de estos genes. Se obtuvo una gráfica en la que se observa que la abundancia de los transcritos *PHYA* y *PHYB* (locus tag AT1G09570 y AT2G18790, respectivamente) presenta un comportamiento similar al de *VvPHYA* y *VvPHYB*, pues en una condición fotoperiódica el patrón de expresión es oscilante, y en la otra se pierde este patrón; incluso el momento del día en que tiene lugar la máxima abundancia de los transcritos en *A. thaliana* y en *V. vinifera* coinciden. Esto hace pensar que las condiciones artificiales no afectan la expresión de los *PHYS* y que el período de penumbra no afecta mayormente la expresión de estos genes. De este modo, al parecer la expresión de *VvPHYA* y *VvPHYB* es controlada exclusivamente por los cambios en el fotoperíodo. Curiosamente, en *A. thaliana* el patrón de expresión rítmico se presenta

bajo condiciones de fotoperíodo corto, y la expresión elevada y constante ocurre bajo condiciones de fotoperíodo largo, inversamente a lo que ocurre con la expresión de *VvPHYA* y *VvPHYB* (Fig. 6). En *A. thaliana* este patrón se replica también a nivel de proteína. Al estudiar la dinámica de CRY2 y PhyA se encontró que la abundancia de estas proteínas oscila con un ritmo diario en plantas crecidas bajo condiciones de fotoperíodo corto, lo cual no ocurre en plantas crecidas bajo condiciones de fotoperíodo largo (Mockler y col., 2003). Por otra parte, aunque no se conoce el patrón de expresión diario de los *PHYs* en *Populus sp.* se sabe que plantas que sobreexpresan el gen *PHYA* no experimentan el síndrome otoñal (Olsen y col., 1997), lo que sugiere que bajos niveles de expresión de *PHYA* se requieren para que ocurran las respuestas propias de días cortos. Esto también se contrapone a lo observado en *V. vinifera* L. cv. Thompson Seedless, pues en días cortos los niveles de expresión de *VvPHYA* y *VvPHYB* son altos. Así, se requiere investigar con mayor detalle el rol de los *Phys* en *V. vinifera* para comprender por qué en esta planta los cambios en el patrón de expresión diario de los *PHYs* en función del fotoperíodo es opuesto al de otras especies. Sólo se realizó una reacción PCR por cada muestra colectada pues, dado que el patrón de expresión diario de ambos genes es similar en las distintas fechas, es bastante probable que la tendencia observada sea correcta (Fig. 6).

El acortamiento del fotoperíodo modifica la expresión de *VvFT* y *VvMADS8* pero no afecta el patrón de expresión diario de *VvCO* en hojas de *V. vinifera*

En *A. thaliana* la expresión de *CO* se encuentra bajo el control del ciclo circadiano, de modo que la abundancia del transcrito *CO* presenta un ritmo de expresión con un período aproximado de 24 h, manteniendo su fase frente a los cambios en el fotoperíodo. En *A.*

thaliana CO se expresa en la noche bajo condiciones de fotoperíodo corto, mientras que bajo condiciones de fotoperíodo largo se expresa al final del día, lo que se explica porque en días largos la luz del atardecer coincide con el máximo de expresión de CO, en cambio en días cortos el máximo de expresión coincide con la oscuridad. Dado que la proteína CO es lábil en la oscuridad (Laubinger y col., 2006), ésta no se acumula bajo condiciones de fotoperíodo corto, mientras que bajo condiciones de fotoperíodo largo se acumula gracias a la acción estabilizadora que ejercen PhyA y los CRYs (Valverde y col., 2004). CO en *A. thaliana* promueve la floración en respuesta al alargamiento del fotoperíodo, a través de la inducción de la expresión de *FT* y *SOC1* (Onouchi y col., 2000; Samach y col. 2000), factores de transcripción integradores de las vías florales (Michaels y col., 1999; Lee y col., 2000; Moon y col., 2003; Hepworth y col., 2002). CO promueve directamente la expresión del gen *FT* en las células del floema (Roussot y col., 2004) y luego la proteína FT se mueve hasta el meristema apical del tallo (Corbesier y col, 2007) para inducir la expresión de *SOC1* (Wigge y col., 2005).

En todos los organismos estudiados CO mantiene su ritmo de expresión independiente de las condiciones de fotoperíodo. Nuestros resultados muestran, en una primera aproximación, que el patrón de expresión diurno de *VvCO* también se ajusta a este patrón, lo que indica que el control del ciclo circadiano sobre la expresión de CO es un mecanismo bastante extendido entre las plantas. El transcrito *VvCO*, tanto en días largos como en días cortos, presenta alta abundancia en la oscuridad, previo al amanecer, y luego se observa que entre las 7:00 aproximadamente y el mediodía esta abundancia decae. Así, en concordancia con el modelo de coincidencia externa, se observa que la fase de acumulación de *VvCO* no cambia en función del fotoperíodo pero sí cambia la fase de luz y

oscuridad, pues en días cortos a las 7:00 amanece y en días largos a las 7:00 ya ha transcurrido aproximadamente una hora y media desde la salida del sol. Cabe señalar que sólo se realizó una reacción de PCR por cada muestra pues el patrón de expresión diario de *VvCO* observado se ajusta a lo descrito en el modelo de percepción del largo del día.

En la mayoría de las especies estudiadas el gen *FT* se expresa sólo cuando la proteína *CO* se acumula, mientras que nuestros resultados en *V. vinifera* muestran una posible tendencia en la cual *VvFT* se expresa en forma constitutiva tanto en días largos como en días cortos, variando solamente los niveles de abundancia del transcrito (Fig. 7 B). Estos resultados contrastan con los resultados informados en la literatura para otras especies, en los cuales los máximos de expresión de *CO* y *FT* ocurren a la misma hora del día, y en ningún caso se ha observado que la expresión de *FT* sea constitutiva (Yanovsky y Kay, 2002; Martínez-García y col., 2002; Rodríguez-Falcón y col., 2006; Yano y col., 2000; Izawa y col., 2002; Hayama y col., 2003; Böhlenius y col., 2006). Estos resultados, sugieren que la expresión de *VvFT* no depende exclusivamente de *VvCO* y que en *V. vinifera* podrían existir otros mecanismos que regulen su expresión. Dado que estos resultados nos hicieron dudar del trabajo experimental por ser tan diferentes a lo descrito en la literatura, realizamos una reacción de PCR adicional, la que confirmó lo obtenido inicialmente.

En *A. thaliana* la expresión de *FT* es inducida en las hojas bajo condiciones de día largo por *CO*, luego la proteína *FT* se desplaza vía floema hacia el meristema apical (Corbesier y col., 2007) y en este tejido *FT* induce la expresión de *SOC1*, cuyo producto es un regulador de la identidad floral de las células del meristema apical (Wigge y col., 2005). Sin embargo, en la hoja ni *CO* ni *FT* promueven la expresión de *SOC1*, existiendo aparentemente una regulación directa de su expresión por el ciclo circadiano (Fujiwara y

col., 2005). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una posible tendencia en la cual se observa un cambio en el patrón de expresión de *VvMADS8* con el acortamiento del fotoperíodo, el cual es rítmico bajo condiciones de día largo (21 de Diciembre) y luego se torna constitutivo (Fig. 7 C), lo que sugiere que el fotoperíodo modifica la expresión de *VvMADS8*, y que ésta no depende del control del ciclo circadiano, o al menos no de manera exclusiva. En la base de datos disponible en la web, Diurnal Project (<http://diurnal.cgrb.oregonstate.edu/>), elaborada por Mockler y col. (2008) se ingresó el locus tag del gen *MADS5* de *Populus sp.*, homólogo de *SOC1* de *A. thaliana*, y por tanto de *VvMADS8* de *V. vinifera*. Se obtuvo una gráfica en la que se observa que la abundancia del transcrito *MADS5* (locus tag estExt_fggenesh4_pg.C_570124) en condiciones de 12 h de luz y 12 h de oscuridad a 22°C, presenta un comportamiento similar al de *VvMADS8* en días largos, observándose que la máxima y mínima abundancia tienen lugar prácticamente a la misma hora en ambos casos. Dado que el patrón de expresión de *VvMADS8* es similar al de *MADS5*, se consideró suficiente realizar sólo una reacción de PCR.

Los resultados muestran, en una primera aproximación, que tanto en el caso de *VvMADS8* como en el de *VvFT* el patrón de expresión de ambos genes cambia bruscamente precisamente en el período de transición hacia la ED (23 de Enero) y luego este patrón se mantiene en días cortos (12 Abril). La expresión de *VvPHYA* y *VvPHYB* también varía el 23 de Enero en relación al 21 de Diciembre. Interesantemente, el 23 de Enero (largo del día de 14 h 7 min.) aún no se observa una disminución significativa de la extensión del período de luz con respecto al 21 de Diciembre (largo del día de 14 h 40 min.), y aún así se observan cambios en la expresión de *VvPHYA* y *VvPHYB*, *VvFT* y *VvMADS8*, lo que

indica que los mecanismos de percepción de los cambios en el fotoperíodo en la vid son sumamente sensibles a leves variaciones de éste.

En *V. vinifera*, la familia de factores de transcripción tipo CO está compuesta por 6 genes

De los 6 loci de *V. vinifera* cuyos productos putativos fueron clasificados como pertenecientes a la familia de factores de transcripción tipo CO sólo uno, el correspondiente al gen putativo *VvCO*, presenta homología con el grupo Ia de *A. thaliana* que incluye a los genes *CO*, *COL1* y *COL2*. Dado que *VvCO* es el único gen putativo de *V. vinifera* que presenta homología con el grupo Ia de *A. thaliana*, se puede esperar que efectivamente *VvCO* tenga una participación en la percepción de las variaciones del fotoperíodo en la vid.

CONCLUSIONES

1. En el genoma de *V. vinifera* se encuentran los homólogos de los genes implicados en la percepción del largo del día, *VvPHYA*, *VvPHYB*, *VvCO*, *VvFT* y *VvMADS8*.
2. Se cumple la hipótesis propuesta en este trabajo pues el patrón de expresión diurno de *VvPHYA*, *VvPHYB*, *VvFT* y *VvMADS8* es modificado por los cambios en el fotoperíodo, mientras que el patrón de expresión diurno de *VvCO* no cambia con esta variable.
3. La familia de factores de transcripción tipo CO en *V. vinifera* está compuesta por 6 genes, de los cuales sólo uno, el correspondiente a *VvCO*, presenta homología con el grupo Ia, que es el que juega el rol principal en la percepción del largo del día.

BIBLIOGRAFÍA

- Böhlenius, H., Huang, T., Charbonnel-Campaa, L., Brunner, A. M., Jansson, S., Strauss, S. H., Nilsson, O. (2006). CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science*. 312: 1040–1043
- Borthwick, H. A., Hendricks, S. B., Parker, M. W. (1952). The reaction controlling floral initiation. *Botany*. 38:929-934
- Boss, P. K., Sreekantan, L., Thomas, M. R. (2006). A grapevine TFL1 homologue can delay flowering and alter floral development when overexpressed in heterologous species. *Funct. Plant Biol.* 33:31–41
- Bünning, E. (1936). Die endogene Tagesrhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion. *Ber. Dt. Botan. Ges.* 54:590–607
- Bünning, E., Stern, K. (1930). Über die tagesperiodischen Bewegungen der Primärblätter von *Phaseolus multiflorus*. II. Die Bewegungen bei Thermokonstanz. *Ber. Dt. Botan. Ges.* 48:227–252
- Callis, J., Vierstra, R. D. (2000) Protein degradation in signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:381–386
- Chang, S., Puryear, J., Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11:113-6
- Chen, M., Chory, J., Fankhauser, C. (2004). Light signal transduction in higher plants. *Annu. Rev. Genet.* 38:87–117
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*. 316:1030–1033
- Coupland, G., Griffiths, S., Dunford, R. P., Laurie, D. A. (2003). The Evolution of CONSTANS-like gene families in barley, rice and *Arabidopsis*. *Plant Phys.* 131:1855-1867
- de Marian, J. (1729). Observation botanique. *Hist. Acad. Roy. Sci.* 35-36
- Doorembos, J. (1953). Review of the literature on dormancy in buds of woody plants. *Meded. LandBouwhogesschool Wageningen.* 53:1-24

- Downs, R. J., Bevington, J. M. (1981). Effect of temperature and photoperiod on growth and dormancy of *Betula papyrifera*. *Am. J. Bot.* 68:795-800
- Downs, R. J., Hendricks, S. B., Borthwick H. A. (1956). Pigment conversion in the formative responses of plants to radiation. *Proc, Natl. Acad. Sci.* 42:19-25
- Dunlap, J. C. (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell.* 96:271–290
- Finlayson, S. A., Mullet, J. E., Morgan, P. W. (2006). Phytochrome B and shade signals regulate Phytochrome A expression. *Physiol. Plant.* 127:326-37
- Fowler, S., Lee, K., Onouchi, H., Samach, A., Richardson, K. (1999). GIGANTEA: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *EMBO J.* 18:4679–88
- Franklin, K. A., Whitelamb, G. C. (2004). Light signals, phytochromes and cross-talk with other environmental cues. *J. Exp. Biol.* 55:271-276
- Fuchigami, L. H., Weiser, C. J., Evert D. R. (1971). Induction of cold acclimation in *Cornus stolonifera* Michx. *Plant Physiol.* 47:98–103
- Fujiwara, S., Oda, A., Kamada, H., Coupland, G., Mizoguchi, T. (2005). Circadian clock components in Arabidopsis. II. LHY/CCA regulate the floral integrator gene SOC1 in both GI-dependent and -independent pathways. *Plant Biotechnol.* 22:319–325.
- Garner, W. W., Allard, H. A. (1920). Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *J. Agric. Res.* 18:553–606
- Gärtner, W., Braslavsky, S. E. (2003). The phytochromes: spectroscopy and function. In *Photoreceptors and Light Signalling*, ed. A. Batschauer, pp. 136–80. Cambridge, UK: Roy. Soc. Chem.
- Hall, A., Kozma-Bognar, L., Toth, R., Nagy, F., Millar, A. J. Conditional circadian regulation of Phytochrome A gene expression. (2001). *Plant Physiol.* 127:1808-18
- Hayama, R., Yokoi, S., Tamaki, S., Yano, M., Shimamoto, K. (2003). Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature.* 422:719–22

- Heide, O. M. (2001). Photoperiodic control of dormancy in *Sedum telephium* and some other herbaceous perennial plants. *Phys. Plant.* 113:332-337
- Hemberg, T. (1949). Growth-inhibiting substances in terminal buds of *Fraxinus*. *Physiol. Plant.* 2:37-44
- Henderson, I. R., Dean, C. (2004). Control of *Arabidopsis* flowering: the chill before the bloom. *Development.* 131:3829-3838
- Hepworth, S. R., Valverde, F., Ravenscroft, D., Mouradov, A., Coupland, G. (2002). Antagonistic regulation of flowering-time gene SOC1 by CONSTANS and FLC via separate promoter motifs. *EMBO J.* 21(16):4327–4337
- Hill, H. D. (1757). *The sleep of plants* (London: R. Baldwin)
- Hoecker, U., Quail, P. H. (2001). The phytochrome A-specific signaling intermediate SPA1 interacts directly with COP1, a constitutive repressor of light signaling in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 276: 38173–38178
- Howe, G. T., Gardner, G., Hackett, W. P., Furnier, G. R. (1996). Phytochrome control of short-day-induced bud set in black cottonwood. *Physiol. Plant.* 97:95-103
- Huq, E., Quail, P. H. (2005). Phytochrome signaling. In *Handbook of Photosensory Receptors*, ed. W. R. Briggs, J. A. Spudich, pp. 151–70. Weinheim:Wiley VCH
- Izawa, T., Oikawa, T., Sugiyama, N., Tanisaka, T., Yano, M., Shimamoto, K. (2002). Phytochrome mediates the external light signal to repress FT orthologs in photoperiodic flowering of rice. *Genes Dev.* 16:2006–20
- Kardailsky, I., Shukla, V. K., Ahn J. H., Dagenais N., Christensen S. K. (1999). Activation tagging of the floral inducer FT. *Science.* 286:1962–65
- Kent, W. J. (2002). BLAT the Blast-like alignment tool. *Genome Research.* 12:656-64
- Klebs, G. (1913). Über das Verhältnis der Außenwelt zur Entwicklung der Pflanze. *Sitzber. Akad. Wiss. Heidelberg B.* 5:1–47
- Knott, J. E. (1934). Effect of a localized photoperiod on spinach. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 31(Suppl.):152–154
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., Araki, T. (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science.* 286:1960–62

- Koornneef, M., Hanhart, C. J., van der Veen J. H. (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 229:57–66
- Kozma-Bognár, L., Hall, L., Adam, E., Thain, S. C, Nagy, F., Millar, A. J. (1999). The circadian clock controls the expression pattern of the circadian input photoreceptor Phytochrome B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:14652-7
- Kühn, N. A., Pérez, F. J., Ormeño-Núñez, J., Jaque-Zamora, G. (2009). Photoperiod modifies the diurnal expression profile of *VvPHYA* and *VvPHYB* transcripts in field grown grapevine leaves. *J. Plant Physiol.* In press
- 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.* 22:371-7
- Laubinger, S., Marchal, V., Le Gourrierec, J., Wenkel, S., Adrian, J. (2006). *Arabidopsis* SPA proteins regulate photoperiodic flowering and interact with the floral inducer CONSTANS to regulate its stability. *Development.* 133:3213–22
- Lee, H., Suh, S. S., Park, E., Cho, E., Ahn, J. H. (2000). The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 14:2366–76
- Li, C., Junttila, O., Ernstsen, A., Heino, P., Palva, T. (2003). Photoperiodic control of growth. Cold acclimation and dormancy development in silver birch (*Betula pendula*) ecotypes. *Physiol. Plant.* 117:206-212
- Lin, C., Shalitin, D. (2003). CRYPTOCHROME structure and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:469-496
- Martinez-García, J. F., Virgós-Soler, A., Prat, S. (2002). Control of photoperiod-regulated tuberization in potato by the *Arabidopsis* flowering-time gene CONSTANS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 15211–15216
- Michaels, S. D., Amasino, R. M. (2000). Memories of winter: Vernalization and the competence to flower. *Plant. Cell. Environ.* 23:1145–1153

- Mockler, T. C., Yang, H., Yu, X., Parikh, D., Cheng, Y., Dolan, S., Lin, C. H. (2003). Regulation of photoperiodic flowering by *Arabidopsis* photoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:2140-5
- Mockler, T., Michael, T. P., Breton, G., McEntee, C., Byer, A., Trout, J. D., Hazen, S. P., Shen, R., Priest, H. D., Sullivan C. M, Givan, S. A., Yanovsky, M., Hong, F., Kay, S. A., Chory, J. (2008). Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules. *PloS Genet.* 4:1-17
- Moon, J., Suh, S., Lee, H., Choi, K., Hong, C., Paek, N., Kim, S., Lee, I. (2003). The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *The Plant J.* 35:613-623
- Nakamichi, N., Kita, M., Ito, S., Yamashino, T., Mizuno, T. (2005) PSEUDO-RESPONSE REGULATORS, PRR9, PRR7 and PRR5, together play essential roles close to the circadian clock of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Phys.* 46:686–698
- Noriega, X., Burgos, B., Pérez, F. J. (2007) Short day photoperiod triggers and low temperatures increases expression of peroxidase RNA transcripts and basic peroxidase isoenzymes activity in grape buds. *Phytochem.* 68:1376-83
- Olsen, J. E. (2006). Mechanisms of Dormancy Regulation. *Acta Hort.* 727
- Olsen, J. E., Junttila, O., Nilsen, J., Eriksson, M., Martinussen, I., Olsson, O., Sandberg, G., Moritz, T. (1997). Ectopic expression of phytochrome A in hybrid aspen changes critical daylength for growth and prevents cold acclimation. *Plant J.* 12:1339-1350
- Onouchi, H., Igeño, M. I., Périlleux, C., Graves, Coupland, G. (2000). Mutagenesis of plants overexpressing CONSTANS demonstrates novel interactions among *Arabidopsis* flowering-time genes. *Plant Cell.* 12:885–900
- Parker, M. W., Borthwick, H. A. (1950). Influence of light on plant growth. *Annu. Rev. Plant Phys.* 1:43-58
- Pérez, F. J., Rubio, S., Ormeño-Núñez, J. (2007). Is erratic bud-break in grapevines grown in warm winter areas related to disturbances in mitochondrial respiratory capacity and oxidative metabolism. *Funct. Plant Biol.* 34:624-32

- Pittendrigh, C. S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 25:159–184
- Proebsting, W. M., Davies P. J., Marx G. A. (1976). Photoperiodic control of apical senescence in a genetic line of peas. *Plant Physiol.* 58:800-802
- Putterill, J., Laurie, R., Macknight, R. (2004). It's time to flower: the genetic control of flowering time. *BioEssays.* 26:363–73
- Rodríguez-Falcón, M., Bou, J., Prat, S. (2006). Seasonal control of tuberization in potato: Conserved elements with the flowering response. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 151–180
- Roussot, C., An, H., Suárez-López, P., Corbesier, L., Vincent, C., Piñeiro, M., Hepworth, S., Mouradov, A., Justin, S., Turnbull, C. (2004). CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis*. *Development.* 131:3615–3626
- Rozen, S., Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 132:365-86
- Salomon, M., Christie, J. M., Knieb, E., Lempert, U., Briggs, W. R. (2000). Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry.* 39:9401-9410
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S.E., Ditta, G.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanovsky, M.F., Coupland, G. (2000). Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science.* 288:1613–1616
- Sang, Y., Li, Q., Rubio, V., Zhang, Y., Mao, J., Deng, X., Yang, H. (2005). *Arabidopsis* CRYPTOCHROME 1 N-terminal domain-mediated homodimerization is required for its photoreceptor activity. *Plant Cell.* 17:1569-1584
- Schnabel, B. J., Wample, R. L. (1987). Dormancy and cold hardiness in *Vitis vinifera* L. cv. White Riesling as influenced by photoperiod and temperature. *Amer. J. Enol. Vitic.* 38:265-272
- Smith, H. (1982). Light quality, photoreception and plant strategy. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33:481-518

- Spencer, P. W., Titus, J. S. (1972). Biochemical and enzymatic changes in apple leaf tissue during autumnal senescence. *Plant Physiol.* 49:746-750
- Sreekantan, L., Thomas, M. R. (2006). *VvFT* and *VvMADS8*, the grapevine homologues of the floral integrators *FT* and *SOC1*, have unique expression patterns in grapevine and hasten flowering in *Arabidopsis*. *Funct. Plant Biol.* 33:1129–1139
- Sterck, L., Rombauts, S., Vandepoele, K., Rouze, P., van de Peer, Y. (2007). How many genes are there in plants (. . . and why are they there)? *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:199–203
- Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., Coupland, G. (2001). *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature.* 410: 1116–1120
- Thomas, B., Vince-Prue, D. (1997). *Photoperiodism in plants*. Academic Press, New York
- Tóth, R., Kevei, E., Hall, A., Millar, A. J., Nagy, F., Kozma-Bognar, L. (2001). Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127:1607-16
- Tournois, J. (1912). Influence de la lumière sur la floraison du houblon japonais et du chanvre déterminées par des semis hâtifs. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 155:297–300
- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., Coupland, G. (2004). Photoreceptor regulation of *CONSTANS* protein in photoperiodic flowering. *Science.* 303:1003–6
- Wareing, P. F. (1956). Photoperiodism in woody plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 7:191-214
- Wigge, P. A., Kim, M. C., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M. (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science.* 309:1056–59
- Wilson, R. N., Heckman, J. W., Somerville, C. R. (1992). Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiol.* 100:403–408
- Yano, M., Katayose, Y., Ashikari, M., Yamanouchi, U., Monna, L. (2000). Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell* 12:2473–84

Yanovsky, M. J., Kay, S. A. (2002). Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature*. 419: 308–312

Zeevaart, J. A. D. (1958). Flower formation as studied by grafting. *Meded. Landbouwhoges. Wageningen*. 58:1–88

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Francisco Pérez por su orientación constante y excelente disposición.

A Ricardo Vergara y Sebastián Rubio por su ayuda en la colecta de muestras en la noche.

A mi familia por su apoyo y su entusiasmo.