



**“Análisis comparativo de genes modulados por  
citoquinina en frutos de *Prunus avium* y *Prunus persica*  
post-lignificación”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los  
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

**CLAUDIO MIGUEL PONCE IBÁÑEZ**

Directora del Seminario de Título: Dra. Lee A. Meisel

Profesora Patrocinante: Dra. Claudia Stange Klein

Noviembre 2018 Santiago - Chile



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**  
UNIVERSIDAD DE 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 el **Sr. Claudio Miguel Ponce Ibáñez**:

**“Análisis comparativo de genes modulados por citoquinina en frutos de *Prunus avium* y *Prunus persica* post-lignificación”**

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

**Directora Seminario de Título:**

\_\_\_\_\_

**Comisión Revisora y Evaluadora**

**Presidenta Comisión:**

\_\_\_\_\_

**Evaluador:**

\_\_\_\_\_



## **FINANCIAMIENTO**

Los recursos materiales y el financiamiento fueron proporcionados por el Laboratorio de Genética Molecular Vegetal del Instituto de Nutrición y Tecnología en Alimentos (INTA) bajo el Proyecto FONDECYT #1171016 y bajo el Proyecto ENLACE, VID Universidad de Chile ENL006/2016.

# **BIOGRAFÍA**

## **DEDICATORIA**

## **AGRADECIMIENTOS**

## INDICE GENERAL

<b>FINANCIAMIENTO</b> .....	<b>I</b>
<b>BIOGRAFÍA</b> .....	<b>II</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>III</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>X</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XIV</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1. Los frutos de cerezo y durazno.....	1
2. Desarrollo del fruto de cereza y durazno.....	2
3. La fitohormona citoquinina como regulador del crecimiento en frutos .....	3
4. Genes modulados por citoquinina .....	5
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>8</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
General .....	8
Específicos.....	8
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>9</b>
1. Material vegetal de <i>Prunus avium</i> y <i>Prunus persica</i> .....	9
2. Tratamiento con <i>trans</i> -zeatina en frutos de <i>Prunus avium</i> y <i>Prunus persica</i> en etapa de post-lignificación .....	9
3. Extracción de ARN total de frutos de <i>Prunus avium</i> y <i>Prunus persica</i> .....	10
4. Cuantificación de ARN total de frutos de <i>Prunus avium</i> y <i>Prunus persica</i> .....	13
5. Digestión enzimática de ADN desde ARN de frutos de <i>Prunus avium</i> y <i>Prunus persica</i> .....	13
6. Transcripción reversa de ARN de frutos de <i>Prunus avium</i> y <i>Prunus persica</i> .....	14



7. Identificación de posibles ortólogos para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de <i>Arabidopsis</i> en <i>Prunus avium</i> y <i>Prunus persica</i> .....	14
8. Alineamiento de secuencias e identificación de dominios conservados entre el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de <i>Arabidopsis</i> y los posibles ortólogos para <i>Prunus avium</i> y <i>Prunus persica</i> .....	15
9. Análisis cuantitativo de expresión génica mediante reacción de PCR en tiempo real .....	16
10. Análisis estadístico de la cuantificación de la expresión génica mediante reacción de PCR en tiempo real .....	17
11. Comparación de la estructura genómica de los <i>loci</i> de los posibles ortólogos para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de <i>Arabidopsis</i> .....	17
12. Localización de los <i>loci</i> de los posibles ortólogos para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de <i>Arabidopsis</i> en el mapa de ligamiento TxE.....	18
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
1.1 Posibles ortólogos para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de <i>Arabidopsis</i> en <i>Prunus avium</i> y <i>Prunus persica</i> .....	20
1.2 Estructura genómica de los posibles ortólogos para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de <i>Arabidopsis</i> en <i>Prunus avium</i> y <i>Prunus persica</i> .....	24
1.3 Localización genética de los <i>loci</i> de los posibles ortólogos de durazno para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de <i>Arabidopsis</i> en el mapa de ligamiento TxE .....	30
2. Análisis de los efectos de la aplicación exógena de citoquinina sobre el perfil de expresión de los posibles ortólogos en cereza y durazno para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” en frutos de <i>Prunus avium</i> y <i>Prunus persica</i> .....	33
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>40</b>
1.1 Identificación de posibles ortólogos para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de <i>Arabidopsis</i> en <i>Prunus avium</i> y <i>Prunus persica</i> .....	37
1.2 Estructura genómica de los posibles ortólogos para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de <i>Arabidopsis</i> en <i>Prunus avium</i> y <i>Prunus persica</i> .....	40
1.3 Localización genética de los <i>loci</i> de los posibles ortólogos de durazno para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de <i>Arabidopsis</i> en el mapa de ligamiento TxE .....	42

2. Análisis de los efectos de la aplicación exógena de citoquinina sobre el perfil de expresión de los posibles ortólogos en cereza y durazno para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” en frutos de <i>Prunus avium</i> y <i>Prunus persica</i> .....	44
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>49</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>50</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO</b> .....	<b>56</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> BLAST bidireccionales del “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de <i>Arabidopsis</i> con <i>Prunus avium</i> . .....	<b>20</b>
<b>Tabla 2.</b> BLAST bidireccionales del “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de <i>Arabidopsis</i> con <i>Prunus persica</i> . .....	<b>21</b>
<b>Tabla 3.</b> Agrupación de los 11 posibles ortólogos del “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de <i>Arabidopsis</i> conservados entre <i>Prunus avium</i> y <i>Prunus persica</i> .....	<b>22</b>
<b>Tabla 4.</b> QTLs posiblemente asociados a los posibles ortólogos del “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de <i>Arabidopsis</i> , compartidos entre <i>Prunus avium</i> y <i>Prunus persica</i> .....	<b>32</b>
<b>Tabla 5.</b> Resumen de los genes que estarían induciendo su expresión al tratamiento exógeno de citoquinina en frutos maduros de <i>Prunus avium</i> y <i>Prunus persica</i> . .....	<b>48</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Top 25 de genes inducidos por citoquinina descrito en la planta modelo <i>Arabidopsis thaliana</i> (Brenner y Schmölling, 2015) .....	7
<b>Figura 2.</b> Los posibles genes que codifican para factores de transcripción <i>PavCRF2</i> , <i>PpeCRF2</i> , <i>PavGIS3</i> y <i>PpeGIS3</i> presentan los dominios que están conservados en las familias CRF y GIS de <i>A. thaliana</i> . .....	23
<b>Figura 3.</b> La estructura a nivel genómico de los 11 posibles ortólogos encontrados en <i>P. avium</i> y <i>P. persica</i> se encuentra conservada, y presentan elementos <i>cis</i> -regulatorios a citoquinina y otras fitohormonas. ....	27
<b>Figura 4.</b> Localización genética de los 11 posibles ortólogos de <i>Prunus persica</i> del “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de <i>Arabidopsis</i> en el mapa de ligamiento TxE. ....	31
<b>Figura 5.</b> Los posibles ortólogos en <i>Prunus avium</i> y <i>Prunus persica</i> para el “Top 25 de genes inducidos inducidos por citoquinina” de <i>Arabidopsis</i> responden frente al tratamiento de citoquinina exógena en frutos maduros de cerezo y durazno .....	34

## ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNg	ADN genómico
ARNm	ARN mensajero
Blast	<i>Basic local Alignment search tool</i> (herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales)
Cq	<i>Quantitative cycle</i> (ciclo cuantitativo)
DAA	Días después de la antesis
DPF	Días post floración
GO	<i>Gene Ontology</i> (Ontología del gen)
IPGI	Iniciativa Internacional del Genoma de durazno
iPMP	Isopentiladenina
Lig	Lignificación
Mb	Mega bases
N <sup>6</sup>	Nitrógeno en posición 6
NaPi	Sodio fosfato
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ODEPA	Oficina de estudios y políticas agrarias
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Post-Lig	Post-lignificación
Pre-Lig	Pre-lignificación
qPCR	PCR cuantitativo
RR	<i>Response Regulators</i> (Regulador de respuesta)
ARNr	RNA ribosomal
TAIR	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>
Tm	Temperatura de fusión

<i>tZ</i>	<i>trans-zeatina</i>
<i>Z</i>	<i>Zeatina</i>

## RESUMEN

El cerezo (*Prunus avium*) y el durazno (*Prunus persica*) corresponden a cultivos de exportación de alta rentabilidad para Chile. Dentro de los diversos factores comerciales asociados al fruto, se encuentran parámetros fisiológicos como el tamaño del fruto, sólidos solubles y tiempo de maduración, algunos de los cuales se conocen como índices de maduración. Estos, son regulados en diversas especies por reguladores del crecimiento de plantas, entre los cuáles se encuentra citoquinina, una fitohormona involucrada en los procesos de división y diferenciación celular. Con el objetivo de estudiar los factores moleculares de cereza y durazno involucrados en la respuesta a citoquinina, en este trabajo se realizaron análisis cuyo objetivo es determinar si en frutos de cereza y durazno los “Top 25 de genes inducidos por citoquinina”, que son fuertemente inducidos por citoquinina en la planta modelo *Arabidopsis*, mantienen este patrón de expresión frente al tratamiento exógeno de citoquinina.

Mediante BLAST bidireccionales, se identificaron 12 y 13 posibles ortólogos de este conjunto de genes en el genoma de *Prunus avium* y *Prunus persica* respectivamente, donde 11 de ellos se comparten entre ambas especies. De estos 11 posibles genes ortólogos analizados en la plataforma INTERPROSCAN, todos presentaron los dominios proteicos característicos de las proteínas codificadas por estos genes de *Arabidopsis*. Además, análisis a nivel genómico de estos posibles ortólogos mostraron que, algunos de estos genes conservan su estructura genómica, mientras que otros divergen entre las especies. Dentro del mismo análisis, se observó que todos los 11 genes presentan elementos en *cis* de respuesta a citoquinina a lo largo de sus *loci*. Adicionalmente, algunos presentan

elementos en *cis* de respuesta a giberelina y ácido abscísico, sugiriendo que podrían estar regulados por más de una fitohormona. De estos 11 genes, la localización genética de cinco de ellos se encuentra dentro de algún QTL previamente descrito y localizado en el mapa TxE, mientras que tres de ellos están dentro de un QTL de *Ripening*, sugiriendo que estos genes podrían estar relacionados con este proceso. Los niveles de transcrito de siete de estos posibles ortólogos fueron medidos mediante RT-qPCR, mostrando que la expresión es inducida por la aplicación exógena de citoquinina en cereza y durazno, y lo hacen en una manera especie específica.

Los resultados sugieren que estos genes estarían bajo los mecanismos moleculares por los cuáles la fitohormona citoquinina ejerce su regulación.



## ABSTRACT

In Chile, Sweet cherry (*Prunus avium*) and Peach (*Prunus persica*) are high yield export crops. Among the diverse commercial factors associated with these fruits, physiological parameters such as fruit size, soluble solids and the ripening time, some of which are known as indicators for the ripening. These have been described to be regulated in various species by plant growth regulators such as cytokinin. With the aim of studying the molecular factors associated with cytokinin response of sweet cherry and peach, the present study focused on performing analyses to identify if the “Top 25 cytokinin induced genes”, which are strongly modulated by the phytohormones cytokinin in the model plant *Arabidopsis thaliana*, are conserved in sweet cherry and peach fruits.

Using a bidirectional BLAST, 12 and 13, putative orthologous of this set of genes were identified in the *Prunus avium* and *Prunus persica* genomes, respectively, 11 of which are conserved between both species. Of these 11 putative orthologous genes analyzed in the INTERPROSCAN platform, they all presented the protein domains characteristic of the proteins encoded by *Arabidopsis* genes. Additionally, analysis of these putative orthologous at the genomic level revealed that, some of these genes are conserved in the genomic structure, while others diverge between the species. Within the same analysis, these 11 genes have *cis*-regulatory elements to cytokinin throughout their *loci*. Additionally, some have gibberellin and abscisic acid responsive *cis*-regulatory elements, suggesting that they could be regulated by more than one phytohormone. Of these 11 genes, five of them are located in a QTL previously described and positioned on the TxE map, while three of them are in a Ripening QTL, suggesting that these genes could be

related to the ripening process. The transcript levels of seven of these putative orthologous were measured by RT-qPCR, showing that the expression is induced by exogenous application of cytokinin in sweet cherry and peach, and they do so in a species-specific manner.

The results suggest that these genes are candidate genes possibly responsible for the underlying molecular mechanisms by which the phytohormone cytokinin exerts its regulation.

## INTRODUCCIÓN

### 1. La importancia de los frutos de cerezo y durazno

En Chile, según la ODEPA, tanto el cerezo (*Prunus avium*) como el durazno (*Prunus persica*) están dentro de las 10 principales especies frutales de exportación. Esto es debido a la temporalidad en el crecimiento y producción de los frutos en nuestro país, los cuáles se ajustan a las demandas internacionales (ODEPA, 2016). Esta oportunidad competitiva ha significado para Chile altos ingresos económicos en los últimos años. Asegurar la producción de estos frutales es de gran importancia para el mercado chileno, el cual enfrenta el desafío de cumplir con las exigencias del mercado internacional, las cuales son cada vez mayores. Es por esto que se han implementado diversos programas de mejoramiento asociado a estos frutales, donde se encuentran la mejora de la calidad del fruto, el tiempo de floración, la auto-compatibilidad, la resistencia a “*cracking*” y la resistencia a enfermedades, entre otros.

Tanto cerezo como durazno son especies de árboles perennes pertenecientes a la prolífica familia de frutales Rosaceae, y en particular, ambas son especies del género *Prunus*, los cuáles se caracterizan por poseer un carozo lignificado que protege a la semilla. *Prunus avium* es una especie diploide ( $2n=16$ ) con 8 cromosomas, su genoma posee un tamaño aproximado de 280 Mpb, con 10.148 *scaffolds* y 43.673 transcritos que codifican proteínas. El genoma fue secuenciado desde el cultivar “*Satonishiki*” y publicado por Shirasawa y cols. en el año 2017. *Prunus persica* también es una especie diploide ( $2n=16$ ) con 8 cromosomas, su genoma tiene un tamaño aproximado de 280 Mpb con 26.873 genes y 47.089 transcritos que

codifican proteínas (IPGI, 2015). El genoma del cultivar “*Lovell*” fue secuenciado y publicado por la “Iniciativa Internacional del genoma de Durazno” (IPGI) el cual ya va en su segunda versión (IPGI, 2015). La liberación de estos datos genómicos, convierten a *Prunus avium* y *Prunus persica* en buenos modelos frutícolas para estudiar en más detalle el desarrollo de estos frutos a nivel molecular.

## **2. Desarrollo del fruto de cereza y durazno**

Ambos frutos presentan un patrón de crecimiento doble sigmoideal, que ha sido dividido en tres etapas (Connors, 1919). La primera etapa corresponde a una fase inicial de crecimiento exponencial llamada “Etapa I” (o S1); una segunda fase lag o “Etapa II” (o S2) caracterizada por la lignificación del carozo y por un lento crecimiento del fruto; y una tercera fase o “Etapa III” (o S3), caracterizada por un aumento en el tamaño del fruto (Connors, 1919; Crane, 1964). Tonutti y cols. (1997) incluyeron un cuarto estadio (“Etapa IV” o S4) para frutos climatéricos, en el cual se detectó la máxima tasa de respiración del fruto, la que indica el comienzo del estadio de maduración o *ripening* del fruto. El incremento en el tamaño de los frutos durante su desarrollo ha sido atribuido a dos factores principales: el incremento en el número de células (división celular) y el incremento en el tamaño celular (expansión celular) (Combe, 1976; Scorza, 1991). Estudios en cultivares de durazno han concluido que la división celular está presente durante la primera fase de crecimiento; y la expansión celular se presenta en la primera y tercera fase del crecimiento (Combe, 1976; Scorza, 1991; Bonghi y cols., 2011). Es en esta última etapa donde tiene cabida el proceso de maduración o *ripening* de los frutos climatéricos. Según cómo ocurre

este proceso se han descrito dos tipos de frutos: climatéricos y no-climatéricos. Los frutos climatéricos son aquellos cuya maduración ocurre por un aumento en la concentración endógena de la fitohormona etileno que conlleva un aumento en la respiración celular, desencadenando el proceso de maduración fisiológica del fruto (Burg y Burg, 1962). El proceso de maduración de los frutos no-climatéricos aún no es bien dilucidado. En frutos no-climatéricos, el proceso de maduración se encuentra liderado por más de una hormona, donde la interacción entre éstas pareciera jugar un rol importante (McAtee y cols., 2013). En este contexto, las cerezas corresponden a frutos no-climatéricos, mientras que los duraznos corresponden a frutos climatéricos. Todos estos procesos involucrados en el desarrollo, crecimiento y maduración del fruto se encuentran bajo una compleja regulación hormonal que afecta el desarrollo del fruto. Dentro de este grupo de hormonas se encuentra citoquinina, cuya participación se ha descrito principalmente durante los estados tempranos de desarrollo del fruto (McAtee y cols., 2013; Teribia y cols., 2016), pero que podría ser relevante los procesos de maduración.

### **3. La fitohormona citoquinina como regulador del crecimiento en frutos**

Las citoquininas son fitohormonas que regulan diversos procesos en las plantas: tanto en el crecimiento, desarrollo, y respuesta a estímulos ambientales. Las citoquininas son hormonas vegetales, derivadas de la adenina, que se diferencian entre sí por las sustituciones en el nitrógeno seis (N6) del anillo purínico. De este modo, existen distintos tipos de citoquininas tales como la trans-zeatina (tZ), isopentiladenina (iP) y benzilaminopruina (BA), entre otras (Kieber, 2002). La Zeatina es una citoquinina que fue aislada desde las semillas del maíz (Letham y cols., 1963) y no fue hasta que el

investigador Hall en el año 1973 designó que el término “citoquinina” es aplicado a un componente que promueve el crecimiento y la diferenciación en cultivos celulares, estimulando la división celular, siendo la Zeatina la citoquinina natural con mayor actividad (Staden y Davey, 1978; Mujica K., 2016). La mayoría de las citoquininas endógenas aisladas y caracterizadas se han estudiado en frutos (Staden y Davey, 1979; Mujica K., 2016). Tanto en durazno como en cerezo se sabe que, durante las primeras semanas de desarrollo que es cuando hay mayor división celular, los frutos presentan altos niveles de *trans*-zeatina que declinan rápidamente durante el periodo de lignificación (Arnau y cols., 1999; Teribia y cols., 2016). A pesar de esto, citoquinina pareciera jugar un rol más allá que sólo el inicio del desarrollo del fruto. Un estudio realizado en cereza var. Bing, mostró que la aplicación exógena de 4 citoquininas sintéticas (BA, CPPU, Topolin y TDZ) a 9 DAFB aumentaban el peso de los frutos, su firmeza y el contenido de sólidos solubles, a su vez que retrasaba la coloración del exocarpo, siendo CPPU y Topolin las citoquininas más efectivas (Zhang y Whitting, 2015). Estudios provenientes del laboratorio en el cual fue elaborada esta tesis, en durazno var. Sweet September, mostraron que la aplicación exógena de TDZ en cada uno de los puntos del desarrollo (S1, S2 y S3) aumentaba el tamaño de los frutos, a su vez que prolongaba el tiempo de cosecha (Meisel, datos no publicados). Resultados similares se han obtenido en diversos otros estudios en frutales, donde se observa que se aumenta el tamaño del fruto en manzana (Sterne y cols., 2003), kiwi (Famiani y cols., 2007), arándano (Retamales y cols., 2014), y pera (Glozer e Ingels, 2007); y en ocasiones, también se ve afectada la maduración (Iwahori y cols., 1988; Ogata y Saito, 1989).

A pesar de que existe abundante información de citoquinina sobre el efecto fisiológico en diversos frutales, y de que es una de las fitohormonas más clásicas y a la cual se le atribuye un rol fundamental en el desarrollo de frutos, los mecanismos moleculares que explican la acción de citoquinina no han sido completamente comprendidos.

#### **4. Genes modulados por citoquinina**

La citoquinina, como todas las fitohormonas, regula diversos procesos en las plantas al inducir la expresión de múltiples genes, involucrados en diversas rutas génicas y de esta forma produciendo cambios en el desarrollo y respuestas fisiológicas de las plantas. La vía de respuesta génica clásica a citoquinina corresponde a las respuestas de tipo A, B y C descritas en *Arabidopsis thaliana* (Sakai y cols., 2000). Una gran parte de la regulación transcripcional de citoquinina es mediada por los reguladores de respuesta de tipo B, los cuáles son factores de transcripción de la familia MYB; mientras que la respuesta de tipo A y C corresponden a genes que producen una retroalimentación negativa de la respuesta, apagando la vía. A pesar de que la respuesta tipo B es de la que más se conoce respecto a la regulación transcripcional de citoquinina, se han descrito numerosos otros genes por la cual citoquinina también estaría ejerciendo su rol regulatorio.

Los primeros genes en respuesta a citoquinina fueron identificados en *Arabidopsis thaliana*, y es en esta planta modelo donde se tiene la mayor información respecto a respuesta génica frente a citoquinina (Schmülling y cols., 1997). En *Arabidopsis* se han descrito genes con distintas funciones que responden a citoquinina, entre ellos reguladores ya mencionados de respuesta tipo A, B y C; genes de la vía de percepción de citoquinina (Inoue y cols., 2001); del catabolismo de citoquinina (Werner y cols., 2001). Otros genes

que responden a citoquinina están relacionados: con la acción de auxina, giberelina y etileno (Schmülling y cols., 2012); estrés biótico y abiótico, formación de pared celular, metabolismo primario, ingreso de nutrientes y fotosíntesis (Werner y Schmülling, 2009). De esta forma la fitohormona citoquinina regula numerosos procesos fisiológicos en plantas.

En el año 2015, Brenner y Schmülling describieron un conjunto de genes que denominaron “Top 25 de genes inducidos por citoquinina”, por ser los genes cuya inducción por citoquinina era consistente en diferentes ensayos realizados en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, en distintos tejidos y condiciones, resumiendo así, una década de estudios transcriptómicos a gran escala sobre citoquinina en esta planta. En esta lista se encuentran genes que codifican para reguladores de respuesta tipo A, factores de transcripción, enzimas relacionadas con degradación proteica, con plegamiento de proteínas y que participan en diversas rutas metabólicas (síntesis de flavonoides, síntesis de aminoácidos, catabolismo de citoquinina, entre otras). Un resumen de estos genes se muestra en la **Figura 1**. En este esquema se puede ver a través de qué genes citoquinina ejercería su rol regulatorio en los procesos de desarrollo y respuesta en *Arabidopsis thaliana*. Los genes de esta lista se enmarcan en diversos procesos fisiológicos, tales como estrés abiótico, estrés biótico, homeostasis de citoquinina, vía de respuesta a etileno, vía de respuesta a giberelina, vía de respuesta a auxina, respuesta a luz y asimilación de nutrientes. Estos genes regulados por citoquininas podrían ayudar a dilucidar los mecanismos por los cuáles citoquinina logra sus efectos, formando una red de señalización



que inducen el crecimiento y desarrollo, así como la respuesta a diversos estímulos (Bhargava y cols., 2013).

A pesar de que existe abundante información sobre el efecto fisiológico de la aplicación de citoquinina exógena en frutos, las bases moleculares que subyacen sobre estos procesos han sido poco estudiadas. Es por esto que la meta de este trabajo es identificar genes de respuesta a citoquinina en frutos de cereza y durazno, utilizando como guía la lista descrita por Brenner y Schmölling (2015), y así tener un mayor conocimiento molecular de los efectos fisiológicos de citoquinina en estas dos especies frutales.



**Figura 1. Funciones moleculares y procesos biológicos del “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” descrito en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Brenner y Schmölling, 2015).** Esta lista de genes resume 10 años de análisis transcriptómicos en la planta modelo, frente a tratamientos exógenos de citoquinina. Estos genes se enmarcan con diversas funciones moleculares como factores de transcripción, plegamiento de proteínas, degradación de proteínas, entre otros; y en diversos procesos biológicos tales como vía de respuesta e etileno y a otras fitohormonas, respuesta a luz, entre otros.

## **HIPÓTESIS**

En *Prunus avium* y *Prunus persica* se encuentran conservados ortólogos del “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” descrito en *Arabidopsis thaliana*, que se expresan diferencialmente en frutos maduros de estas especies, al ser tratados con citoquinina exógena.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar, caracterizar y comparar, en los genomas de *Prunus avium* y *Prunus persica*, posibles ortólogos del “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis thaliana*; y determinar el efecto de la aplicación exógena de la citoquinina *trans*-zeatina en la expresión de este conjunto de genes en frutos maduros de cereza y durazno.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificar en *Prunus avium* y *Prunus persica* posibles ortólogos para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” descrito en *Arabidopsis thaliana*, analizando la estructura genómica de los distintos *loci* de éstos y su localización genética.
2. Determinar si los posibles ortólogos para este conjunto de genes presentan una expresión diferencial frente a la aplicación exógena de *trans*-zeatina, en frutos maduros de *Prunus avium* y *Prunus persica*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Material vegetal de *Prunus avium* y *Prunus persica*

Las muestras biológicas de durazno, *Prunus persica* var. September Sun, fueron recolectadas del fundo “Santa Helena” perteneciente a la empresa “Agrícola Arcahue”, ubicado en la comuna de Graneros, Región del General Libertador Bernardo O’Higgins. Se tomaron al menos 10 frutos de durazno, en proceso de maduración, por árbol; y se realizó un *pool* de frutos para cada árbol (un total de 3 árboles). En el caso de cerezas, *Prunus avium* var. Lapins, fueron recolectadas del centro experimental de la Universidad Católica de Valparaíso ubicado en la comuna de Quillota, Región de Valparaíso. Se tomaron al menos 25 frutos de cerezo, en proceso de maduración, por árbol; y se realizó un *pool* de frutos para cada árbol (un total de 3 árboles). En ambos casos, se trasladaron inmediatamente al laboratorio para realizar los tratamientos con la hormona citoquinina a temperatura ambiente.

### 2. Tratamiento con *trans*-zeatina en frutos de *Prunus avium* y *Prunus persica* en etapa de post-lignificación.

Los tratamientos se realizaron con citoquinina *trans*-zeatina (Sigma-Aldrich) a diferentes concentraciones de la hormona para ambos frutos maduros. Se cortaron láminas finas de cada fruto, los cuales posteriormente se mezclaron para obtener un *pool* de frutos por árbol. Las láminas se sumergieron en una solución de tampón sodio-fosfato (NaPi) para evitar su oxidación. Luego, se utilizó la hormona *trans*-zeatina (tZ) a 10 nM y 100 nM diluidas en tampón NaPi. De esta forma, el experimento se realizó en 3 condiciones de

tratamiento para cada especie: Tampón NaPi como muestra control sin hormona, 10 nM de *trans*-zeatina y 100 nM de *trans*-zeatina. El pool de láminas se sumergió en la solución correspondiente a un tratamiento y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, como es indicado por Hwang y Sheen (2001) para la planta *Arabidopsis*. Las láminas se congelaron en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C para su posterior uso.

### **3. Extracción de ARN total de frutos de *Prunus avium* y *Prunus persica*.**

La extracción de ARN total a partir de frutos maduros de cereza, se llevó a cabo utilizando el método descrito por Jaakola y cols. (2001). Las muestras congeladas a -80 °C de frutos de cerezo se molieron en nitrógeno líquido usando un mortero previamente esterilizado y a -20 °C. Aproximadamente 5 g de tejido molido fue colocado en un tubo *Corex* de 30 mL, se agregaron 10 mL de tampón de extracción (CTAB 2% [p/v], PVP 2% [p/v], Tris-HCl 200 mM, EDTA 25 mM, NaCl 2 M, pH 8.0) previamente calentado a 65 °C. Se agregaron 200 µL de β-mercaptoetanol (concentración final 2% [v/v]) bajo campana, se agitaron en vortex y se incubaron durante 10 min a 65 °C, agitando los tubos suavemente cada 3 min. Los tubos se agitaron en vortex durante un minuto y luego se centrifugaron a 1845 g por 15 min a 4 °C. La fase acuosa (sobrenadante) se llevó a un nuevo tubo de 30 mL y se extrajo 3 veces con 1 volumen de cloroformo : alcohol isoamílico (24:1), agitando en vortex durante 5 min y centrifugando a 1845 g por 20 min. cada una. Se calculó el volumen de LiCl 10 M a agregar al volumen total de fase acuosa extraída considerando que el LiCl debía quedar a una concentración final de 3M. Luego, se mezcló suavemente y se dejó precipitando toda una noche a 4 °C, en hielo. Al día siguiente, la solución incubada se centrifugó a 1.845 g por 30 min a 4 °C. Se giró el tubo

para descartar la fase acuosa y sacar el exceso de líquido, quedándonos sólo con el precipitado. El precipitado se disolvió con 500 µL de solución tampón SSTE (Concentración final NaCl 1 M, SDS 0,5 % [p/v], Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) previamente calentado a 65 °C, pipeteando suavemente con pipeta de 1 mL. Posteriormente, se traspasaron las muestras a tubos de 2 mL y se agregó 1 volumen (500 µL aproximadamente) de cloroformo : alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vortex por 30 seg. y se centrifugó a 21.910 g por 10 min a 4 °C. Luego, se extrajo la fase acuosa y se realizó, igual a la anterior, una nueva extracción con cloroformo : alcohol isoamílico (24:1). Se extrajo el sobrenadante y se agregaron 2 volúmenes de etanol 100% enfriado a -20 °C. Se dejó precipitando por 40 min a -80 °C. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 21.910 g por 30 min a 4 °C y luego se retiró el etanol por inversión del tubo, dejando secar el precipitado durante 3 a 5 min. sobre un trozo de toalla absorbente. Se lavó el sedimento con 500 µL de etanol 70 % enfriado a -20°C, y se centrifugó por 5 min a 21.910 g a 4°C. Luego, se eliminó el etanol por inversión del tubo y se dejó secando el precipitado por 5 min. sobre un trozo de toalla absorbente. Una vez que se evaporó la mayor cantidad de etanol posible, se resuspendió el sedimento en 25 µL de H<sub>2</sub>O tratada con DEPC (1%), previamente calentada a 55 °C. Finalmente, se guardó a -80 °C para su posterior uso.

La extracción de ARN total a partir de frutos maduros de duraznos, se llevó a cabo utilizando el método descrito por Meisel y cols. (2005). Las muestras congeladas a -80 °C de frutos de durazno se molieron en nitrógeno líquido, usando un mortero previamente esterilizado. Aproximadamente 5 g de tejido molido fue colocado en un tubo *Corex* de 30

mL, se agregaron 10 mL de tampón de extracción (CTAB 2 % [p/v], PVP 2 % [p/v]), Tris-HCl 100 mM, EDTA 25 mM, NaCl 2 M, pH 8,0) previamente calentado a 65 °C. Se agregó 92 mL de β-mercaptoetanol (0,92 % [v/v]) y se incubó durante 10 min a 65 °C agitando el tubo suavemente cada 3 min. En seguida, se agregó 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se agitó en vortex durante 5 min. Se centrifugó por 30 min a 1845 g, a una temperatura de 4 °C en la centrifuga Universal 320R de Hettich zentrifugen. Se recuperó la fase acuosa, y se realizó una nueva extracción de cloroformo: alcohol isoamílico, como se describió anteriormente. La nueva fase acuosa que se obtuvo se mezcló con 1,2 mL de Cloruro de litio (LiCl) 10 M por cada 4 mL de sobrenadante recuperado. Se agitó suavemente la solución, y se incubó a 4 °C durante toda una noche. Luego, la solución incubada se centrifugó a 1845 g durante 90 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 mL de solución SDS 0,5 %. Inmediatamente se le agregó un volumen de cloroformo : alcohol isoamílico (24:1), se agitó por 5 min en vortex, y la solución se traspasó a un tubo de 2 mL. Se centrifugó a 21.910 g por 10 min a 4 °C, se recuperó la fase acuosa la cual se mezcló con 0,7 volúmenes de isopropanol 100%, dejando precipitar a -80°C por 40 min. Se homogenizó por inversión suavemente y se centrifugó a 21.910 g por 30 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante, el sedimento se lavó con etanol 70 % frío y se centrifugó a 21.910 g por 10 min a 4 °C. Posteriormente se eliminó el sobrenadante por inversión del tubo, dejando secar sobre una toalla absorbente por 5 min, y se re suspendió el sedimento en 25 µL H<sub>2</sub>O tratada con DEPC (1%) previamente calentado a 55 °C. Finalmente, se guardó a -80 °C hasta su uso.

#### **4. Cuantificación y determinación de pureza e integridad de ARN total, de frutos de *Prunus avium* y *Prunus persica*.**

La concentración de ARN total fue medida en el equipo *Nano Quant* de TECAN a 260 nm, mediante el *software i-Control V1.10*. Para determinar la calidad del ARN se observó la razón entre las absorbancias  $A_{260}/A_{280}$ . Para descartar contaminación de proteínas se permitió un rango entre 1,8 y 2,1. La integridad del ARN se analizó a través de electroforesis en gel denaturante 1,2% de agarosa. El ARN se visualizó en el gel de agarosa con *Gel-Red Nucleic Acid Stain* de BIOTUM. La electroforesis se realizó con solución tampón de corrida MOPS 1X con una diferencia de potencial de 70V durante 40 min. La visualización se realizó en el trans-iluminador *FOTO/UV 21* de *FOTODYNE*, y la integridad se determinó por la presencia de las bandas rRNA 28S y 18S, donde la primera debe ser el doble en intensidad de la segunda.

#### **5. Digestión enzimática de ADN desde ARN de frutos de *Prunus avium* y *Prunus persica*.**

Las muestras de ARN de frutos de cereza y durazno fueron tratadas con ADNasa TURBO™ de Invitrogen, con el fin de eliminar las posibles trazas de ADN que quedasen en las muestras extraídas. La reacción se llevó a cabo según las especificaciones del producto: hasta 10 µg de RNA a una concentración final menor o igual a 200 ng/µL, 1 µL de ADNasa TURBO™ 2U/µL, 2,5 µL de buffer de reacción 10X, agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 25 µL. Se incubó a 37 °C por 30 min. agitando cada 5 min. La reacción se terminó inactivando la enzima con 2,5 µL del inactivador de TURBO DNase, incubando 5 min a temperatura ambiente, agitando cada 1 min.

Finalmente, se centrifugó a 9200 g por 5 min para precipitar el inactivador, rescatando el sobrenadante.

## **6. Transcripción reversa de ARN de frutos de *Prunus avium* y *Prunus persica*.**

La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo usando el sistema *First Strand cDNA Synthesis* Kit de Thermo SCIENTIFIC según las especificaciones del producto: Para cada reacción se utilizaron 1 µg de ARN total previamente tratado con ADNasa TURBO™ de Invitrogen, 1 µL de partidor Oligo(dT)<sub>18</sub> 100 µM y se llevó a un volumen final de 11 µL con agua libre de nucleasas. Inmediatamente se agregó a la reacción 4 µL de Buffer de reacción 5X (Tris-HCL 250 mM pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT), 1 µL de Inhibidor de ARNasa RiboLock 20 U/µL, 2 µL de mix de dNTP 10 mM, y Transcriptasa reversa M-MuLV 20 U/µL. Se incubó a 37 °C por 1 h y se detuvo la reacción calentándola a 70 °C por 5 min. Asumiendo que el ARN se retro-transcribe con una eficiencia sobre el 99%, se diluyó 1 µL en 9 µL de agua libre de nucleasas para que quedase a una concentración de 10 ng/µL.

## **7. Identificación de posibles ortólogos para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis* en *Prunus avium* y *Prunus persica*.**

La identificación de posibles ortólogos para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis* en cereza y durazno, se realizó mediante BLAST bidireccionales. Se tomaron las secuencias proteicas de estos 25 genes desde la base de datos de *Arabidopsis* V10.0 (descargada desde TAIR, [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org), y visualizada en el software CLC Genomics Workbench v9.5.3) y se realizó un primer tblastn (matriz



de sustitución BLOSUM62) desde éstas secuencias hacia los genomas de cereza v1.0 y durazno v2.1 (descargadas desde GDR, [www.rosaceae.org](http://www.rosaceae.org)). Se escogió el mejor candidato para cada secuencia considerando un e-value menor a  $10^{-20}$  y un porcentaje de identidad mayor o igual al 70 % en el BLAST. Posteriormente, se tomó la secuencia codificante a proteína *cds* de estos candidatos desde los genomas de cereza y durazno, y se realizó un tblastx (matriz de sustitución BLOSUM62) hacia el genoma de *Arabidopsis*. Considerando los mismos parámetros del primer BLAST, se escogieron como los posibles ortólogos del “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis* a aquellas secuencias que tuvieran como mejor candidato a las secuencias iniciales de *Arabidopsis* utilizadas en el primer BLAST, cerrando así la bidireccionalidad.

#### **8. Alineamiento de secuencias e identificación de dominios conservados entre el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis* y los posibles ortólogos para *Prunus avium* y *Prunus persica*.**

La predicción de los dominios presentes en la secuencia aminoacídica de cada posible ortólogo se realizó mediante la plataforma INTERPROSCAN de la *European Bioinformatics Institute* ([www.ebi.ac.uk/interpro/](http://www.ebi.ac.uk/interpro/)). Los posibles ortólogos identificados, fueron alineados con miembros de las familias génicas de *Arabidopsis thaliana* respectivas para cada posible ortólogo, mediante la herramienta bioinformática ClustalW (Larkin y cols., 2007). Los alineamientos fueron visualizados con la plataforma en línea BoxShade ([www.emblnet.vital-it.ch/software/BOX\\_form.html](http://www.emblnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html)).

## 9. Análisis cuantitativo de expresión génica mediante reacción de PCR en tiempo real.

Se realizó una cuantificación relativa de la abundancia de transcritos de cereza y durazno en proceso de maduración mediante qRT-PCR. Los partidores fueron diseñados en el software *Vector NTI Express Designer V10.3*. Las secuencias para amplificar los segmentos de los genes en estudio (posibles ortólogos para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina”) se muestran en la **Tabla 1 del material suplementario**, más el gen de *Poliubiquitina 10 (UBQ10)*, el cual se usó como gen de referencia.

La elección de un gen de referencia adecuado, se basó en la publicación de Xia Ye y cols. (2015) para genes de referencia en cereza, cuyos partidores *TEF2*, *ACT1* y *UBQ10* ya habían sido previamente utilizados también para durazno. Se utilizó el gen que mostrara tener menor tasa de cambio en ambas especies frente al tratamiento con citoquinina, el cual fue *UBQ10*.

Se determinó la eficiencia de los partidores para una reacción de qRT-PCR mediante el programa *LinRegPCR* (Ruijter y cols., 2009), el cual se basa en el ajuste de datos crudos obtenidos desde la reacción de qRT-PCR para definir la fase exponencial de amplificación y con esto, el ciclo donde existe fluorescencia por sobre la fluorescencia ruido (Cq), para calcular la eficiencia promedio del partidador en las diferentes muestras.

La reacción de qRT-PCR fue realizada en el equipo *Rotor-Gene Q* de QIAGENE, mediante el *software Rotor-Gene Q series V2.1.0*. Las reacciones se llevaron a cabo usando el sistema *Fast Plus EvaGreen qPCR Master Mix* de Biotum según las

especificaciones del producto: 5  $\mu$ L de *EvaGreen Master Mix 2X* (tampón de reacción, dNTPs, *EVA Green* y *Cheetah<sup>TM</sup> Taq*), 0.5  $\mu$ L de partidor *forward* 10  $\mu$ M, 0.5 de partidor *reverse* 10  $\mu$ M, 10 ng de cDNA templado en 1  $\mu$ L y 3  $\mu$ L de agua grado de biología molecular. Las condiciones para cada reacción de qRT-PCR se basaron en las recomendadas por el producto utilizado: 1 ciclo para la activación de la enzima por 2 min. a 95 °C; 45 ciclos de denaturación por 5 s. a 95 °C, hibridación por 5 s. a la  $T_m$  promedio para cada par de partidores (**Tabla 1 del material suplementario**) y extensión por 25 s. a 72 °C. La curva de *melting* se realizó entre los 72 °C y 95 °C, donde se verificó que los partidores se unieran a un producto único, visualizándose un único *peak* de fluorescencia.

#### **10. Análisis estadístico de la cuantificación de la expresión génica mediante reacción de PCR en tiempo real**

El análisis estadístico se realizó bajo una distribución no paramétrica sin homogeneidad de varianzas (Karlen y cols., 2007; Goni y cols., 2009), las diferencias significativas se calcularon con el test de Friedman para datos que no cumplen una distribución normal. La representación gráfica de los datos y el análisis estadístico fueron realizados mediante el software *GraphPad Prism V6.0*.

#### **11. Comparación de la estructura genómica de los loci de los posibles ortólogos para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis*.**

La comparación de la estructura genómica de los *loci* de los posibles ortólogos encontrados en cereza y durazno fue realizada utilizando las bases de datos para *Arabidopsis*, *Prunus avium* y *Prunus persica* descargadas desde TAIR y GDR

respectivamente, analizadas y visualizadas con el *software CLC Genomics Workbench* v9.5.3. La búsqueda de posibles elementos regulatorios en *cis* para citoquinina y otras fitohormonas fue realizada con el mismo *software*. La representación gráfica de los resultados obtenidos se realizó mediante la plataforma en línea Exon-Intron Graphic Maker ([www.wormweb.org/exonintron](http://www.wormweb.org/exonintron)).

## **12. Localización de los *loci* de los posibles ortólogos para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis* en el mapa de ligamiento TxE.**

La localización de los *loci* en el mapa de ligamiento TxE de los posibles ortólogos encontrados en cereza y durazno, fue realizada utilizando la base de datos para *Prunus persica* descargadas desde GDR, analizadas y visualizadas con el *software CLC Genomics Workbench* v9.5.3. Se buscaron en el genoma marcadores moleculares tipo *SSR* (*simple sequence repeat*) y *SNP* (*single nucleotide polymorphism*) que flanquearan los *loci* de los posibles ortólogos y con éstos se estimó la posición en el mapa de ligamiento TxE, utilizando la base de datos de marcadores moleculares disponible en la herramienta cMAP de GDR y el mapa de ligamiento TxE descrito en el libro “*Genetics, Genomics and Breeding of Stone Fruits*” (Kole y Abbott, 2012).

## RESULTADOS

### 1. Posibles ortólogos para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis thaliana* en *Prunus avium* y *Prunus persica*.

Para evaluar la respuesta génica a la aplicación exógena de citoquinina en frutos de cereza y durazno, se identificaron en *Prunus avium* y *Prunus persica* los posibles ortólogos para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis* descrito por Brenner y Schmölling (2015). Los genes de esta lista presentan una respuesta génica consistente en diferentes ensayos a citoquinina en la planta modelo. Mediante BLASTs bidireccionales, se encontraron en la base de datos de secuencias codificantes (CDS) de *Prunus avium* (v1.0) y *Prunus persica* (v2.1), las secuencias descritas en las **Tablas 1 y 2**, correspondiente a posibles ortólogos del “top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis*.

Con los análisis bioinformáticos, se encontraron 12 posibles ortólogos en cereza del “Top 25 de genes inducidos por citoquinina”, y 13 posibles ortólogos en durazno. Hay 11 posibles ortólogos que son compartidos entre cereza y durazno que corresponden a los genes descritos en las tablas como: *SHD*, *CRF2*, *CKX4*, *CPK28*, *NRP2*, *GIS3*, *PAP8*, *FLS1*, *PRNPH3* y dos genes codificantes para proteínas de función desconocida (*loci At1g28100* y *At5g41590*) las cuáles se denominaron *UPI* y *UP2*, respectivamente (por *unknown protein*).

**Tabla 1. BLAST Tabla 1. BLAST bidireccionales del “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis* con *Prunus avium*.** Se realizó un tblastn con las secuencias proteicas de los genes de *Arabidopsis* contra la base de datos CDS de *Prunus avium* v1.0, con la matriz de sustitución BLOSUM62, considerando un *e-value* menor a  $10^{-20}$  y una identidad mayor al 70%. Un tblastx fue realizado desde la secuencia CDS encontrada en *Prunus avium* hacia el genoma de *Arabidopsis*, considerando la misma matriz y parámetros anteriores. Se escogió como posible ortólogo a aquella secuencia que, cumpliendo con los parámetros establecidos, llegase al mismo gen con el que se inició el primer BLAST. Se encontraron 12 posibles ortólogos en el genoma de cereza. \* indica que no se encontró un posible ortólogo bajo los parámetros establecidos.

Locus	Descripción	Mejor Hit Cherry v1.0	BLAST e-value 1	Identidad (%) 1	BLAST e-value 2	Identidad (%) 2
AT4G29740	CKX4; Cytokinin oxidase 4	Pav_sc0000129.1_g070.1.mk	9,87E-53	73,68	1,27E-39	73,68
AT5G66210	CPK28; Calcium-dependent protein kinase family protein 28	Pav_sc0000044.1_g540.1.mk	0,00E+00	85,96	0,00E+00	82,68
AT4G23750	CRF2; Cytokinin response factor 2	Pav_sc0001335.1_g640.1.mk	3,24E-34	88,33	1,58E-41	78,67
AT4G37410	CYP81FA; Member of CYP81F	Pav_sc0000852.1_g220.1.mk	7,56E-87	71,5	6,35E-60	75,6
AT5G08640	FLS1; Flavonol synthase 1	Pav_sc0000030.1_g1320.1.mk	3,17E-72	85	1,11E-127	70,45
AT1G68360	GIS3; Glabrous inflorescence stems 3	Pav_sc0001488.1_g050.1.mk	2,81E-23	85	2,94E-23	70,59
AT1G18800	NRP2; NAP1 related protein 2	Pav_sc0000877.1_g330.1.mk	8,36E-98	87,5	2,50E-39	90
AT2G01890	PAP8; Purple acid phosphatase 8	Pav_sc0000893.1_g850.1.mk	2,91E-54	78,45	3,34E-54	78,45
AT1G50280	PRNPH3; Phototropic-responsive NPH3 family protein	Pav_sc0000410.1_g280.1.mk	8,57E-127	70,3	1,26E-128	78,93
AT5G41590	Protein of unknown function	Pav_sc0000886.1_g840.1.mk	2,12E-32	81,82	2,53E-24	81,82
AT4G24190	SHD; HSP90-like protein SHEPHERD	Pav_sc0002154.1_g060.1.mk	0,00E+00	86,93	0,00E+00	92,11
AT1G28100	Unknown protein	Pav_sc0001107.1_g140.1.mk	8,37E-97	84,75	2,36E-96	84,75
AT5G62920	ARR6; Type-A response regulator 6	*	*	*	*	*
AT2G41310	ARR8; Response regulator 8	*	*	*	*	*
AT1G17190	GSTU26; Glutathione S-transferase tau 26	*	*	*	*	*
AT2G40670	ARR16; Response regulator 16	*	*	*	*	*
AT3G58990	IPM11; Isopropylmalate isomerase 1	*	*	*	*	*
AT1G19050	ARR7; Response regulator 7	*	*	*	*	*
AT4G29690	Alkaine-phosphatase-like family protein	*	*	*	*	*
AT4G29700	Alkaine-phosphatase-like family protein	*	*	*	*	*
AT5G47980	HXXXD-type acyl-transferase family protein	*	*	*	*	*
AT5G19110	Aspartyl protease family protein	*	*	*	*	*
AT1G53060	Le-gume lectin family protein	*	*	*	*	*
AT3G18773	RINGU-box superfamily protein	*	*	*	*	*
AT3G44326	F-box family protein	*	*	*	*	*

**Tabla 2. BLAST bidireccionales del “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis* con *Prunus persica*.** Se realizó un tblastn con las secuencias proteicas de los genes de *Arabidopsis* contra la base de datos CDS de *Prunus persica* v2.1, con la matriz de sustitución BLOSUM62, considerando un *e-value* menor a  $10^{-20}$  y una identidad mayor al 70%. Un tblastx fue realizado desde la secuencia CDS encontrada en *Prunus persica* hacia el genoma de *Arabidopsis*, considerando la misma matriz y parámetros anteriores. Se escogió como posible ortólogo a aquella secuencia que, cumpliendo con los parámetros establecidos, llegase al mismo gen con el que se inició el primer BLAST. Se encontraron 13 posibles ortólogos en el genoma de durazno. \* indica que no se encontró un posible ortólogo bajo los parámetros establecidos.

Locus	Descripción	Mejor Hit Peach v2.1	BLAST e-value 1	Identidad (%) 1	BLAST e-value 2	Identidad (%) 2
AT4G29740	CKX4; Cytokinin oxidase 4	Prupe.7G208400.1	3,32E-74	73.68	1,19E-69	73.68
AT5G66210	CPK28; Calcium-dependent protein kinase family protein 28	Prupe.7G168400.1	0,00E+00	87.72	0	85.92
AT4G23750	CRF2; Cytokinin response factor 2	Prupe.5G114100.1	1,34E-45	94.92	3,14E-30	82.26
AT4G37410	CYP81FA; Member of CYP81F	*	*	*	*	*
AT5G08640	FLS1; Flavonol synthase 1	Prupe.1G502700.1	2,15E-72	80	1,26E-120	70.45
AT1G68360	GIS3; Glabrous inflorescence stems 3	Prupe.1G314000.1	4,75E-33	100	2,26E-30	100
AT1G18800	NRP2; NAP1 related protein 2	Prupe.5G191400.1	5,63E-98	87.5	2,78E-40	80
AT2G01890	PAP8; Purple acid phosphatase 8	Prupe.1G333700.1	6,59E-20	81.82	1,96E-107	70.41
AT1G50280	PRNPH3; Phototropic-responsive NPH3 family protein	Prupe.1G344900.1	5,20E-106	70.3	3,79E-29	70.3
AT5G41590	Protein of unknown function	Prupe.5G207300.1	4,64E-42	70.66	1,20E-41	81.82
AT4G24190	SHD; HSP90-like protein SHEPHERD	Prupe.1G363900.1	0,00E+00	87.66	0	93.42
AT1G28100	Unknown protein	Prupe.1G217100.3	2,76E-96	84.76	1,59E-96	84.75
AT5G62920	ARR6; Type-A response regulator 6	Prupe.5G180500.1	5,11E-67	83.72	3,21E-67	83.72
AT2G41310	ARR8; Response regulator 8	Prupe.7G041600.1	1,05E-71	81.63	4,89E-67	84.44
AT1G17190	GSTU26; Glutathione S-transferase tau 26	*	*	*	*	*
AT2G40670	ARR16; Response regulator 16	*	*	*	*	*
AT3G58990	IPM1; Isopropylmalate isomerase 1	*	*	*	*	*
AT1G19050	ARR7; Response regulator 7	*	*	*	*	*
AT4G29690	Alkaline-phosphatase-like family protein	*	*	*	*	*
AT4G29700	Alkaline-phosphatase-like family protein	*	*	*	*	*
AT5G47980	HXXXD-type acyl-transferase family protein	*	*	*	*	*
AT5G19110	Aspartyl protease family protein	*	*	*	*	*
AT1G53060	Legume lectin family protein	*	*	*	*	*
AT3G18773	RINGU-box superfamily protein	*	*	*	*	*
AT3G44326	F-box family protein	*	*	*	*	*

Según la información disponible en TAIR, los genes fueron divididos en los siguientes grupos: posibles genes que codifican para factores de transcripción; genes relacionados con degradación de proteínas; genes relacionados con plegamiento de proteínas; genes relacionados con metabolismo; genes relacionados con respuesta a patógeno; y genes relacionados con asimilación de nutrientes. Un resumen de esto se muestra en la **Tabla 3**.

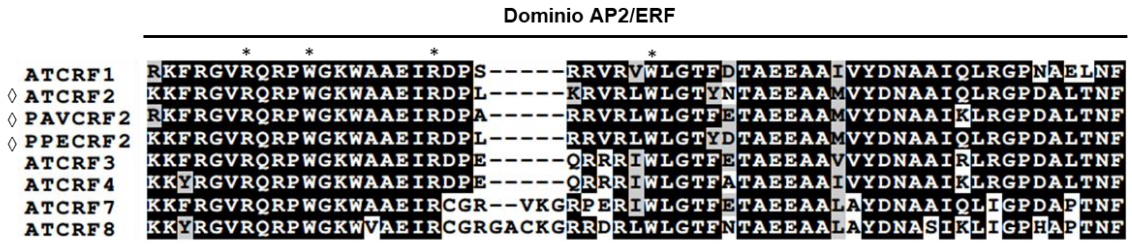
**Tabla 3.** Categorías funcionales de los 11 posibles ortólogos del “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis*, conservados entre *Prunus avium* y *Prunus persica*.

Categoría	Genes agrupados	Locus <i>A. thaliana</i>	Locus <i>P. avium</i>	Locus <i>P. persica</i>
Factor de transcripción	<i>CRF2</i>	<i>AT4G23750.1</i>	<i>Pav_sc0001335.1_g640.1.mk</i>	<i>Prupe.5G114100.1</i>
	<i>GIS3</i>	<i>AT1G68360.1</i>	<i>Pav_sc0001488.1_g050.1.mk</i>	<i>Prupe.1G314000.1</i>
Degradación de proteínas	<i>CPK28</i>	<i>AT5G66210.1</i>	<i>Pav_sc0000044.1_g540.1.mk</i>	<i>Prupe.7G168400.1</i>
	<i>PRNPH3</i>	<i>AT1G50280.1</i>	<i>Pav_sc0000410.1_g280.1.mk</i>	<i>Prupe.1G344900.1</i>
Plegamiento de proteínas	<i>SHD</i>	<i>AT4G24190.1</i>	<i>Pav_sc0002154.1_g060.1.mk</i>	<i>Prupe.1G363900.1</i>
	<i>NRP2</i>	<i>AT1G18800.1</i>	<i>Pav_sc0000877.1_g330.1.mk</i>	<i>Prupe.5G191400.1</i>
Metabolismo (anabolismo/catabolismo)	<i>CKX4</i>	<i>AT4G29740.2</i>	<i>Pav_sc0000129.1_g070.1.mk</i>	<i>Prupe.7G208400.1</i>
	<i>UP1</i>	<i>AT1G28100.4</i>	<i>Pav_sc0001107.1_g140.1.mk</i>	<i>Prupe.1G217100.3</i>
	<i>FLS1</i>	<i>AT5G08640.1</i>	<i>Pav_sc0000030.1_g1320.1.mk</i>	<i>Prupe.1G502700.1</i>
Respuesta a patógeno	<i>UP2</i>	<i>AT5G41590.1</i>	<i>Pav_sc0000886.1_g840.1.mk</i>	<i>Prupe.5G207300.1</i>
Asimilación de nutrientes	<i>PAP8</i>	<i>AT2G01890.1</i>	<i>Pav_sc0000893.1_g850.1.mk</i>	<i>Prupe.1G337700.1</i>

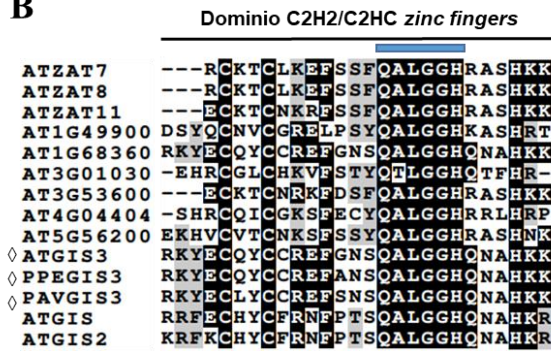
Para apoyar la hipótesis de que estos genes corresponden a posibles ortólogos de los genes descritos en *Arabidopsis*, se realizó un alineamiento de las secuencias aminoacídicas codificadas por dichos genes en las 3 especies y con las familias génicas de dichos genes en *Arabidopsis*, según correspondiese con el *software* ClustalW (exceptuando los *loci* *At1g28100* y *at5g41590* por ser proteínas de función desconocida). Además, se buscó si



**A**



**B**



**Figura 2.** Las secuencias aminoacídicas codificadas por los posibles genes que codifican para factores de transcripción *PavCRF2*, *PpeCRF2*, *PavGIS3* y *PpeGIS3* presentan dominios conservados de las familias de CRF y GIS de *A. thaliana*. **A.** Alineamiento del dominio AP2/ERF característico de los CRF de *A. thaliana* (1 al 7), el cual se ve está altamente conservado en los posibles ortólogos encontrados en cereza y durazno, con los residuos de Arg y Trp que interactúan con la doble hebra de ADN (\*). **B.** Alineamiento del dominio C2H2/C2HC zinc fingers característico presente en las proteínas GIS de *A. thaliana* (1 al 3) junto con otras proteínas de esta familia, el cual presenta el motivo QALGGH que está altamente conservado.

poseían los dominios proteicos correspondientes a la información existente para dichas proteínas de *Arabidopsis* en la plataforma en línea de INTERPROSCAN. Los resultados de los alineamientos los dominios proteicos encontrados se muestran en las **Figuras 2 y S5-S9 del material suplementario**. En la **Figura 2** se muestra la comparación secuencias aminoacídicas para los genes *CRF2* (1A) y *GIS3* (1B) con sus respectivas familias génicas de *Arabidopsis*. Para el factor en respuesta a citoquinina CRF2, tanto en cereza como en durazno se encuentra el dominio AP2/ERF característico de esta familia génica, y se encuentra altamente conservado presentando los aminoácidos de arginina y triptófano que

interactúan con la doble hebra de ADN (Allen y cols., 1998). Para la proteína GIS3 se observa que tanto en cereza como en durazno presenta el dominio dedos de zinc característico de esta familia génica, con el motivo QALGGH (Englbrecht y cols., 2004). De este modo, a las secuencias *Pav\_sc0000410.1\_g280.1.mk* y *Pav\_sc0001335.1\_g640.1.mk* de cereza se denominaron *PavCRF2* (*Prunus avium* cytokinin response factor 2) y *PavGIS3* (*Prunus avium* glabrous inflorescence stem 3), respectivamente; y a las secuencias *Prupe.5g114100.1* y *Prupe.1g314000.1* de durazno se denominaron *PpeCRF2* y *PpeGIS3*, respectivamente.

Estos resultados fueron consistentes con lo descrito anteriormente para las secuencias aminoacídicas de CRF2 y GIS3. Se observa que las secuencias aminoacídicas de CPK28, PRNPH3, SHD, NRP2, CKX4, FLS1, PAP8, UP1 y UP2, identificadas en *Prunus avium* y *Prunus persica* (**Figuras S5-S9 del material suplementario**) presentan los dominios característicos para cada familia de proteínas: dominios quinasa y EF-hand para CPK28 y los dominios BTB/POZ y NPH3 para PRNPH3 (**Figura S5**); el dominio HSP90 para SHD y el dominio NAP para NRP2 (**Figura S6**); el dominio FAD oxidasa de unión a citoquinina para CKX4, los dominios Nod-hem dioxigenasa y oxoglutarato para FLS1 y el dominio aceto-acetato decarboxilasa para UP1 (**Figura S7**); el dominio tipo LURP-one para UP2 (**Figura S8**); y el dominio fosfatasa metal-dependiente para PAP8 (**Figura S9**).

## **1.2 Estructura genómica de los posibles ortólogos para el “top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis* en *Prunus avium* y *Prunus persica*.**

Se comparó la conservación a nivel de estructura genómica entre los genes según la información disponible en los genomas respectivos de cada especie, incluyendo

*Arabidopsis* con el fin de evaluar posibles criterios de conservación y/o divergencia entre las especies. Además, se buscó posibles elementos en *cis* regulatorios a citoquinina a lo largo de las estructuras de los genes en las tres especies, que puedan dar indicios de la modulación por esta fitohormona. También, se buscaron posibles elementos *cis* regulatorios de otras fitohormonas como el ácido giberélico y el ácido abscísico, que pudiesen estar jugando un rol regulatorio en la expresión de estos genes.

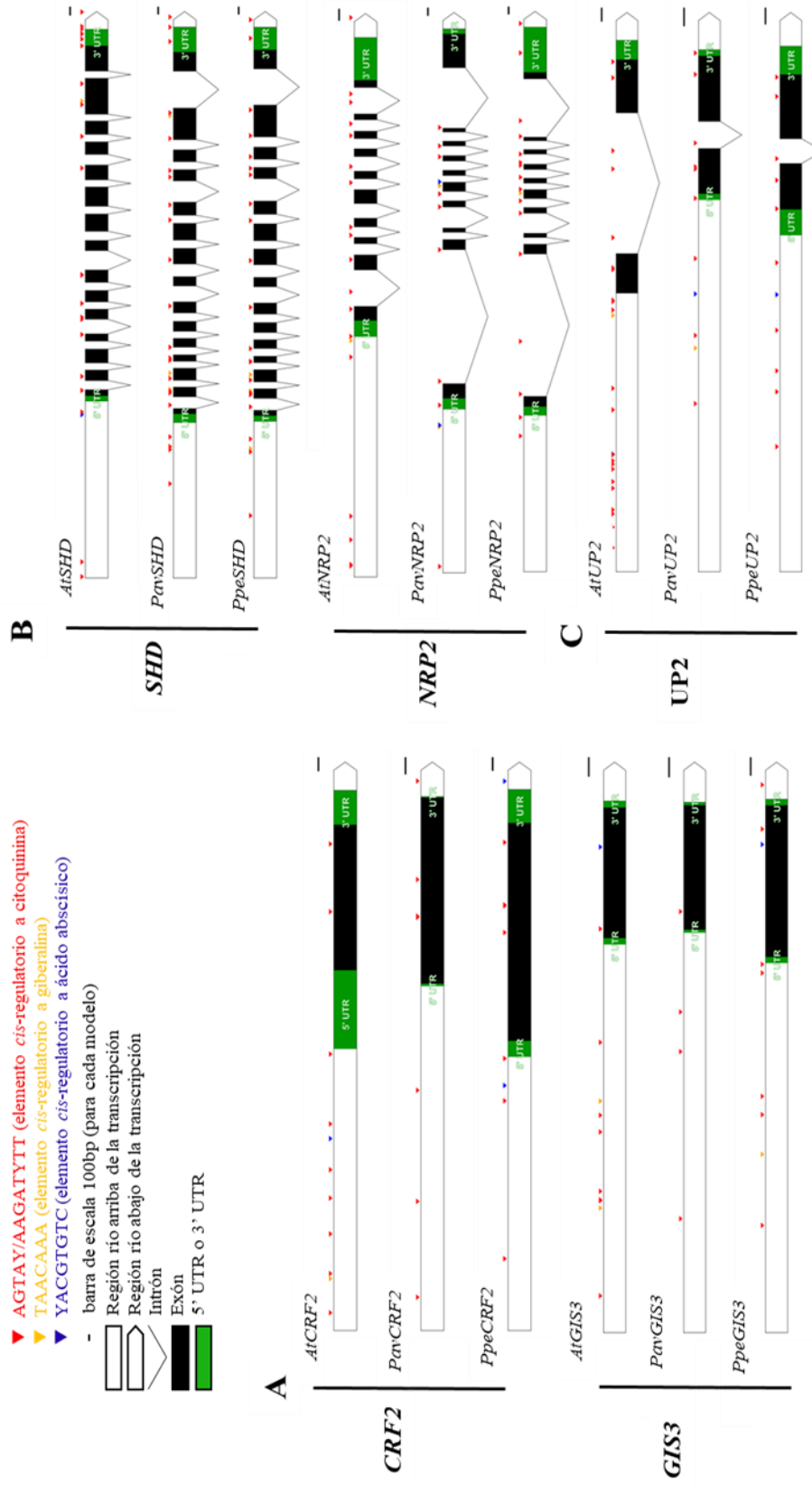
En la **Figura 3A** se muestra la estructura genómica del *locus* que codifica para la proteína CRF2 en *Arabidopsis*, y de los *loci* en *Prunus avium* y *Prunus persica*. En esta, la estructura es bastante conservada en las tres especies, presentando un único exón. Además, el *locus* para *Arabidopsis* presenta mayor cantidad de elementos en *cis* de respuesta a citoquina que los *loci* de *Prunus avium* y *Prunus persica*. En cuanto a los elementos *cis*-regulatorios, el *locus* de *Arabidopsis*, presenta elementos en *cis* de respuesta a giberelina y a ácido abscísico, este último también presente en el *locus* para *Prunus persica*. El *locus* de *Prunus avium* no presenta elementos *cis* regulatorios a giberelina ni a ácido abscísico. De forma similar se observa para los *loci* de *GIS3* en las tres especies, presentando un único exón. Todos presentan elementos en *cis* de respuesta a citoquinina, pero sólo los *loci* de *Arabidopsis* como de *Prunus persica* presentan elementos *cis* regulatorios giberelina y ácido abscísico.

En la **Figura 3B** se presenta la estructura genómica de los *loci* que codifican para las proteínas relacionadas con plegamiento de proteínas SHD y NRP2 de *Arabidopsis*, y de sus posibles *loci* en *Prunus avium* y *Prunus persica*. Para *SHD*, la estructura se encuentra muy conservada en las tres especies con 15 exones y 14 intrones. Hay elementos en *cis* de

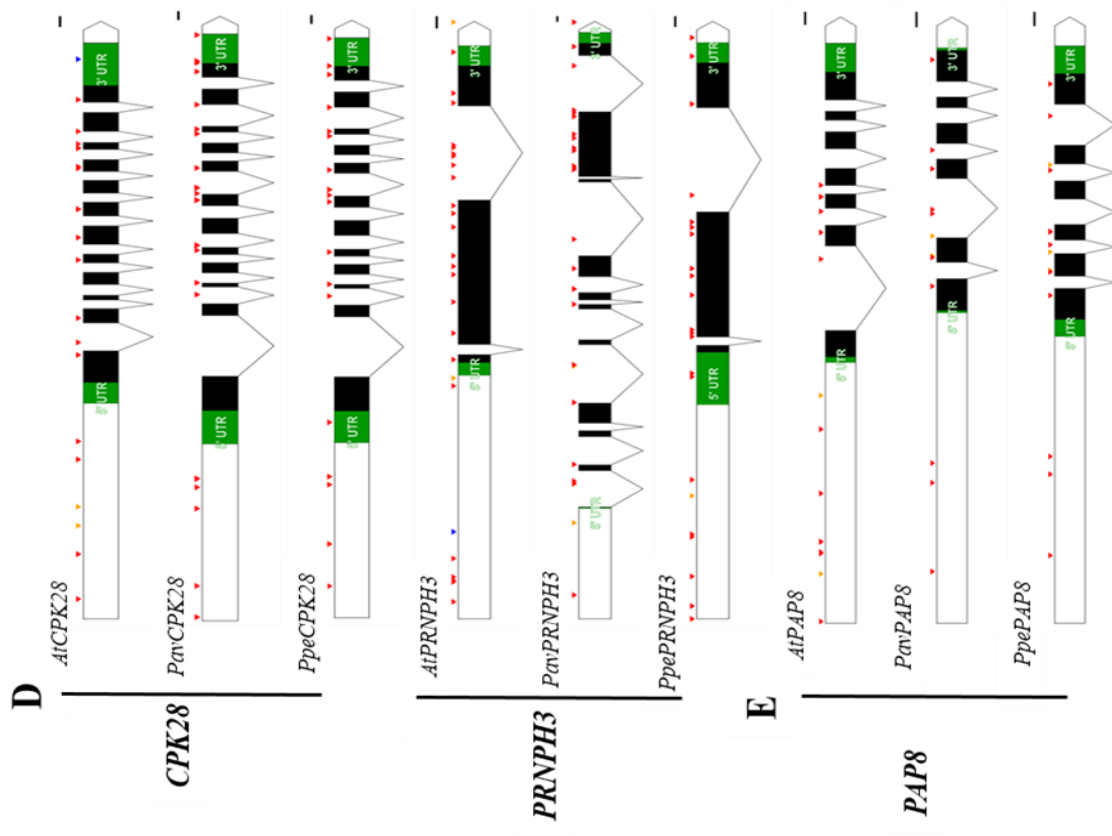
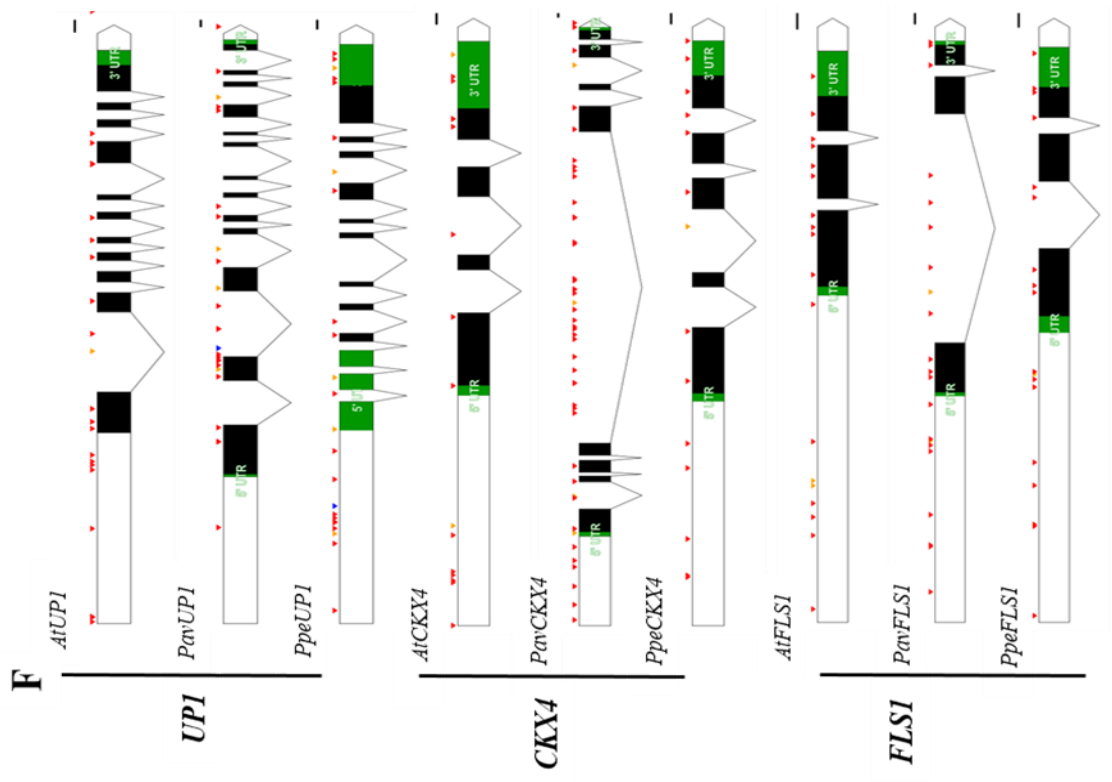
respuesta a citoquinina y giberelina en todos los *loci*, y hay un elemento de respuesta a ácido abscísico sólo en el *locus* de *Arabidopsis*. Para *NRP2* también se observa una estructura muy conservada entre las tres especies, con 10 exones y 9 intrones, presentando en todos elementos en *cis* de respuesta a citoquinina y giberelina. Sólo el *locus* de *Prunus avium* presenta elementos de respuesta a ácido abscísico.

Por otra parte, en el *locus* que codifica para la proteína relacionada con respuesta a patógeno UP2 de *Arabidopsis*, y en sus posibles *loci* en *Prunus avium* y *Prunus persica* (**Figura 3C**), se observa que la estructura se encuentra muy conservada en las tres especies, con dos exones y un intrón. Además, en todos se presentan elementos *cis* regulatorios a citoquinina. Para cereza y durazno, hay conservación de elementos en *cis* de respuesta a ácido abscísico, que no se encuentra en *Arabidopsis*.

En la **figura 3D** se presenta la estructura genómica de los *loci* que codifican para las proteínas relacionadas con degradación de proteínas CPK28 y PRNPH3 de *Arabidopsis*, y de sus posibles *loci* en *Prunus avium* y *Prunus persica*. Para *CPK28*, la estructura genómica es bastante conservada entre las tres especies, presentando 12 exones y 11 intrones. Además, poseen elementos en *cis* de respuesta a citoquinina, y sólo el *locus* de *Arabidopsis* presenta elementos en *cis* de respuesta ácido giberélico y ácido abscísico. Por otra parte, en los modelos para *PRNPH3*, hay una conservación en la estructura genómica entre los *loci* de *Arabidopsis* y *Prunus persica*, que es distinta de *Prunus avium*. Los tres poseen elementos en *cis* de respuesta a citoquinina. También, los tres presentan elementos en *cis* de respuesta a giberelina, aunque se encuentran distribuidos de forma distinta en los tres *loci*. Sólo el de *Arabidopsis* presenta elementos en *cis* de respuesta a ácido abscísico.



**Figura 3. La estructura a nivel genómico de los 11 posibles ortólogos encontrados en *P. avium* y *P. persica* se encuentra conservada, y presentan elementos *cis*-regulatorios a citoquinina y otras fitohormonas.** En su mayoría, la estructura genómica de estos 11 posibles ortólogos encontrados en las 2 especies del género *Prunus* se encuentra conservada, y todos presentan elementos *cis*-regulatorios a la fitohormona citoquinina, tanto en la región promotora como en el cuerpo del gen y río debajo de este. También, vemos que en algunos de ellos se encuentran elementos en *cis* de respuesta a ácido abscísico y/o a giberelina. Estructura genómica de posibles genes que codifican para: **A.** Proteínas relacionadas con degradación de proteínas. **B.** Proteínas relacionadas con plegamiento de proteínas. **C.** Proteínas relacionadas con respuesta a patógeno. **D.** Proteínas relacionadas con degradación de proteínas. **E.** Proteínas relacionadas con asimilación de nutrientes. **F.** Proteínas relacionadas con metabolismo.



Por otra parte, en el *locus* que codifica para la proteína relacionada con asimilación de nutrientes PAP8 de *Arabidopsis*, y en los *loci* de sus posibles ortólogos en *Prunus avium* y *Prunus persica* (**Figura 3E**), se observa que la estructura se encuentra es más similar entre cereza y durazno, con un exón y un intrón menos que en el *locus* de *Arabidopsis*. En los *loci* de las tres especies se encuentran elementos *cis* regulatorios de respuesta a citoquinina y a giberelina.

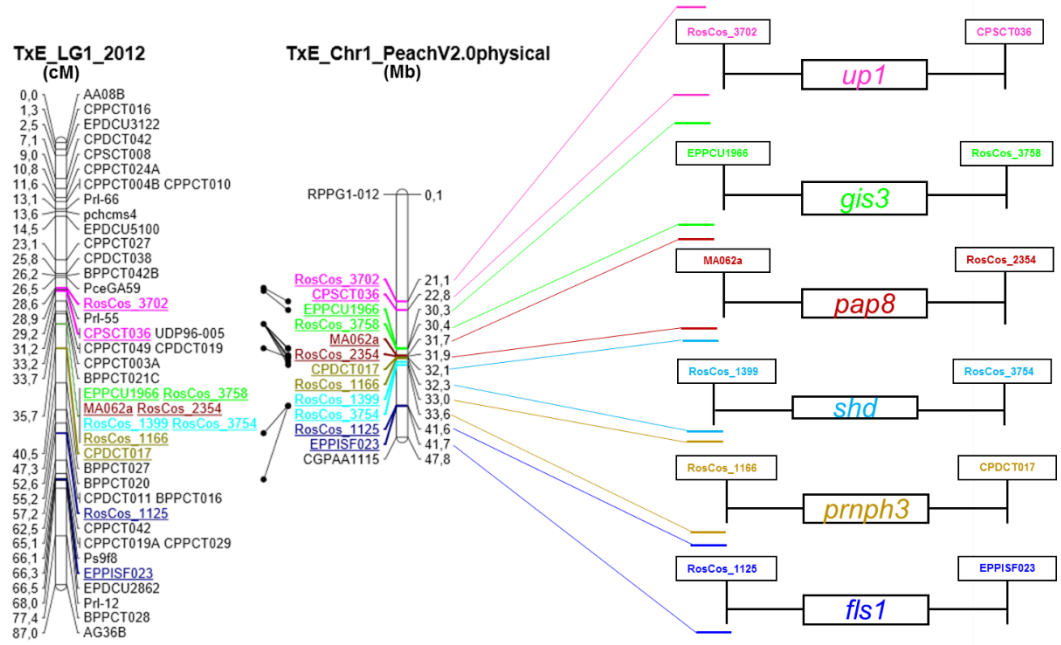
Finalmente, en la **Figura 3F** se presenta la estructura genómica de los *loci* que codifican para las proteínas relacionadas con metabolismo CKX4, FLS1 y UP1 de *Arabidopsis*, y de los *loci* de sus posibles ortólogos en *Prunus avium* y *Prunus persica*. Para *CKX4* la estructura genómica es más conservada entre *Arabidopsis* y *Prunus persica*, mientras que en *Prunus avium* presenta una estructura que es muy distinta. Todas presentan elementos *cis* de respuesta a citoquinina y giberelina, siendo mayor la cantidad para *Prunus avium*. Para *FLS1* se ve que la estructura se encuentra bastante conservada en las tres especies, con tres exones y dos intrones. En las tres se encontraron elementos *cis* regulatorios de respuesta a citoquinina. También, en *Arabidopsis* y en *Prunus avium*, hay elementos *cis* regulatorios de respuesta a giberelina. Para *UP2*, se ve que la estructura se encuentra bastante conservada en las tres especies, con dos exones y un intrón. En todos se encontraron elementos *cis* regulatorios de respuesta a citoquinina, y tanto en *Prunus avium* como en *Prunus persica* se encontraron elementos *cis* regulatorios a ácido abscísico.

### **1.3 Localización genética de los *loci* de los posibles ortólogos de durazno para el “top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis* en el mapa de ligamiento TxE.**

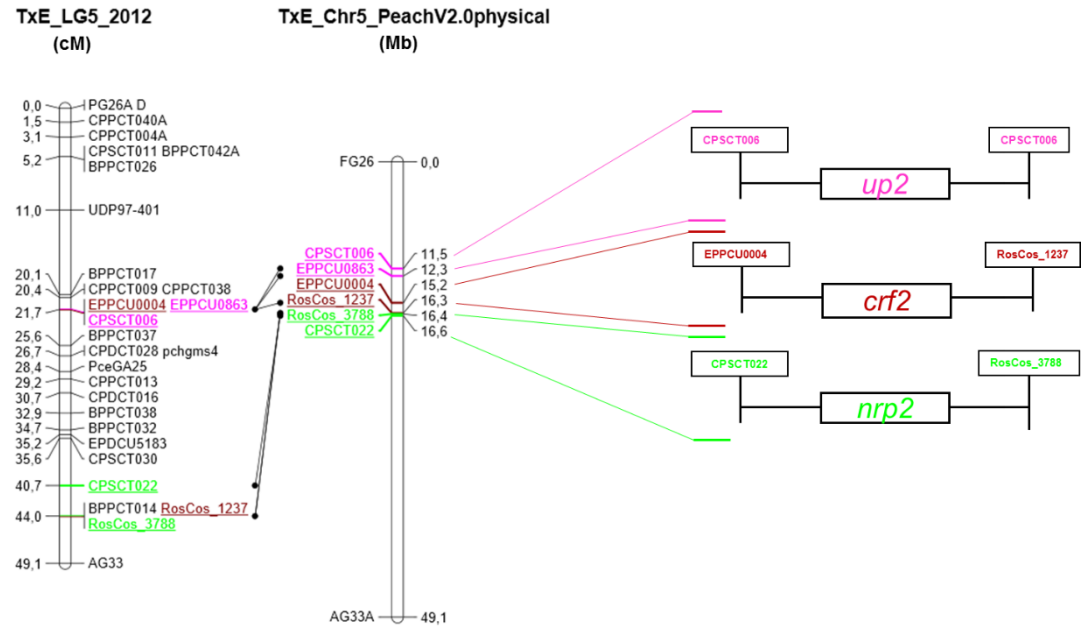
Para poder posicionar los posibles ortólogos en el mapa de ligamiento TxE (Kole y Abbott, 2012), se buscaron marcadores moleculares tipo SSR y SNP que flanqueasen los genes de estudio en el genoma de *Prunus persica* y que estuviesen en este mapa genético; de esta forma, estimar entre qué distancias genéticas se podrían encontrar estos genes. Debido a que cereza y durazno presentan un alto nivel de sintenia, y que información genómica y genética de durazno se ha utilizado en programas de mejoramiento de cereza, se utilizaron marcadores moleculares encontrados en durazno para el posicionamiento del conjunto de genes en estudio, a través de la información disponible en el genoma de durazno versión 2.1. Los resultados de esto se encuentran en las **Figuras 4A, 4B y 4C**. Los genes en estudio se encuentran en los grupos de ligamiento 1, 5 y 7. Hay 6 genes de interés en el grupo de ligamiento 1, tres en el grupo 5 y dos en el grupo 7. *PpeUP1*, *PpeFLS1*, *PpeUP2*, *PpeNRP2* y *PpeCKX4* se encuentran cercanos a QTLs previamente descritos en distintos mapas de ligamiento de especies del género *Prunus*, posicionados en el mapa TxE (**Tabla 4**) (Kole y Abbott, 2012). Además, *FLS1*, *UP2* y *NRP2* se encuentran cercanos a un QTL relacionado con *Ripening* (**Tabla 4**).



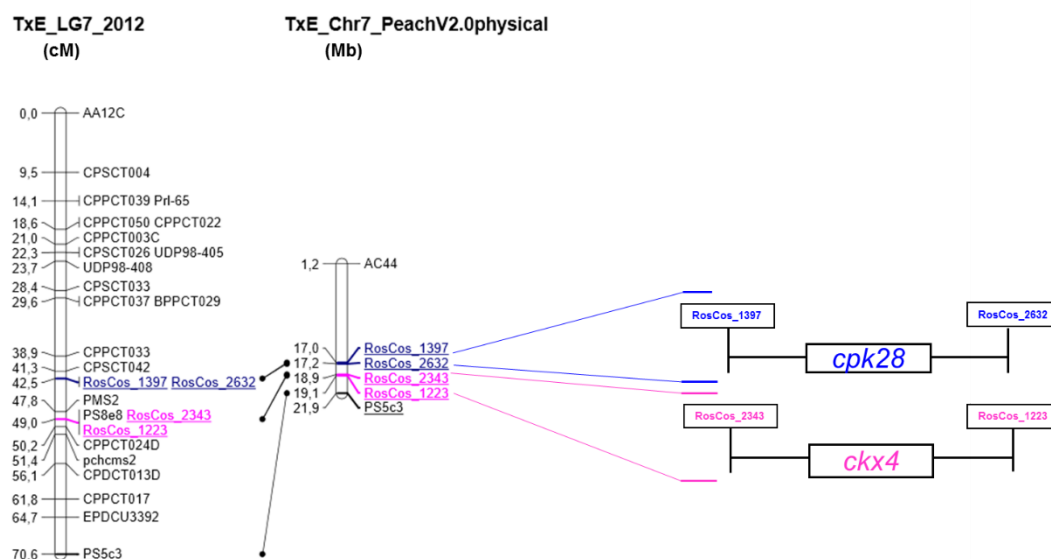
A



B



C



**Figura 4. Localización genética de los 11 posibles ortólogos de *Prunus persica* del “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis* en el mapa de ligamiento TxE.** Se muestra la localización genética del conjunto de genes en estudio en el mapa de ligamiento TxE descrito por Kole y Abbot (2012). La localización genética se realizó utilizando marcadores tipo *SSR* y *SNP*, que flanquean los genes de estudio. **A.** *UPI*, *GIS3*, *PAP8*, *SHD*, *PRNPH3* y *FLS1* se ubican en el grupo de ligamiento 1. **B.** *UP2*, *CRF2* y *NRP2* se ubican en el grupo de ligamiento 5. **C.** *CPK28* y *CKX4* se ubican en el grupo de ligamiento 7. A la izquierda se ubican los mapas de ligamiento, con las distancias genéticas en cM (centiMorgan). Al centro, los cromosomas con las distancias físicas en Mb (Megabases).

**Tabla 4.** QTLs posiblemente asociados a los posibles ortólogos del “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis*, compartidos entre *Prunus avium* y *Prunus persica*.

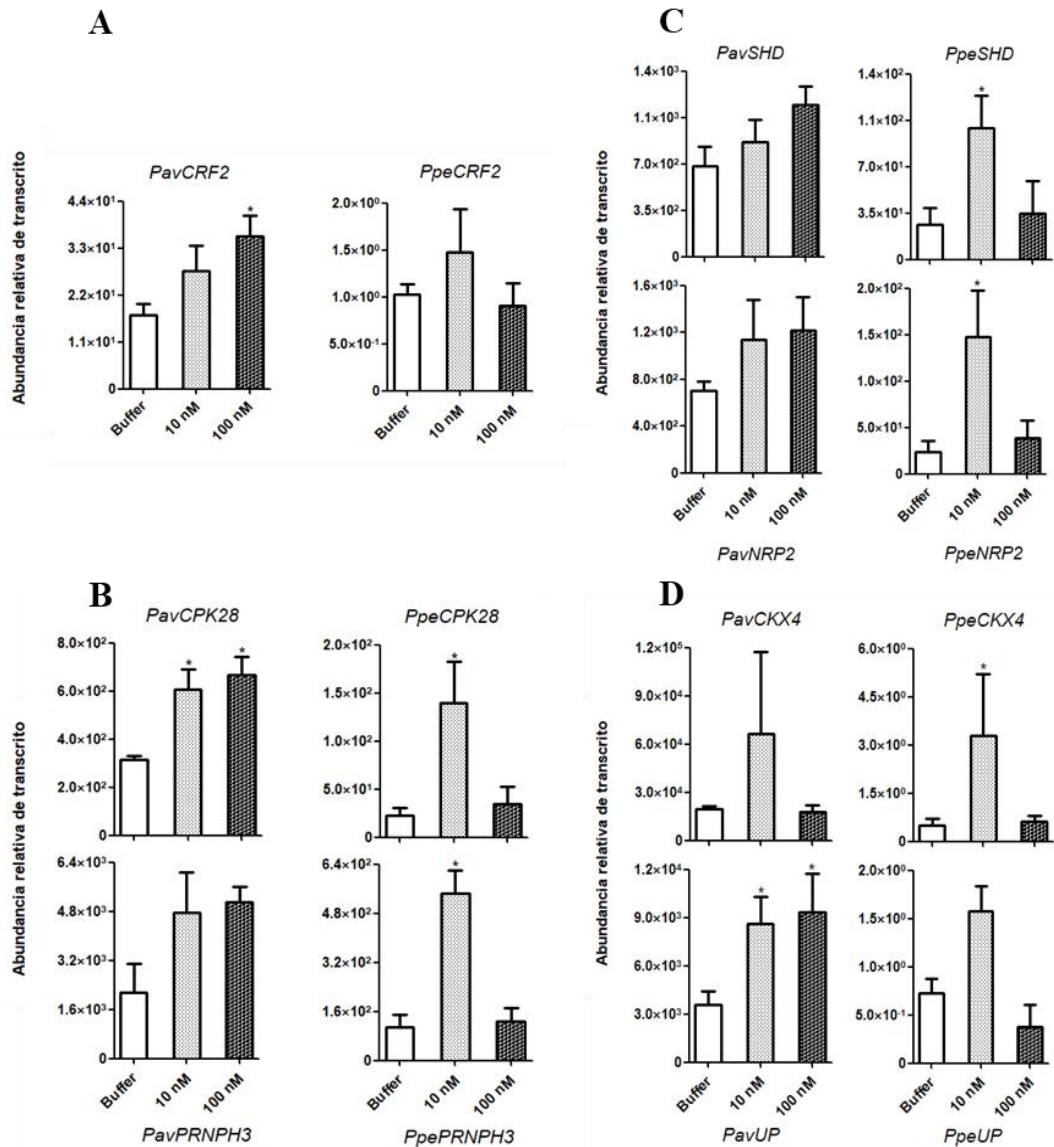
Gen	Grupo de ligamiento	Distancia genética estimada (cM)	QTL posiblemente asociado
<i>PpeUPI</i>	1	28.60 – 28.90	<i>Blooming date</i> <sup>1</sup>
<i>PpeGIS3</i>	1	35.70	-
<i>PpePAP8</i>	1	35.70	-
<i>PpeSHD</i>	1	35.70	-
<i>PpePRNPH3</i>	1	35.70 – 40.50	-
<i>PpeFLS1</i>	1	57.20 – 66.30	<i>Blooming date</i> <sup>2</sup> / <i>Chilling requirement</i> <sup>2</sup> / <i>Ripening</i> <sup>1</sup>
<i>PpeUP2</i>	5	21.70	<i>Blooming date</i> <sup>3</sup> / <i>Chilling requirement</i> <sup>3</sup> / <i>Ripening</i> <sup>1</sup>
<i>PpeCRF2</i>	5	21.70 – 44.00	-
<i>PpeNRP2</i>	5	40.70 – 44.00	<i>Blooming date</i> <sup>3</sup> / <i>Chilling requirement</i> <sup>3</sup> / <i>Ripening</i> <sup>1</sup>
<i>PpeCPK28</i>	7	42.50	-
<i>PpeCKX4</i>	7	49.00	<i>Blooming date</i> <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fan y cols, 2010; <sup>2</sup>Olukolu y cols., 2009; <sup>3</sup>Dirlewanger y cols, 2009.

**2. Análisis de los efectos de la aplicación exógena de citoquinina sobre el perfil de expresión de los posibles ortólogos en cereza y durazno para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” en frutos de *Prunus avium* y *Prunus persica*.**

Para realizar un análisis de expresión mediante RT-qPCR es necesario contar con un gen de referencia, el cual en nuestro caso debía presentar mínimas variaciones de expresión frente al tratamiento con citoquinina exógena en ambas especies. En el desarrollo de esta tesis, se utilizó el gen *Ubq10* que codifica para la proteína Poliubiquitina 10 (UBQ10), el cuál ha sido descrito previamente como un gen de referencia tanto para durazno como para cereza (Ye y cols., 2015). Para cada tratamiento (Control, 10 nM o 100 nM) se utilizaron 3 réplicas biológicas, provenientes de 3 árboles de *Prunus avium* var. Lapins y de 3 árboles de *Prunus persica* var. September sun. La amplificación por RT-qPCR de cada muestra se realizó en duplicado técnico. Los datos fueron graficados como abundancia relativa a *Ubq10* de transcrito de cada gen en los distintos tratamientos. La abundancia relativa corresponde al valor entregado por la ecuación de dCt (Livak y Schmittgen, 2008), la cual considera al gen de interés contra el gen de referencia.

Los resultados obtenidos mediante las reacciones de RT-qPCR muestran que, para cereza, en su mayoría existe un patrón de aumento en la abundancia relativa de transcrito de los diferentes genes tanto a 10 nM como a 100 nM de *trans*-zeatina, exceptuando el gen *PavCKX4* el cuál no presenta diferencia ni tendencia al tratamiento de 100 nM de *trans*-zeatina. Para el factor de transcripción *PavCRF2* (**Figura 5A**) hay un aumento significativo en la abundancia relativa de transcrito al tratamiento de 100 nM respecto del



**Figura 5.** Los posibles ortólogos en *Prunus avium* y *Prunus persica* para el “Top 25 de genes inducidos inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis* cambian su expresión frente al tratamiento de citoquinina exógena en frutos maduros de cerezo y durazno. Abundancia relativa de transcrito de: **A.** Posible factor de transcripción *CRF2* en Cereza (*PavCRF2*) y Durazno (*PpeCRF2*) en respuesta a citoquinina exógena. **B.** Posibles genes relacionados con degradación de proteínas en Cereza (*PavCPK28* y *PavPRNPH3*) y Durazno (*PpeCPK28* y *PpePRNPH3*) en respuesta a citoquinina exógena. **C.** Posibles genes relacionados con plegamiento de proteínas en Cereza (*PavSHD* y *PavNRP2*) y Durazno (*PpeSHD* y *PpeNRP2*) en respuesta a citoquinina exógena. **D.** Posibles genes relacionados con metabolismo en Cereza (*PavCKX4* y *PavUP*) y Durazno (*PpeCKX4* y *PpeUP*) en respuesta a citoquinina exógena. La abundancia de transcrito fue medida por RT-qPCR y es relativa al gen de referencia *UBQ10* de cada especie. La información mostrada corresponde al promedio entre 3 réplicas biológicas (n=3). Las columnas representan el promedio ± barra SEM. Los asteriscos (\*) indican que la abundancia relativa de transcrito en respuesta al tratamiento es estadísticamente diferente en comparación con su respectivo *buffer*, p-value<0.05.

tratamiento control, confirmando que este gen es inducible a altas concentraciones de citoquinina en frutos de cerezo. Para los genes relacionados con degradación de proteínas *PavCPK28* y *PavPRNPH3* (**Figura 5B**), hay una tendencia al aumento en la abundancia relativa de transcrito con ambas concentraciones de *trans*-zeatina, siendo en *PavCPK28* estadísticamente diferente con ambas. Para los genes relacionados con plegamiento de proteínas *PavSHD* y *PavNRP2* (**Figura 5C**), existe una tendencia al aumento en la abundancia relativa de transcrito a ambas concentraciones de *trans*-zeatina en frutos de cerezo, pero no existen diferencias estadísticamente significativas. Finalmente, para los genes relacionados con metabolismo *PavCKX4* y *PavUPI* (**Figura 5D**), hay diferencias estadísticas sólo para el gen *PavUPI* a ambas concentraciones de *trans*-zeatina en frutos de cerezo, mientras que para *PavCKX4* se observa una tendencia al aumento sólo al tratamiento con 10 nM de citoquinina.

Por otra parte, los resultados obtenidos muestran que, para durazno, existe un patrón de aumento en la abundancia relativa de transcrito de los diferentes genes a 10 nM de *trans*-zeatina, pero no hay tendencia alguna al tratamiento con 100 nM de *trans*-zeatina. Para el factor de transcripción *PpeCRF2* (**Figura 5A**), hay una tendencia (pero no estadísticamente significativa) al aumento en la abundancia relativa de transcrito al tratamiento de 10 nM de *trans*-zeatina. Para los genes relacionados con degradación de proteínas *PpeCPK28* y *PpePRNPH3* (**Figura 5B**) hay un aumento en la abundancia relativa de transcrito en respuesta a 10 nM de *trans*-zeatina con diferencias estadísticas en ambos casos, y no se observa diferencias a 100 nM de *trans*-zeatina. Para los genes relacionados con plegamiento de proteínas *PpeSHD* y *PpeNRP2* (**Figura 5C**) hay un

patrón similar al descrito para los genes anteriores. Existe un aumento en la abundancia relativa de transcrito en respuesta a 10 nM de *trans*-zeatina, con diferencias estadísticas para ambos genes, mientras que al tratamiento de 100 nM de *trans*-zeatina no se observa diferencias con el tratamiento control. Finalmente, para los genes relacionados con metabolismo *PpeCKX4* y *PpeUPI* (**Figura 5D**) se observa una tendencia al aumento en la abundancia relativa de transcrito al tratamiento con 10 nM de *trans*-zeatina, la cual presenta diferencias estadísticas sólo en el gen *PpeCKX4*, y en ambos casos no hay diferencias estadísticas al tratamiento con 100 nM de *trans*-zeatina.

## DISCUSION

### 1.1 Identificación de posibles ortólogos para el “top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis* en *Prunus avium* y *Prunus persica*.

Se encontraron en la base de datos de secuencias codificantes (CDS) de *Prunus avium* y *Prunus persica* 11 secuencias que presentaron un alto porcentaje de identidad para los genes de *Arabidopsis thaliana* anotados como *SHD*, *CRF2*, *CKX4*, *CPK28*, *NRP2*, *GIS3*, *PAP8*, *FLS1*, *PRNPH3* y 2 genes codificantes para proteínas de función desconocida *UP1* y *UP2*. Las secuencias identificadas para estos genes se muestran en la **Tabla 1**, donde se filtró para todas que el porcentaje de identidad arrojado por el BLAST realizado fuese mayor al 70%, en ambas direcciones. En otras especies vegetales como arroz, maíz, tomate y álamo también se han descrito ortólogos de genes involucrados en la respuesta a citoquinina (Ito y Kurata, 2006; Fernandes y cols., 2009; Tsai y cols., 2012; Shi y cols., 2013; Raines y cols., 2016; Immanem y cols., 2013). También existen disponibles secuencias de posibles ortólogos *in silico* de genes de respuesta a citoquinina en diversas especies de plantas (<http://www.phytozome.net>), las cuáles poseen los dominios característicos de estos tipos de familias génicas. Para el caso de álamo y durazno, se evidenció la presencia de más de un ortólogo para genes involucrados en la señalización en respuesta a citoquinina (Immanem y cols., 2013). Estas evidencias sugieren la duplicación génica de esta familia de genes de forma evolutiva entre las especies. Caso similar ocurre con los genes analizados en el desarrollo de esta tesis, donde en varios casos algunos genes poseían varios posibles ortólogos basados en el porcentaje de identidad (mayor a 70%), pero dado que se realizó un blast bidireccional seleccionamos sólo el

mejor resultado en ambas direcciones dejando fuera otras secuencias, aunque cabe mencionar que estas podrían tener mejor porcentaje de identidad con otro gen de la familia génica (y ser posibles parálogos).

En las secuencias identificadas como posibles ortólogos para *CRF2* en *Prunus avium* y *Prunus persica*, se encontró el dominio AP2/ERF característico de esta familia génica descrita en *Arabidopsis thaliana*. Los CRFs se encuentran cercanamente relacionados a los miembros de la familia génica AP2 de *Arabidopsis* y median una gran parte de la respuesta transcripcional a citoquinina, superponiéndose funcionalmente con los ARR de tipo B (Rashotte y cols, 2006). Ambas secuencias presentaron los residuos de Arg y Trp conservados, responsables de la interacción con la hebra de ADN (Allen y cols., 1998).

De la misma forma para *GIS3*, en las secuencias identificadas en *Prunus avium* y *Prunus persica*, se encontró el dominio C2H2/C2HC *zinc fingers* característico de esta proteína. Las proteínas que presentan este dominio pertenecen a una extensa familia génica descrita en *Arabidopsis*, en donde algunos se encuentran asociados con el metabolismo de ARN, remodelación de cromatina, y en su gran mayoría en *Arabidopsis* se ha sugerido o descrito por participar en regulación transcripcional (Englbrecht y cols., 2004). En particular, *GIS*, *GIS2*, y *GIS3* han sido descritos como factores de transcripción pertenecientes a la familia de proteínas C2H2 *zinc fingers* las cuáles regulan la formación de tricomas en las inflorescencias, a través de la señalización de giberelina y citoquinina (Sun y cols., 2014). En ambas secuencias, tanto en cereza como en durazno se encontró el motivo QALGGH característico de esta familia génica (Englbrecht y cols., 2004). Además, presentaron un alto porcentaje de identidad con las secuencias de *GIS3* de *Arabidopsis*.



En las secuencias identificadas como posibles ortólogos para *CPK28* en *Prunus avium* y *Prunus persica*, se encontraron los dominios Quinasa y *EF-hand* característicos de esta familia de proteínas. Las proteínas CPKs, son mediadores de respuesta de diversos estímulos endógenos y ambientales, y lo hacen uniendo  $\text{Ca}^{+2}$ , estimulando su actividad quinasa y así iniciar o continuar la cascada de fosforilaciones (Cheng y cols., 2002). En *Arabidopsis* se ha descrito que estas proteínas presentan en su mayoría cuatro dominios *EF-hand* capaces de unir  $\text{Ca}^{+2}$ . En ambas secuencias, tanto de cereza como de durazno, se encontraron cuatro dominios *EF-hand* con el residuo de glicina conservado descrito previamente y presentando un alto porcentaje de identidad con la secuencia de *Arabidopsis* (Cheng y cols., 2002).

Estos resultados fueron consistentes con lo encontrado previamente para las secuencias aminoacídicas de CRF2, GIS3 y CPK28. En las secuencias aminoacídicas de PRNPH3, SHD, NRP2, CKX4, FLS1, PAP8, UP1 y UP2, identificadas en *Prunus avium* y *Prunus persica*, se encontraron los dominios característicos para cada familia de proteínas: los dominios BTB/POZ y NPH3 para PRNPH3 (Pedmale y Liscum, 2007); el dominio HSP90 para SHD (Krishna y Gloor, 2001); el dominio NAP para NRP2 (Park y Luger, 2006); el dominio FAD oxidasa de unión a citoquinina para CKX4 (Schmülling y cols., 2003); los dominios Nod-hem dioxigenasa y oxoglutarato/hierro dependientes para FLS1 (Winkel y cols., 2008); el dominio fosfatasa metal-dependiente para PAP8 (Li y cols., 2002); el dominio aceto-acetato decarboxilasa para UP1; y el dominio tipo LURP-one para UP2.

## **1.2 Estructura genómica de los posibles ortólogos para el “top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis* en *Prunus avium* y *Prunus persica*.**

Para proporcionar evidencia sobre la regulación de los posibles ortólogos del conjunto de genes en estudio en *Prunus avium* y *Prunus persica*, se estudió la conservación a nivel de la estructura genómica de éstos según la información disponible en los genomas respectivos de cada especie, incluyendo *Arabidopsis* por ser la referencia desde dónde fueron encontrados estos.

Previamente se ha descrito que los reguladores de respuesta tipo B, los cuales pertenecen a la familia de proteínas MYB, son reguladores de respuesta positivos que inducen la expresión génica, y de esta forma se encuentran modulando la vía de respuesta a citoquinina. Éstos, se unen a la doble hebra de ADN identificando motivos *cis*-regulatorios presentes en esta (Bhargava y cols., 2013). En este trabajo se identificó que todos poseían estos elementos *cis*-regulatorios a citoquinina en su estructura, tanto en la región promotora, intrones y exones. Hoy en día sabemos que no sólo la región promotora es importante para inducir la expresión génica; en el contexto celular son diversos los factores que podrían estar afectando la inducción/represión de un gen, como por ejemplo la condensación y des condensación de la cromatina (Lauria y Rossi, 2011). Como se indica en la **Figura 3**, los elementos *cis*-regulatorios a citoquinina se encuentran a lo largo de toda la estructura de los genes, con lo cual podrían estar ayudando a la expresión no sólo a través de la región promotora sino también en la des-condensación de la hebra y permitir así la transcripción. Además, existen algunos genes que presentan elementos *cis*-regulatorios a otras fitohormonas, como ácido giberélico y ácido abscísico. Estos

hallazgos son relevantes, dado que tanto citoquinina como giberelina se han estudiado en conjunto ampliamente en diversas especies, debido a que su aplicación exógena en estas produce cambios fisiológicos similares, especialmente en frutales (Hoad y cols., 1992). Un *crossstalk* entre estas hormonas ha sido descrito en *Arabidopsis*, donde la giberelina estaría reprimiendo la expresión de *ARR1* (regulador de respuesta a citoquinina) mediante la degradación de la proteína RGA, la cual promueve la expresión de este regulador de respuesta (Moubayidin y cols., 2010). Además, dentro del conjunto de genes estudiados se encuentra *GIS3*, el cual ha sido previamente descrito no sólo en respuesta a citoquinina sino también a giberelina (Sun y cols., 2014). Esta información sugiere que el conjunto de genes estudiados en este trabajo podrían ser potenciales genes de *crossstalk* entre estas hormonas. Por otra parte, encontrar elementos en *cis*-regulatorios de distintas hormonas sugiere que la inducción de estos genes podría estar mediada por más de alguno de estos reguladores de crecimiento, complejizando así la vía de respuesta a estas hormonas.

En la sección anterior se mostró el perfil de expresión de siete posibles ortólogos del “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis* en frutos maduros de cereza y durazno al ser tratados con citoquinina exógena. Se observó que la respuesta de estos posibles ortólogos varía entre cereza y durazno, y no siempre se ve una inducción al tratamiento con citoquinina, como se describe en la planta modelo *Arabidopsis*. En esta sección analizamos los distintos *loci* a nivel de estructura genómica para evaluar posibles conservaciones y/o divergencias entre las especies que puedan dar indicios de las diferencias observadas. Se encontraron elementos en *cis* regulatorios a citoquinina a lo largo de las estructuras de los genes en las distintas especies, pero también de otras

fitohormonas como el ácido giberélico y el ácido abscísico, sugiriendo que la expresión de estos genes podría estar siendo inducida no sólo por citoquinina sino también por otras fitohormonas, explicando así las diferencias encontradas en estos 2 frutales frente al tratamiento con citoquinina exógena, respecto de lo descrito previamente en la planta modelo.

### **1.3 Localización genética de los *loci* de los posibles ortólogos de durazno para el “top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis* en el mapa de ligamiento TxE.**

En programas de mejoramiento de especies vegetales (*plant breeding*), los mapas de ligamiento con marcadores moleculares en cortos intervalos de distancia genética (mapas saturados), son la principal herramienta que se ocupan con este fin. El mapa de ligamiento TxE corresponde a un mapa genético elaborado de cruces entre almendra y durazno, el cuál es usado como referencia para las especies de la familia Rosaceae, en especial especies del género *Prunus*. La co-segregación de estos marcadores moleculares con caracteres de importancia agronómica permite la detección de QTLs, responsables de las variaciones fenotípicas observadas. En este trabajo se buscaron marcadores moleculares tipo *SSR* y *SNP* en el genoma de *Prunus persica*, que flanqueasen los genes de estudio para posicionarlos en el mapa genético TxE. De acuerdo con los mapas genéticos realizados para cereza, la estructura del genoma de cereza se ha predicho ser similar a la del genoma de durazno, implicando que el orden de los marcadores es conservado entre estas dos especies (Guajardo y cols., 2015). Además, información genómica de durazno, así como de otras especies de la familia Rosaceae, han sido utilizadas para programas de

mejoramiento en cereza (Illa y cols., 2011). Es por esto por lo que el conjunto de genes de interés fue posicionado en el mapa de ligamiento TxE a través de marcadores moleculares encontrados en el genoma de *Prunus persica*, gracias al alto nivel de sintenia entre estas 2 especies (Jung y cols., 2009; Arús y cols., 2010).

Una vez posicionados los genes en el mapa genético TxE (Kole y Abbot, 2012), se encontró que 5 cinco de ellos se localizan en regiones donde previamente se habían descrito QTLs de interés comercial (**Tabla 4**). Estos QTLs provienen de diferentes cruzamientos entre especies del género *Prunus* y fueron llevados hasta el mapa de ligamiento TxE utilizando marcadores moleculares en común (Kole y Abbott, 2012). En particular, *PpeFLS1*, *PpeUP2* y *PpeNRP2*, se encuentran en regiones de QTLs relacionados con *Ripening*. En la introducción de este seminario de título se mencionaron varios trabajos donde la aplicación exógena de citoquinina era capaz de modificar parámetros fisiológicos en el desarrollo de diversos frutales, en algunos de ellos se modificaba el proceso de maduración y alteraba ciertos índices de este, mostrando su relación con el proceso de maduración de los frutos. Resulta interesante entonces que posibles genes modulados por la fitohormona citoquinina se encuentren en regiones asociadas a QTLs de *Ripening*.

**2. Análisis de los efectos de la aplicación exógena de citoquinina sobre el perfil de expresión de los posibles ortólogos en cereza y durazno para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” en frutos de *Prunus avium* y *Prunus persica*.**

De los 11 genes en estudio, se midieron siete de ellos, de los cuáles tres responden al tratamiento con *trans*-zeatina en *Prunus avium* var. Lapins (*PavCRF2*, *PavCPK28* y *PavUPI*) y cinco al tratamiento con *trans*-zeatina en *Prunus persica* var. September sun (*PpeCPK28*, *PpePRNPH3*, *PpeSHD*, *PpeNRP2* y *PpeCKX4*) (**Figura 5**). En general, del conjunto de genes estudiados, tanto en cereza como en durazno presentan una tendencia al inducir su expresión al tratamiento de 10 nM de *trans*-zeatina, y tres y cinco de ellos presentan diferencias estadísticas en cereza y durazno respectivamente. Estos resultados podrían hacerse más robustos aumentando el número de réplicas biológicas, debido a que el análisis estadístico ocupado (test no paramétrico) es más estricto al analizar las diferencias de los resultados entre muestras (Karlen y cols., 2007; Goni y cols., 2009). Un mayor número de réplicas ayudaría a aumentar las diferencias estadísticas si estas réplicas se comportan similares a la tendencia observada en estos resultados. Por otra parte, al tratamiento a 100 nM de *trans*-zeatina, en cereza existe una tendencia al aumentar la abundancia relativa de transcrito de estos genes (*PavCRF2*, *PavCPK28* y *PavUPI*), mientras que en durazno no se observa esto. Esto podría deberse a que en durazno existe una inhibición en la expresión de estos genes mediada por citoquininas en frutos de *Prunus persica*, lo que es concordante con el modelo de señalización de respuesta a citoquinina descrito en *Arabidopsis thaliana*, donde existe una retroalimentación negativa mediada por ARRs tipo A (To y Kieber, 2007). Resultados similares se han obtenido en durazno

previamente, donde los genes codificantes para las proteínas RR1 y RR6 de durazno aumentan su expresión a tratamientos de 10 nM de *trans*-zeatina, pero disminuyen al tratamiento de 100 nM (Avendaño, 2011). También, se ha descrito para genes en respuesta a citoquinina en *Arabidopsis* que se produce una disminución en la expresión de estos genes con 1  $\mu$ M de *trans*-zeatina en comparación a plantas control (Kiba y cols., 1999; Sakai y cols., 2001). Es interesante que en cereza este patrón no se observe. Un caso particular es el gen codificante para la proteína CKX4 el cual presenta un patrón similar de expresión tanto en cereza (**PavCKX4**) como en durazno (**PpeCKX4**), con una alta variabilidad al tratamiento de 10 nM (**Figura 5D**). Esto se puede deber a que al ser un gen relacionado con la degradación de las citoquininas, su presencia/ausencia sea muy sensible al tratamiento, y de esta forma el momento en el cuál las muestras fueron tratadas y guardadas debe ser lo más exacto posible, siendo crítico para obtener mejores resultados.

Los genes en cereza cuya abundancia relativa de transcrito presentan diferencias estadísticas al tratamiento respecto del grupo control corresponden a *PavCRF2*, *PavCPK28* y *PavUPI1*. Los dos primeros genes se encuentran involucrados en vía de respuesta a etileno, y como se presentó en los resultados de este trabajo, también en respuesta a citoquinina, aunque se vinculan de forma distinta. La familia de CRFs son factores de transcripción que permiten un *crosstalk* entre ambas vías, aunque su función aún no es bien dilucidada; si bien se les atribuye regular otros genes de respuesta a citoquinina que no son mediados por los ARR tipo B, también se cree que responden a etileno modificando la biosíntesis de esta hormona en *Arabidopsis* (Cary y cols., 1995). Por otra parte, *CPK28* es una proteína involucrada en la degradación de las proteínas

MATs (Metionina adenosil-transferasas), las cuáles son responsables de catalizar la formación de SAM (S-adenosil-metionina). SAM es un precursor en la biosíntesis de etileno, de esta forma *CPK28* afecta a la biosíntesis de etileno y la vía de respuesta río debajo de este en *Arabidopsis* (Jin y cols., 2017). Conforme esto, citoquinina estaría modulando la vía de respuesta a etileno en cereza mediante la inducción en la expresión de estos dos genes (*PavCRF2* y *PavCPK28*). Estos resultados son relevantes, debido a que cereza es un fruto no-climatérico y su proceso de maduración no se encuentra liderado por la fitohormona etileno. Sin embargo, como se presentó en este trabajo, los efectos que produce citoquinina los podría estar ejerciendo bajo estos genes que modulan la biosíntesis de etileno. Por otra parte, el gen codificante para una proteína de función desconocida *PavUPI* aumenta su expresión al tratamiento con citoquinina exógena en cereza. Si bien este gen no posee una función asociada, presenta una anotación GO relacionado con la síntesis de xantófilas, las cuáles son un tipo de carotenoides. De esta forma, citoquinina estaría modulando estos metabolitos secundarios en esta etapa del desarrollo del fruto.

Los genes en durazno cuya abundancia relativa de transcrito presentan diferencias estadísticas al tratamiento respecto del grupo control corresponden a *PpeCPK28*, *PpePRNPH3*, *PpeNRP2*, *PpeCKX4* y *PpeUPI*. Como ha sido mencionado, *CPK28* afecta negativamente la biosíntesis de etileno, lo cual en un fruto climatérico como el durazno puede afectar el proceso de maduración y retrasarlo, lo que es concordante con los datos presentes en este laboratorio (Meisel, datos no publicados). Al igual que en cereza, *PpeUPI* aumenta su expresión al tratamiento de citoquinina, potencialmente modulando la síntesis de metabolitos secundarios. A diferencia de lo que sucede en cereza,



*PpePRNPH3*, un gen involucrado en los mecanismos de respuesta a luz, aumenta su expresión. *PpeNRP2*, el cuál es un gen relacionado con el plegamiento de histonas, ha sido vinculado con modular potencialmente mecanismo de expresión génica mediante la condensación y des condensación de la cromatina, de esta forma citoquinina podría estar afectando otras vías de respuesta mediante la expresión de este gen. También, a diferencia de lo obtenido en cereza, *PpeCKX4* aumenta su expresión con lo cual en este fruto citoquinina estaría auto-regulando sus niveles mediante la degradación de sí misma, como se ha visto en trabajos previos (Avendaño, 2011).

De los 11 genes estudiados, cuatro de ellos no fueron incluidos en el análisis. Esto, debido a que dos de ellos (*UP2* y *FLS1*) no presentaron amplificación tanto en frutos de cerezo como de durazno, no siendo detectados; y otros dos (*PAP8* y *GIS3*) en la curva de *melting* habían diversos *peaks*, con lo cual se infiere que los partidores están generando distintos amplicones en las muestras (**Figuras 9 y 10 del material suplementario**). En el primer caso, esto se puede deber a que los niveles de transcrito para esta isoforma de la enzima son muy bajos en las muestras o bien no estén presentes en las muestras analizadas (tanto en cereza como en durazno). También se puede deber a que los partidores diseñados (en base a los genomas de durazno y cereza) no amplifiquen en las variedades estudiadas en este trabajo (September sun y Lapins, respectivamente). En el segundo caso, donde en las curvas de *melting* se pueden ver distintos *peaks*, se infiere que podrían haber amplificado diferentes amplicones. Esto puede deberse a que los partidores fuesen inespecíficos y pudiesen estar amplificando más de un amplicón. También, que los partidores formasen dímeros, aunque fueron diseñados evitando complementariedad entre ellos.

A partir de estos resultados obtenidos en este trabajo se elaboró una tabla resumen mostrando los genes que estarían induciendo su expresión frente al tratamiento exógeno de citoquinina en frutos de cereza var. Lapins y frutos de durazno var. September sun:

**Tabla 5.** Resumen de los genes que estarían induciendo su expresión al tratamiento exógeno de citoquinina en frutos de *Prunus avium* y *Prunus persica* en proceso de maduración. ↑ indica que induce su expresión al tratamiento. “ns” indica que no existen diferencias estadísticas significativas.

Gen	Cereza 10 nM	Cereza 100 nM	Durazno 10 nM	Durazno 100 nM
<i>CRF2</i>	ns	↑	ns	ns
<i>CPK28</i>	↑	↑	↑	ns
<i>PRNPH3</i>	ns	ns	↑	ns
<i>SHD</i>	ns	ns	↑	ns
<i>NRP2</i>	ns	ns	↑	ns
<i>CKX4</i>	ns	ns	↑	ns
<i>UPI</i>	↑	↑	ns	ns

## CONCLUSIONES

1. Hay 12 posibles ortólogos para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis* en *Prunus avium*: *PavSHD*, *PavCRF2*, *PavCKX4*, *PavCPK28*, *PavNRP2*, *PavGIS3*, *PavPAP8*, *PavFLS1*, *PavPRNPH3*, *PavUPI*, *PavUP2* y *PavCYP81F*
2. Hay 13 posibles ortólogos para el “Top 25 de genes inducidos por citoquinina” de *Arabidopsis* en *Prunus persica*: *PpeSHD*, *PpeCRF2*, *PpeCKX4*, *PpeCPK28*, *PpeNRP2*, *PpeGIS3*, *PpePAP8*, *PpeFLS1*, *PpePRNPH3*, *PpeUPI*, *PpeUP2*, *PpeARR6* y *PpeARR8*.
3. La aplicación exógena de citoquinina en frutos maduros de cereza induce la expresión génica de *PavCRF2*, *PavCPK28* y *PavUPI*.
4. La aplicación exógena de citoquinina en frutos maduros de durazno induce la expresión génica de *PpeCPK28*, *PpePRNPH3*, *PpeNRP2*, *PpeCKX4* y *PpeUPI*.
5. Estos análisis sugieren que citoquinina modula la expresión génica de estos genes en una manera especie específica, mostrando genes que presentan una expresión conservada entre estas especies (*CPK28* y *UPI*), y genes que presentan una expresión que difiere entre estas especies (*PRNPH3*, *NRP2* y *CKX4*).
6. Los *loci* de estos posibles ortólogos mostraron conservaciones y divergencias en la estructura intron-exon y de elementos en *cis* de respuesta a citoquinina, giberelina y ácido abscísico, sugiriendo que podrían estar potencialmente modulados no sólo por citoquinina.
7. Los *loci* de *PpeFLS1*, *PpeUP2* y *PpeNRP2* se encuentran cercanos a un QTL relacionado con *Ripening*, sugiriendo que podrían estar involucrados en este proceso.

## REFERENCIAS

- Allen, M. D., Yamasaki, K., Ohme-Takagi, M., Tateno, M., y Suzuki, M. 1998. A novel mode of DNA recognition by a  $\beta$ -sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *The EMBO Journal*. **17**: 5484–5496.
- Arnau, J. A., Tadeo, F. R., Guerri, J., y Primo-Millo, E. 1999. Cytokinins in peach: Endogenous levels during early fruit development. *Plant Physiol. and Biochem.* **37**: 741–750.
- Arús, P., Yamamoto, T., Dirlwanger, E., y Abbott, A. G. 2010. Synteny in the Rosaceae. In *Plant Breeding Reviews*, pp. 175–211. John Wiley & Sons, Inc.
- Avendaño, C. 2011. Identificación de *PpRR1* en *Prunus persica*, un gen ortólogo de *ARR1* involucrado en la vía de transducción de señales en respuesta a citoquinina (Tesis de Magister). Universidad Andrés Bello, Chile.
- Bhargava, A., Clabaugh, I., To, J. P., Maxwell, B. B., Chiang, Y.-H., Schaller, G. E., Kieber, J. J. 2013. Identification of cytokinin-responsive genes using microarray meta-analysis and RNA-seq in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **162**: 272–294.
- Bonghi, C., Trainotti, L., Botton, A., Tadiello, A., Rasori, A., Ziliotto, F., Ramina, A. 2011. A microarray approach to identify genes involved in seed-pericarp cross-talk and development in peach. *BMC Plant Biology*, **11**: 107.
- Brenner, W. G., y Schmölling, T. 2015. Summarizing and exploring data of a decade of cytokinin-related transcriptomics. *Frontiers in Plant Science*, **6**.
- Burg, S. P., & Burg, E. A. 1962. Role of ethylene in fruit ripening. *Plant Physiol.* **37**: 179–189.
- Cary, A. J., Liu, W., y Howell, S. H. 1995. Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol.* **107**: 1075–1082.
- Cheng, S. H. 2002. Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol.* **129**: 469–485.
- Coombe, B. 1976. The development of fleshy fruits. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **27**: 507–528.
- Connors, C.H., 1919. Growth of fruits of peach. *N. J. Agric. Exp. Stn. Annu. Rep.* **40**: 82–88.

- Crane, J. 1964. Growth substances in fruit setting and development. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **15**: 303–326.
- Englbrecht, C. C., Schoof, H., y Böhm, S. 2004. *BMC Genomics.* **5**: 39.
- Famiani, F., Proietti, P., Pilli, M., Battistelli, A., y Moscatello, S. 2007. Effects of application of thidiazuron (TDZ), gibberellic acid (GA3), and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on fruit size and quality of *Actinidia deliciosa* 'Hayward'. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science.* **35**: 341–347.
- Fernandes, J., Tavares, S., y Amâncio, S. 2009. Identification and expression of cytokinin signaling and meristem identity genes in sulfur deficient grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Signal. Behav.* **4**: 1128 – 1135.
- Goni, R., Garcia, P., y Foissac S. 2009. The qPCR data statistical analysis. Integromics White Paper.
- Guajardo, V., Solís, S., Sagredo, B., Gainza, F., Muñoz, C., Gasic, K., y Hinrichsen, P. 2015. Construction of high density sweet cherry (*Prunus avium* L.) linkage maps using microsatellite markers and SNPs detected by genotyping-by-sequencing (GBS). *Plos One.* **10**.
- Hoad, G. V. 1992. Plant growth substances 1988. Edited by R. P. Pharis and S. P. Rood. Berlin: Springer-Verlag, (1990), pp. 657, DM178, ISBN 3-540-50870-0. *Experimental Agriculture*, 28(1), 126.
- Hwang, I., y Sheen, J. 2001. Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature.* **413**: 383–389.
- Immanen, J., Nieminen, K., Duchens Silva, H., Rodríguez Rojas, F., Meisel, L. A., Silva, H., y Helariutta, Y. 2013. Characterization of cytokinin signaling and homeostasis gene families in two hardwood tree species: *Populus trichocarpa* and *Prunus persica*. *BMC Genomics.* **14**: 885.
- Ito, Y. y Kurata, N. 2006. Identification and characterization of cytokinin-signalling gene families in rice. *Gene.* **382**: 57 – 65.
- Illa, E., Sargent, D. J., Girona, E. L., Bushakra, J., Cestaro, A., Crowhurst, R., y Troggio, M. 2011. Comparative analysis of rosaceous genomes and the reconstruction of a putative ancestral genome for the family. *BMC Evolutionary Biology.* **11**.
- Iwahori, S., Tominaga, S., y Yamasaki, T. 1988. Stimulation of fruit growth of kiwifruit, *Actinidia chinensis* Planch. by N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea, a diphenylurea-derivative cytokinin. *Scientia Horticulturae.* **35**: 109–115.

- Jaakola, L., Pirttilä, A. M., Halonen, M., y Hohtola, A. 2001. Isolation of high quality RNA from Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Fruit. *Molecular Biotechnology*. **19**: 201–204.
- Jin, Y., Ye, N., Zhu, F., Li, H., Wang, J., Jiang, L., y Zhang, J. 2017. Calcium-dependent protein kinase CPK28 targets the methionine adenosyltransferases for degradation by the 26S proteasome and affects ethylene biosynthesis and lignin deposition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. **90**: 304–318.
- Jung, S., Jiwan, D., Cho, I., Lee, T., Abbott, A., Sosinski, B., y Main, D. 2009. Synteny of *Prunus* and other model plant species. *BMC Genomics*, **10**: 76.
- Karlen, Y., McNair, A., Perseguers, S., Mazza, C., y Mermoud, N. 2007. Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*. **8**: 131.
- Kiba, T. Taniguchi, M. Imamura, A. Ueguchi, C. Mizuno, T. y Sugiyama, T. 1999. Differential expression of genes for response regulators in response to cytokinins and nitrate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. **40**: 767 – 771.
- Kole, C. (Ed.), y Abbott, A. (Ed.). 2012. *Genetics, Genomics and Breeding of Stone Fruits*. Boca Raton: CRC Press.
- Krishna, P., y Gloor, G. 2001. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress and Chaperones*. **6**: 238–246.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., y Higgins, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. **23**: 2947–2948.
- Lauria, M., y Rossi, V. 2011. Epigenetic control of gene regulation in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. **1809**, 369–378.
- Letham, D. S. 1967. Regulators of cell division in plant tissues. *Planta*, **74**. 228–242.
- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. **25**: 402–408.
- McAtee, P., Karim, S., Schaffer, R., y David, K. 2013. A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation, and ripening. *Frontiers in Plant Science*, **4**.
- Meisel, L. Fonseca, B. González, S. Baeza-Yates, R. Cambiazo, V. Campos, R, Gonzalez, M. Orellana, A. Retamales, J. Silva, H. (2005). A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomics analyses. *Biol. Res*. **38**: 83 – 88.

- Moubayidin, L., Perilli, S., Dello Ioio, R., Di Mambro, R., Costantino, P., & Sabatini, S. (2010). The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root meristem growth phase. *Current Biology*. **20**: 1138–1143.
- Mujica, K. 2016. Expresión diferencial de genes en respuesta a citoquinina exógena, en distintos estados del desarrollo de durazno (Tesis de Magister). Universidad Andrés Bello, Chile.
- Nickell, L.G. 1986. The effect of N-(2-chloro-4-piridyl)-N-phenylurea and 3-chlorobencyl ester of dicamba on the growth and sugar content of grape. *Acta Hort.* **179**: 805-806.
- Ogata, R., Saito, T., y Oshima, K. 1989. Effect of n-phenyl-n'-(4-pyridyl)urea (4-pu) on fruit size: apple japanese pear, grapevine and kiwi fruit. *Acta Horticulturae*, **239**: 395–398.
- Owens, D. K., Alerding, A. B., Crosby, K. C., Bandara, A. B., Westwood, J. H., y Winkel, B. S. J. 2008. Functional analysis of a predicted flavonol synthase gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **147**: 1046–1061.
- Pedmale, U. V., y Liscum, E. (2007). Regulation of Phototropic Signaling in *Arabidopsis* via Phosphorylation State Changes in the Phototropin 1-interacting Protein NPH3. *Journal of Biological Chemistry*. **282**: 19992–20001.
- Raines, T., Blakley, I. C., Tsai, Y.-C., Worthen, J. M., Franco-Zorrilla, J. M., Solano, R., y Kieber, J. J. 2016. Characterization of the cytokinin-responsive transcriptome in rice. *BMC Plant Biology*. **16**.
- Rashotte, A. M., Mason, M. G., Hutchison, C. E., Ferreira, F. J., Schaller, G. E., y Kieber, J. J. 2006. A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **103**: 11081–11085.
- Retamales, J. B., Lobos, G. A., Romero, S., Godoy, R., y Moggia, C. 2014. Repeated applications of CPPU on highbush blueberry cv. Duke increase yield and enhance fruit quality at harvest and during postharvest. *Chilean Journal of Agricultural Research*. **74**: 157–161.
- Sakai, H., Aoyama, T., y Oka, A. 2000. *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant J.* **24**:703-711.
- Sakai, H. Honma, T. Aoyama, T. Sato, S. Kato, T. Tabata, S. y Oka, A. 2001. *Arabidopsis* ARR1 is a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science*, **294**: 1519 – 1521.

- Scorza, R., May, L., Purnell, B., y Upchurch, B. 1991. Differences in number and area of mesocarp cells between small and large fruited peach cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **116**: 861–864.
- Shi, X., Gupta, S., Lindquist, I. E., Cameron, C. T., Mudge, J., y Rashotte, A. M. 2013. Transcriptome analysis of cytokinin response in tomato leaves. *Plos One*, **8**.
- Shirasawa, K., Isuzugawa, K., Ikenaga, M., Saito, Y., Yamamoto, T., Hirakawa, H., y Isobe, S. 2017. The genome sequence of sweet cherry (*Prunus avium*) for use in genomics-assisted breeding. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes.* **24**: 499–508.
- Schmülling, T., Schäfer, S. y Romanov, G. 1997. Cytokinins as regulators of gene expression. *Physiol. Plant.* **100**: 505–519.
- Schmülling, T., Werner, T., Riefler, M., Krupková, E., y Bartrina y Manns, I. 2003. Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research.* **116**: 241–252.
- Staden, J., y Davey, J. E. 1979. The synthesis, transport and metabolism of endogenous cytokinins. *Plant, Cell and Environment.* **2**: 93–106.
- Stern, R. A., Ben-Arie, R., Neria, O., y Flaishman, M. 2003. CPPU and BA increase fruit size of “Royal Gala” (*Malus domestica*) apple in a warm climate. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology.* **78**: 297–302.
- Sun, L., Zhang, A., Zhou, Z., Zhao, Y., Yan, A., Bao, S., Gan, Y. (2014). Glabrous inflorescence stems 3 (GIS3) regulates trichome initiation and development in *Arabidopsis*. *New Phytologist.* **206**: 220–230.
- Teribia, N., Tijero, V., y Munné-Bosch, S. 2016. Linking hormonal profiles with variations in sugar and anthocyanin contents during the natural development and ripening of sweet cherries. *New Biotechnology.* **33**: 824–833.
- To, J. P. C., y Kieber, J. J. y 2008y. Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends in Plant Science.* **13**: 85–92.
- Tonutti P, Bonghi C, Ruperti B, Tornielli GB, y Ramina A. 1997. Ethylene evolution and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene expression during early development and ripening of peach fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science.* **122**: 642–647.



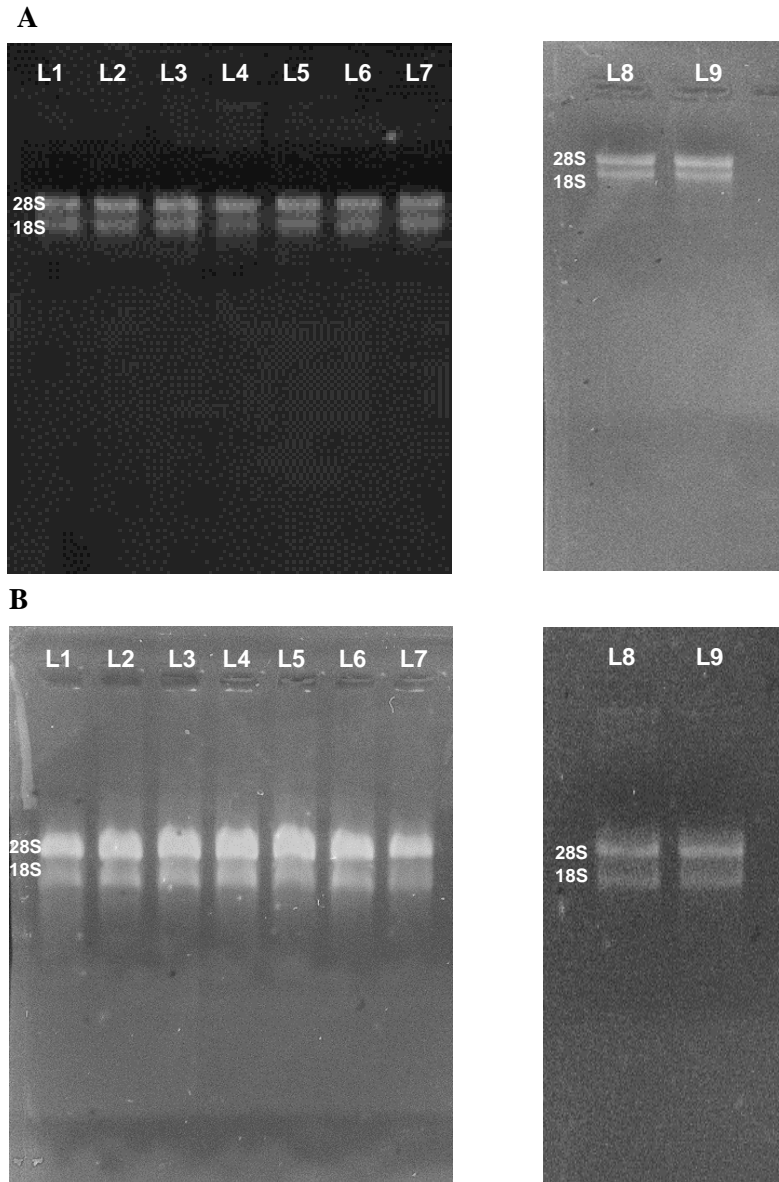
Tsai, Y.-C., Weir, N. R., Hill, K., Zhang, W., Kim, H. J., Shiu, S.-H., y Kieber, J. J. (2012). Characterization of genes involved in cytokinin signaling and metabolism from rice. *Plant Physiol.* **158**: 1666–1684.

Werner, T., y Schmülling, T. 2009. Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology.* **12**: 527–538.

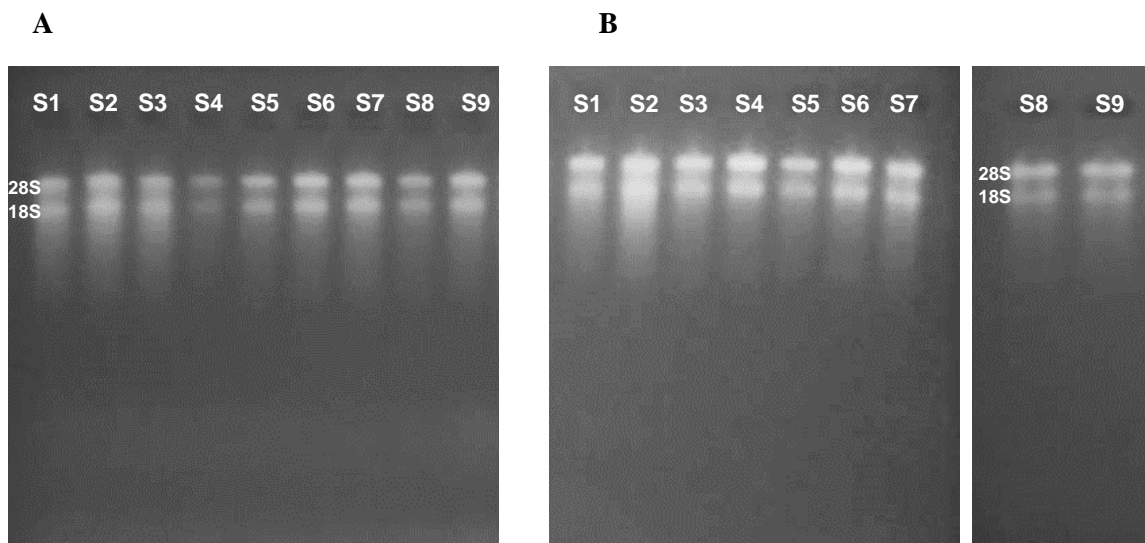
Ye, X., Zhang, F., Tao, Y., Song, S., y Fang, J. 2015. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in different cherry genotypes, developmental stages and organs. *Scientia Horticulturae.* **181**: 182–188.

Zhang, C., y Whiting, M. 2013. Plant growth regulators improve sweet cherry fruit quality without reducing endocarp growth. *Scientia Horticulturae.* **150**: 73–79.

## MATERIAL SUPLEMENTARIO

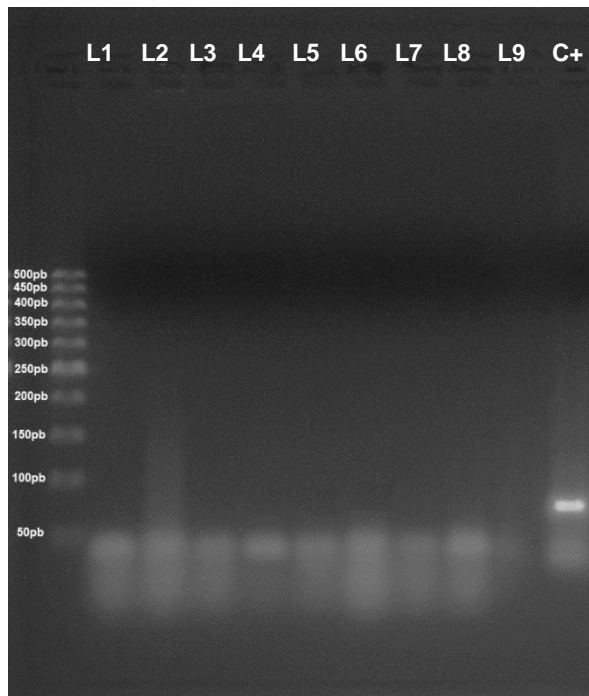


**Figura Suplementaria 1. Electroforesis en gel de agarosa 1,2% para bandas de ARNr 28S y 18S, de las muestras de frutos de cerezo variedad Lapins, antes y post-digestión enzimática con DNAsa. A.** Integridad del RNA extraído desde las nueve muestras de cerezo variedad Lapins, previo a la digestión enzimática con DNAsa. **B.** Integridad del ARN extraído desde las nueve muestras de cerezo variedad Lapins, post-digestión enzimática con DNAsa. La integridad, en ambos casos, se evalúa por la visualización de las bandas rRNA 28S (banda superior, doble en intensidad) y 18S (banda inferior). **L1:** Árbol 1, buffer; **L2:** Árbol 1, 10 nM; **L3:** Árbol 1, 100 nM; **L4:** Árbol 2, buffer; **L5:** Árbol 2, 10 nM; **L6:** Árbol 2, 100 nM; **L7:** Árbol 3, buffer; **L8:** Árbol 3, 10 nM; **L9:** Árbol 3, 100 nM.



**Figura Suplementaria 2. Electroforesis en gel de agarosa 1,2% para bandas de ARNr 28S y 18S, de las muestras de frutos de durazno variedad September sun, antes y post-digestión enzimática con ADNasa.**

**A.** Integridad del ARN extraído desde las nueve muestras de durazno variedad September sun, previo a la digestión enzimática con ADNasa. **B.** Integridad del ARNA extraído desde las nueve muestras de durazno variedad September sun, post-digestión enzimática con ADNasa. La integridad, en ambos casos, se evalúa por la visualización de las bandas ARNr 28S (banda superior, doble en intensidad) y 18S (banda inferior). **S1:** Árbol 1, buffer; **S2:** Árbol 1, 10 nM; **S3:** Árbol 1, 100 nM; **S4:** Árbol 2, buffer; **S5:** Árbol 2, 10 nM; **S6:** Árbol 2, 100 nM; **S7:** Árbol 3, buffer; **S8:** Árbol 3, 10 nM; **S9:** Árbol 3, 100 nM.



**Figura Suplementaria 3. Electroforesis en gel de agarosa 2% para productos de PCR convencional de muestras de ARN, extraídas de frutos de cerezo, digeridas enzimáticamente con ADNasa. Se utilizaron partidores específicos para amplificar el gen *TEF2* (amplicón 128pb), con el fin de verificar que no hubiese trazas de ADN en las muestras de ARN tratadas con ADNasa *Turbo*. L1: Árbol 1, buffer; L2: Árbol 1, 10 nM; L3: Árbol 1, 100 nM; L4: Árbol 2, buffer; L5: Árbol 2, 10 nM; L6: Árbol 2, 100 nM; L7: Árbol 3, buffer; L8: Árbol 3, 10 nM; L9: Árbol 3, 100 nM. C+: ADNg cereza.**



**Figura Suplementaria 4. Electroforesis en gel de agarosa 2% para productos de PCR convencional de muestras de ADNc de frutos de durazno.** Se utilizaron partidores específicos para amplificar el gen *PRNPH3* en muestras de ADNc de frutos de durazno (amplicón 174pb), el cual en ADN genómico amplifica además un intrón (292pb), con el fin de verificar que no hubiese trazas de ADN en las muestras de ADNc de frutos de durazno. **S1:** Árbol 1, buffer; **S2:** Árbol 1, 10 nM; **S3:** Árbol 1, 100 nM; **S4:** Árbol 2, buffer; **S5:** Árbol 2, 10 nM; **S6:** Árbol 2, 100 nM; **S7:** Árbol 3, buffer; **S8:** Árbol 3, 10 nM; **S9:** Árbol 3, 100 nM; **C+:** ADNg Durazno.

A

Dominio Quinasa

ATCPK13 YLHDLRELCGRGFGVYVCTEHRSSRDLLACKSISRRKRIKRTAVDIEDVKREVAIMKHDPKSSIVLQKACEDDNVAHVLVMELCGGELFDRIAR---GHYERAAAQVVKTIIVE
ATCPK14 YKLGRELGRGFGVYVCTEIEFGELIACKSLRKRKIKTSIDIEDVKREVAIMRQMPHEPNIVLREKVEDKAVHVLVMELCGGELFDRIAR---GHYERAAAQVVKTIIE
ATCPK15 YHLGRELGRGFGVYVCTEHRNSPCNTVACKSLRKRKIKTKQDIDDVKREIQIMQVLSGGQENIVLREKAYEDRQSHVLVMELCGGELFDRIAR---GHYERAAAQVVKTIIE
ATCPK18 YLIGKRLGCGGFGVYVADNNDNRRVAVRRDRAKQTPQVEVDVKREYVHQALGCHENNVGFFHNAEDKTYLYIVLMELCGGELFDRIARKKD--SRVREKDAAVVRRQMLK
ATCPK19 YSLGRELGRGFGVYVCTEIESSKRNAGSLRKRKIKRTAQEDVDKREIQIMQVLSGGQENIVLREKAYEDRQSHVLVMELCGGELFDRIAR---GHYERAAAQVVKTIIE
ATCPK21 YSLGRELGRGFGVYVCTEIEPCNTVACKSLRKRKIKSKQDKEDVKREIQIMQVLSGGQENIVLREKAYEDRQSHVLVMELCGGELFDRIAR---GHYERAAAQVVKTIIE
ATCPK23 YSLGRELGRGFGVYVCTEIEGPNIVACKSLRKRKILSELGREDVKREIQIMQVLSGGQENIVLREKAYEDRQSHVLVMELCGGELFDRIAR---GHYERAAAQVVKTIIE
ATCPK27 YSLGRELGRGFGVYVCTEIEGPNIVACKSLRKRKILKDECEEDVKREIQIMQVLSGGQENIVLREKAYEDRQSHVLVMELCGGELFDRIARLYDVGKSVSRKAAAGTIKSTVD
PPECCK28 YLIGKRLGCGGFGVYVADNNDNRRVAVRRDRAKQTPQVEVDVKREYVHQALGCHENNVGFFHNAEDKTYLYIVLMELCGGELFDRIARKKD--SRVREKDAAVVRRQMLK
PAVCPK28 YLIGKRLGCGGFGVYVADNNDNRRVAVRRDRAKQTPQVEVDVKREYVHQALGCHENNVGFFHNAEDKTYLYIVLMELCGGELFDRIARKKD--SRVREKDAAVVRRQMLK
ATCPK29 YLIGKRLGCGGFGVYVADNNDNRRVAVRRDRAKQTPQVEVDVKREYVHQALGCHENNVGFFHNAEDKTYLYIVLMELCGGELFDRIARKKD--SRVREKDAAVVRRQMLK
ATCPK30 YLIGKRLGCGGFGVYVADNNDNRRVAVRRDRAKQTPQVEVDVKREYVHQALGCHENNVGFFHNAEDKTYLYIVLMELCGGELFDRIARKKD--SRVREKDAAVVRRQMLK
ATCPK33 YLISLRELGRGFGVYVCTEIEGPNIVACKSLRKRKILVTKQDKEDVKREIQIMQVLSGGQENIVLREKAYEDKAVHVLVMELCGGELFDRIAR---GHYERAAAQVVKTIIE

ATCPK13 VVQICRKHGVHRDLKPENFLANRKE--NSPLKATDFGLSVEFGKPKGKPEIVGSGVYVAPVLRKRYGPEIDINSAGVILYILLCGVPPFWAETSQVQAQILRQVIDPKRREDFW
ATCPK14 VVQICRKHGVHRDLKPENFLANRKE--TASPKATDFGLSVEFGKPKGKPEIVGSGVYVAPVLRKRYGPEIDINSAGVILYILLCGVPPFWAETSQVQAQILRQVIDPKRREDFW
ATCPK15 VVQICRKHGVHRDLKPENFLANRKE--NAMKATDFGLSVEFGKPKGKPEIVGSGVYVAPVLRKRYGPEIDINSAGVILYILLCGVPPFWAETSQVQAQILRQVIDPKRREDFW
ATCPK18 VVQICRKHGVHRDLKPENFLANRKE--EGSSPKATDFGLSVEFGKPKGKPEIVGSGVYVAPVLRKRYGPEIDINSAGVILYILLCGVPPFWAETSQVQAQILRQVIDPKRREDFW
ATCPK19 VVQICRKHGVHRDLKPENFLANRKE--DASSPKATDFGLSVEFGKPKGKPEIVGSGVYVAPVLRKRYGPEIDINSAGVILYILLCGVPPFWAETSQVQAQILRQVIDPKRREDFW
ATCPK21 VVQICRKHGVHRDLKPENFLANRKE--NAMKATDFGLSVEFGKPKGKPEIVGSGVYVAPVLRKRYGPEIDINSAGVILYILLCGVPPFWAETSQVQAQILRQVIDPKRREDFW
ATCPK23 VVQICRKHGVHRDLKPENFLANRKE--NATVWVDFGLSVEFGKPKGKPEIVGSGVYVAPVLRKRYGPEIDINSAGVILYILLCGVPPFWAETSQVQAQILRQVIDPKRREDFW
PPECCK28 VVQICRKHGVHRDLKPENFLANRKE--ALDPLKATDFGLSVEFGKPKGKPEIVGSGVYVAPVLRKRYGPEIDINSAGVILYILLCGVPPFWAETSQVQAQILRQVIDPKRREDFW
PAVCPK28 VVQICRKHGVHRDLKPENFLANRKE--ALDPLKATDFGLSVEFGKPKGKPEIVGSGVYVAPVLRKRYGPEIDINSAGVILYILLCGVPPFWAETSQVQAQILRQVIDPKRREDFW
ATCPK29 VVQICRKHGVHRDLKPENFLANRKE--NSALPKATDFGLSVEFGKPKGKPEIVGSGVYVAPVLRKRYGPEIDINSAGVILYILLCGVPPFWAETSQVQAQILRQVIDPKRREDFW
ATCPK30 VVQICRKHGVHRDLKPENFLANRKE--NSALPKATDFGLSVEFGKPKGKPEIVGSGVYVAPVLRKRYGPEIDINSAGVILYILLCGVPPFWAETSQVQAQILRQVIDPKRREDFW
ATCPK33 VVQICRKHGVHRDLKPENFLANRKE--KALPKATDFGLSVEFGKPKGKPEIVGSGVYVAPVLRKRYGPEIDINSAGVILYILLCGVPPFWAETSQVQAQILRQVIDPKRREDFW

ATCPK13 PNISSAKDLVRKMLDPPDRRRLTAQOVLDFHPWI
ATCPK14 PKVSDNAKDLRKMILPDPDRRRLTAQOVLDFHPWI
ATCPK15 PNISSAKDLVRKMLDPPDRRRLTAQOVLDFHPWI
ATCPK18 PNISSAKDLVRKMLDPPDRRRLTAQOVLDFHPWI
ATCPK19 PNISSAKDLVRKMLDPPDRRRLTAQOVLDFHPWI
ATCPK21 PNISSAKDLVRKMLDPPDRRRLTAQOVLDFHPWI
ATCPK23 PNISSAKDLVRKMLDPPDRRRLTAQOVLDFHPWI
ATCPK27 PLRDSRAIHLVRKMLDRNPRRRESAAQVDFHPWI
PPECCK28 PNISSAKDLVRKMLDPPDRRRLTAQOVLDFHPWI
PAVCPK28 PNISSAKDLVRKMLDPPDRRRLTAQOVLDFHPWI
ATCPK29 PNISSAKDLVRKMLDPPDRRRLTAQOVLDFHPWI
ATCPK30 PNISSAKDLVRKMLDPPDRRRLTAQOVLDFHPWI
ATCPK33 PNISSAKDLVRKMLDPPDRRRLTAQOVLDFHPWI

Dominios EF-hand

ATCPK13 EVEDIKVYMNKMDQNDNCHVSISELKAGLRD-FST LAESEVQMLHEAVDNRKCKCHLDYGEFVAVSHELOKV
ATCPK14 ETSCKIEREQVMDSNRRKTIITELGIGLQK-LGI VPQDDIQILMDAGDVKDQYLDVNEFVAISVHRKRL
ATCPK15 EKKCKRMMANMDDRSGLTIYSELKNGIAK-LGS LPEAEVKQLMEADVDGNGCTDYEFPTATMHRYSF
ATCPK18 EDDDRDQDADIDKNGSIELEEMROALARDVPW LRDAVAEILQANDSNTDGLVDFEFVVAALHVHQL
ATCPK19 EKKCKRMMANMDDRSGLTIYSELKNGIAK-LGS LPEAEVKQLMEADVDGNGCTDYEFPTATMHRYSF
ATCPK21 EKKCKRMMANMDDRSGLTIYSELKNGIAK-LGS LPEAEVKQLMEADVDGNGCTDYEFPTATMHRYSF
ATCPK23 EKKCKRMMANMDDRSGLTIYSELKNGIAK-LGS LPEAEVKQLMEADVDGNGCTDYEFPTATMHRYSF
ATCPK27 EKKCKRMMANMDDRSGLTIYSELKNGIAK-LGS LPEAEVKQLMEADVDGNGCTDYEFPTATMHRYSF
PPECCK28 EESDLDQDQDADIDKNGSIELEEMROALARDVPW LRDSRVLEILEADNSNTDGLVDFEFVVAALHVHQL
PAVCPK28 EESDLDQDQDADIDKNGSIELEEMROALARDVPW LRDSRVLEILEADNSNTDGLVDFEFVVAALHVHQL
ATCPK29 EESDLDQDQDADIDKNGSIELEEMROALARDVPW LRDSRVLEILEADNSNTDGLVDFEFVVAALHVHQL
ATCPK30 EESDLDQDQDADIDKNGSIELEEMROALARDVPW LRDSRVLEILEADNSNTDGLVDFEFVVAALHVHQL
ATCPK33 EQCCKRMMANMDDRSGLTIYSELKNGIAK-LGS LPEAEVKQLMEADVDGNGCTDYEFPTATMHRYSF

ATCPK13 ----HLRKAFFFDKDGNGVITLPOELCDALKEGDCDDCDVDVA IFQEVDTDRKGRITSYEFAMMKKGTDW
ATCPK14 ----HLRKAFFFDKDGNGVITLPOELCDALKEGDCDDCDVDVA IILDVRDRKOKTISYEFAMMKKGTDW
ATCPK15 ----HVKAFQHFDDKDGNGVITLPOELCDALKEGDCDDCDVDVA VIALVDVTDNGRINVEFCAMMRSGITL
ATCPK18 KWQQRRAAFKFFDIDKCGEITPEELRLO----TCLRGSIL LLEBADIDKOKTISYEFAMMKKGTDW
ATCPK19 ----NLFKAFQHFDDKDGNGVITLPOELCDALKEGDCDDCDVDVA IISEVDADNGRINVEFCAMMRSGITL
ATCPK21 ----HVKAFQHFDDKDGNGVITLPOELCDALKEGDCDDCDVDVA VISEVDADNGRINVEFCAMMRSGITL
ATCPK23 ----HVKAFQHFDDKDGNGVITLPOELCDALKEGDCDDCDVDVA VISEVDADNGRINVEFCAMMRSGITL
ATCPK27 KWQQRRAAFKFFDIDKCGEITPEELRLO----TCLRGSIL LLEBADIDKOKTISYEFAMMKKGTDW
PAVCPK28 KWQQRRAAFKFFDIDKCGEITPEELRLO----TCLRGSIL LLEBADIDKOKTISYEFAMMKKGTDW
ATCPK29 KWQQRRAAFKFFDIDKCGEITPEELRLO----TCLRGSIL LLEBADIDKOKTISYEFAMMKKGTDW
ATCPK30 ----HVKAFQHFDDKDGNGVITLPOELCDALKEGDCDDCDVDVA IIMRVDTRKGRINVEFCAMMRSGITL
ATCPK33 ----NLFKAFQHFDDKDGNGVITLPOELCDALKEGDCDDCDVDVA IILSDVADNGRINVEFCAMMRSGITL

B

Dominio BTB/POZ

```

AT1603010 VCFQSNADGGSEAFELAAKFCY-CENFETLTHSNVVAIRCAACVLEMT
AT1605080 IELNDFPFGGDFELVSRFCYHNGETLIDVSNVSTLCCSVFLGMS
AT3608570 TELNDFPFGGKTFELAAKFCY-CENFETLTHSNVVAIRCAACVLEMT
AT3626490 IOLVDFPFGGETAFELCAKFCY-CETTLTLCARNVVAIRCAACVLEMT
AT3644820 TVLDFPFGGADNFIIVARFCY-CARVDITSKNDVSIICAAVLEMTN
AT5648800 VGLNDFPFGGAEAFELAAKFCY-CENFETLTHSNVVAIRCAACVLEMT
AT5667385 IELNDFPFGGDFELVSRFCYHNGETLIDVSNVSTLCCSVFLGMS
AT5664330 LIDLDLDFPFGGDFELVSRFCYHNGETLIDVSNVSTLCCSVFLGMS
ATPRNPH3 IELNDFPFGGDFELVSRFCYHNGETLIDVSNVSTLCCSVFLGMS
PAVPRNPH3 IELNDFPFGGDFELVSRFCYHNGETLIDVSNVSTLCCSVFLGMS
PFPRNPH3 IELNDFPFGGDFELVSRFCYHNGETLIDVSNVSTLCCSVFLGMS

```

Dominio familia NPH3

```

AT1603010 RGLRTRIGLQDGLDLPDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
AT1605080 RGLRTRIGLQDGLDLPDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
AT3608570 RGLRTRIGLQDGLDLPDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
AT3626490 RMLRTRIGLQDGLDLPDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
AT3644820 RGLRTRIGLQDGLDLPDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
AT5648800 RGLRTRIGLQDGLDLPDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
AT5667385 RGLRTRIGLQDGLDLPDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
AT5664330 RGLRTRIGLQDGLDLPDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
ATPRNPH3 RGLRTRIGLQDGLDLPDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
PAVPRNPH3 RGLRTRIGLQDGLDLPDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
PFPRNPH3 RGLRTRIGLQDGLDLPDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR

```

Figura Suplementaria 5. Los posibles genes que codifican para proteínas relacionadas con degradación de proteínas *PavCPK28*, *PpeCPK28*, *PavPRNPH3* y *PpePRNPH3* presentan los dominios característicos de las familias de CPK28 y NPH3 de *A. thaliana*. El alineamiento de los posibles ortólogos encontrados con miembros de las familias de CPK28 y NPH3 de *A. thaliana* mostró regiones altamente conservadas. A. Se muestra el alineamiento de los dominios quinasa y EF-hand característicos de las proteínas quinasa dependientes de calcio de *A. thaliana* (se muestran 10 de ellas), el cual se ve está altamente conservado en los posibles ortólogos encontrados en cereza y durazno, con el sitio de unión a ATP (caja amarilla), sitio activo de acción quinasa (caja azul) y sitios activos de unión a calcio (cajas rojas), con el conservado aminoácido de (\*). B. Se muestran los alineamientos de los dominios BTB/POZ y NPH3, característicos de las proteínas de la familia PRNPH3 de *A. thaliana* (se muestran 7 de ellas).

A

Dominio familia HSP90 tipo ATPasa N-terminal

```

ATHSP90-1 ADFPFOAEINQGLDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
ATHSP90-2 ADFPFOAEINQGLDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
ATHSP90-3 ADFPFOAEINQGLDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
ATHSP90-4 ADFPFOAEINQGLDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
ATHSP90-5 GDFPFOAEINQGLDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
ATHSP90-6 ADFPFOAEINQGLDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
ATHSP90-7 ADFPFOAEINQGLDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
ATHSHD ADFPFOAEINQGLDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
PAVSHD ADFPFOAEINQGLDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
PFPSHD ADFPFOAEINQGLDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR

```

Dominio familia HSP90 tipo ATPasa C-terminal

```

ATHSP90-1 LGRVTRIGLQDGLDLPDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
ATHSP90-2 LGRVTRIGLQDGLDLPDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
ATHSP90-3 LGRVTRIGLQDGLDLPDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
ATHSP90-4 LGRVTRIGLQDGLDLPDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
ATHSP90-5 LGRVTRIGLQDGLDLPDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
ATHSP90-6 LGRVTRIGLQDGLDLPDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
ATHSP90-7 LGRVTRIGLQDGLDLPDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
ATHSHD LGRVTRIGLQDGLDLPDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
PAVSHD LGRVTRIGLQDGLDLPDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR
PFPSHD LGRVTRIGLQDGLDLPDIPINLNGTNTNTVDGSLIFPSIENLDEDDREHHHQFDETEMIY---DFDSP---GSPKCS---ELKVRDPLALAIAGNPTTFALAPLPHARISGLYRAVDIYVHPKEDSR

```

B

Dominio familia NAP

```
ATNAP1-1 AAKKDDDRAGLVNAAKKNLONLAGQSDVLENLTPVRRKRVDAARDIQSQHDELEAKFRERAIHEAKYQTLYQPLVVKRYETVNGTTSVELAPEDDTKVDQGEKTAEE
ATNAP1-2 TAINEDDRAGLVNAAKKNLONLAGQSDVLENLTPVRRKRVDFREIQNQYDEMEAKFFERAALEAKYQKLYQPLVVKRYETVNGVVEGAAEE-VKSEQGEDKSAEE
ATNAP1-3 SAKKDDDRAGLVNAAKKNLONLAGQSDVLENLTPVRRRVEVREIQGKHDEEETFRFERAALEAKYQKLYQPLVVKRYETVNGATVEGAPED-AKMDQGEKTAEE
ATNAP1-4 TIPALDTCABECDLAA-ELKNMILKRFDFVVKLSPVTRKRVLPKDIQVTHDELEERFLAEKSALEATYDNLVYKPLFAKRYETVNGVVEAE-----AAK
ATNRP1 KRSRHEKGGSENL-----DQDAEIVSSEKIQEIQDDERKNSASDEVVEE-QKYVIRKRVYDKRNDI-----
ATNRP2 KKAKEE-----ENV-----DQDAEIVSSEKIQEIQDDERKNSASDEVVEE-QKYVIRKRVYDKRNDI-----
PPENRP2 KKLKLSERAEADDNS-----DHIIEKLVISEKIQEIQDDERKNSASDEVVEE-QKYVIRKRVYDKRNDI-----
PAVNRP2 KKLKLSERAEADDNS-----DHIIEKLVISEKIQEIQDDERKNSASDEVVEE-QKYVIRKRVYDKRNDI-----

ATNAP1-1 KGVPCFWLTALKNNVDISEEIVTERDEGALKYLKDIKWKIEEP-KGKLEDFFDQNPYFKNTVLTQSYHMIDEDEPDERAMGTEIDWYDGRCLTQKIL-KKRPKKGSK-
ATNAP1-2 KGVPCFWLTALKNNEITAEIIVTERDEGALKYLKDIKWSRVEEP-KGKLEDFFDQNPYFKNTVLTQSYHMIDEDEPDERALGTEIDWYDGRCLTQKIL-KKRPKKGSK-
ATNAP1-3 KGVPCFWLTALKNNVDISEEIVTERDEGALIVLKDIKWKIEEP-KGKLEDFFDQNPYFKNTVLTQSYHMIDEDEPDERAIGTEIDWYDGRCLTQKIL-KKRPKKGSK-
ATNAP1-4 KGVPCFWLHMKTNEMANEIIVTERDEAALIKLQIRSCVSETERNFISLELDSSNPKKSVSEKTHVMDDEGQVLEIQTDLTQKLAHQVVKRSTKKEPKK-
ATNRP1 QSTPCFWLTAFLSHPALGDLTDDQRIKRYNSELVEDAKDVKSCVSTHSPNPFEDAKLTKTTFPLDEG---TKKITAQIKKWKCKGLANGV---NHD-KKGNKR
ATNRP2 KSTPDFWLTAFISHPALGDLTDDQRIKRYNSELVEDAKDVKSCVSTHSPNPFEDAKLTKTTFPLDEG---TKKITAQIKKWKCKGLANGV---NHE-NKGNKR
PAVNRP2 KSTPDFWLTAFISHPALGDLTDDQRIKRYNSELVEDAKDVKSCVSTHSPNPFEDAKLTKTTFPLDEG---VTKVSAQSIKWKCKGMGIPNGV---NHD-KKGNKR

ATNAP1-1 -NKKDHTKLEDCESFFNFFSPQVPPDDE-----DDEBRAEDLONLMQDYGSGTIREKIIQRAVSWFTGEA
ATNAP1-2 -NKKDHTKLEDCESFFNFFSPQVPPDDE-----DLDDEMADELQGMQHDYDYGSGTIREKIIQSHAVSWFTGEA
ATNAP1-3 -NKKDHTKLEDCESFFNFFSPQVPPDDE-----DDEBRAEELONLMQDYGSGTIREKIIQSHAVSWFTGEA
ATNAP1-4 VNNIDMKKLEDCESFFNFFSPQVPPDDE-----DITWTEELONLMQDYGDAVIRIDKIIQSHAVSWFTGEA
ATNRP1 ALPE-----ESFFTFWDACHKE-----DAGDEI-----HDE-VADIIKEDLWSPNLTYPNDA
ATNRP2 ALPE-----ESFFTFWDACHKE-----DVEDEM-----QDEQVADIIKEDLWSPNLTYPNDA
PPENRP2 PQAE-----ESFFSWFSDSQKQD-----LDDEI-----HDE-IAEVIKEDLWSPNLTYPNHEA
PAVNRP2 PQAE-----ESFFSWFSDSQKQD-----LDDEI-----HDE-IAEVIKEDLWSPNLTYPNHEA
```

Figura Suplementaria 6. Los posibles genes que codifican para proteínas relacionadas con plegamiento de proteínas *PavSHD*, *PpeSHD*, *PavNRP2* y *PpeNRP2* presentan los dominios característicos de las familias de HSP90 y NAP de *A. thaliana*. El alineamiento de los posibles ortólogos encontrados con miembros de las familias de proteínas HSP90 y NAP de *A. thaliana* mostró regiones altamente conservadas. **A.** Se muestra el alineamiento de los dominios HSP90 tipo ATPasa N-terminal y C-terminal, característicos de las proteínas HSP90 de *A. thaliana* (1 al 7), a la que pertenece SHD, el cual se ve está altamente conservado en los posibles ortólogos encontrados en cereza y durazno, con el sitio de unión a ATP (caja azul). **B.** Se muestran los alineamientos del dominio de la familia NAP, característicos de estas proteínas de *A. thaliana* (1 al 4 y NRP1), con los motivos característicos de este dominio IPSFWLT (caja amarilla) y ESFFNFFS (caja azul), los cuáles se encuentran conservados entre las proteínas NAP y entre las proteínas NRP.



A

Dominio de unión a FAD y citoquinina

ATCKX1 PNMVKWTRVLYSDFSAPSRDOEYLIISKE-K-T---FDYVFCFVIINRTDLLNNRRSFF-SFNDSTOASRFKSD-GKTLVCLEVVKYF-NPE
ATCKX2 PKRAKWFRLYSDFTTTRKDOERLISMA---NDIGVDYLEGQIFLSN-GVVD---SFFPPSQQSKVADLVKQ-HGITVWLEVAKYY-DDE
ATCKX3 PKRAKWFRLYSDFSAPSRDOERLIS---KTDGVDYLEGQIMVDH-GPPDNWRSYFFPPSRLRIASMLVKQ-HRIVVWLEVAKYY-DET
ATCKX4 PIRVVKWTRVLYSDFSAPSRDOERLISMT---NDLGVDELEGQIMMSN-GFVD---SFFPLSQTRVASTLVND-HRIVVWLEVAKYY-DRT
PAVCKX4 PKRIVKWFRLYSDFSAPSRDOERLISVNGRKSNAIDYLEGQIMMSN-GSPNNWRSFFPPSRYSRISLVTK-HGITVWLEVAKYY-DCH
PPECKX4 PKRIVKWFRLYSDFSAPSRDOERLISVNGRKSNAIDYLEGQIMMSN-GSPNNWRSFFPPSRYSRISLVTK-HGITVWLEVAKYY-DCH
ATCKX5 PQRVVKWTRVLYSDFSAPSRDOEYLIISMHGOLK---FDYVFCFVIIVDE-GLVNNWRSFFPPSRYSRISLVTK-HGITVWLEVAKYY-HDS
ATCKX6 PTMVKWTRVLYLDFAAFAKDOEYLIISAQGH-K---FDYVFCFVIINRTGLLNSWRISF-TAEEPLEASQFKFD-GRTLYCLEVAKYL-KQD
ATCKX7 PDMVVKWTRVLYLDFEETQDAEYLVIS---QKNESSEFDYVFCFVIINRTGLLNSWRISF-TAEEPLEASQFKFD-GRTLYCLEVAKYL-KQD

ATCKX1 EASSMDOQETGKLLSENYIESTLFSSEVPIEFVLDLDRVHIAERKLRKAGLWEVPHWLNLLIPKSIYQFATEVFNNIL--TSNNGPIILLY
ATCKX2 NLPPIISKVIDTLTKTTSYLPCEFSMDVAFDFLNRVHVEENKLRSLGLWEVPHWLNLLVPKSRILDFRNGVVKDILLKQKSASGLALLY
ATCKX3 SQYTVNEMEMELSDSNHVRGCFMYEKDVTYMDFLNRVRTGELNLRSLKGGQWVDPHPWLNLLVFPKSRITQSKPDDGVFKGILLRNNITSPGVLLY
ATCKX4 TLEPIIQVIDTLSTRTGFAFCFMYVODVYDFLNRVNEEDKLRSLGLWEVPHWLNLLVFPKSRITQSKPDDGVFKGILLRNNITSPGVLLY
PAVCKX4 TETAVDKKELLLKGLSFLPCFVFEKDVAVVEFLNRVKSSEKLRSLKGGQWVDPHPWLNLLVFPKSRITQSKPDDGVFKGILLRNNITSPGVLLY
PPECKX4 TETAVDKKELLLKGLSFLPCFVFEKDVAVVEFLNRVKSSEKLRSLKGGQWVDPHPWLNLLVFPKSRITQSKPDDGVFKGILLRNNITSPGVLLY
ATCKX5 DSEIVDQVEVILMKKNFIEITSVFTTDLQVDFLDRVHKAELKLRSLKGGQWVDPHPWLNLLVFPKSRITQSKPDDGVFKGIL--GNKTSPIILLY
ATCKX6 NKDVINQVEVILMKKNFIEITSVFTTDLQVDFLDRVHKAELKLRSLKGGQWVDPHPWLNLLVFPKSRITQSKPDDGVFKGIL--GNKTSPIILLY
ATCKX7 SNSTIKRVRRLRGRFRNEGLRFEVDLPYVDFLLRVRKRSBEETAKENGTEWTPHPWLNLLVFPKSRITQSKPDDGVFKGIL--GNKTSPIILLY

ATCKX1 PVNOSKWKKHTSLITP--NEDTFFYLVAFTPSAVPNSSGKNDLLEYLKKONORVMNFCAAANLNVKQYLPHYETQKPKWKSHPGKRWETFAQRK
ATCKX2 PNNRNKWNDRMSAMIEEIDEDVIYIIGLQSA---T-PKDLPEVESVNEKTIIRFCKDSGKIKIKQYLMHYTSKEDWIEHFGKWDFFSKRRK
ATCKX3 PNNRNKWNDRMSAMIEEIDEDVIYIIGLQSA---T-PKDLPEVESVNEKTIIRFCKDSGKIKIKQYLMHYTSKEDWIEHFGKWDFFSKRRK
ATCKX4 PNNRNKWNDRMSAMIEEIDEDVIYIIGLQSA---T-PKDLPEVESVNEKTIIRFCKDSGKIKIKQYLMHYTSKEDWIEHFGKWDFFSKRRK
PAVCKX4 PNNRNKWNDRMSAMIEEIDEDVIYIIGLQSA---T-PKDLPEVESVNEKTIIRFCKDSGKIKIKQYLMHYTSKEDWIEHFGKWDFFSKRRK
PPECKX4 PNNRNKWNDRMSAMIEEIDEDVIYIIGLQSA---T-PKDLPEVESVNEKTIIRFCKDSGKIKIKQYLMHYTSKEDWIEHFGKWDFFSKRRK
ATCKX5 PNNRNKWNDRMSAMIEEIDEDVIYIIGLQSA---T-PKDLPEVESVNEKTIIRFCKDSGKIKIKQYLMHYTSKEDWIEHFGKWDFFSKRRK
ATCKX6 PNNRNKWNDRMSAMIEEIDEDVIYIIGLQSA---T-PKDLPEVESVNEKTIIRFCKDSGKIKIKQYLMHYTSKEDWIEHFGKWDFFSKRRK
ATCKX7 PNNRNKWNDRMSAMIEEIDEDVIYIIGLQSA---T-PKDLPEVESVNEKTIIRFCKDSGKIKIKQYLMHYTSKEDWIEHFGKWDFFSKRRK

ATCKX1 QAYDPLAILAPGORIF
ATCKX2 DLFDPKKLLSPGQDIF
ATCKX3 YKYDPRKMLSPGQDIF
ATCKX4 IMFDPKRLSPGQDIF
PAVCKX4 IMFDPKRLSPGQDIF
PPECKX4 ALFDPKKILSPGQDIF
ATCKX5 ABFDPRHILATGORIF
ATCKX6 SRVDPAILAPGHRIF
ATCKX7 AMFDPMAILSPGQKIF

Dominio oxidasa y de unión a FAD

ATCKX1 BLALHHRSRVFDISMMRHI-----VHLGSTSNTLVAARGHCHSLQGOALA-HQGVVVKMES--LRSP-----DIRIYK--GKQP
ATCKX2 BGGVVCSSSTADISRLLQYAANG-----KSTRQVAARGCHSHNGOASV-SGGVIVNMTCTIT-----D-----VVVSKDKL
ATCKX3 BSAVLIPSSVEDITDLKLSFD-----SQLSFPVAARGHCHSHRGOASR-KDGVVNNMRSMVNR-----DRGI-----KVSRITCL
ATCKX4 BGAVLCPSSSTEVARLLRFANGGFSYNGKSTSPASTKVAARGCHSHRGOASR-PGGVVNMTCLAMAAKPA-----VVISADGT
PAVCKX4 BAAVLYPTSIDDISSLIKFSNL-----ISTPFSIAARGHCHSTMGOAMA-PNGVVVDMMSLKNHHPSHASGIIVNTFNLSVNNYY
PPECKX4 BAAVLYPTSIDDISSLIKFSNL-----ISTPFSIAARGHCHSTMGOAMA-PNGVVVDMMSLKNHHPSHASGIIVNTFNLSVNNYY
ATCKX5 BLAVLHPSAEDVARLVRTA-----Y--GSATAPVVAARGHCHSHNGOAMA-GRNGVVVEMNHGVTGTP-----KPLVRP--DEM
ATCKX6 BLAVLHPSKSDIASTIRHI-----WMMGTHSQTVAARGHCHSLQGOAQT-RHGVVHMESS--LHPQ-----KLQVYSVDSAP
ATCKX7 BLAVVRVVGPEDIAGAVKAAAL-----RSDKLTVAARGHCHSHNGOAMA-EGGLVVDMSITTENH-----FEVGYLSGGDATA

ATCKX1 YVDVSGGELWIDVLRKFTL-KYGLAPRSWTDYHLTVGG--TLSNAGISGOAFRHGPOISNVHOLDVVTGKGEVVMRCS
ATCKX2 YADVAACTLWIDVLRKFTA-EKCVSRVSWTDYHLTVGG--TLSNAGISGOAFRHGPOISNVHOLDVVTGKGEVVMRCS
ATCKX3 YVDVSGGELWIDVLRKFTL-ELGLTSPVSWTDYHLTVGG--TLSNAGISGOAFRHGPOISNVHOLDVVTGKGEVVMRCS
ATCKX4 YADVAACTLWIDVLRKFTA-DRCVSRVSWTDYHLTVGG--TLSNAGISGOAFRHGPOISNVHOLDVVTGKGEVVMRCS
PAVCKX4 YADVGGQOLWIDVLRKFTL-EHGLAPVAVTDYHLTVGGIA-TLSNAGISGOAFRHGPOISNVHOLDVVTGKGEVVMRCS
PPECKX4 YADVGGQOLWIDVLRKFTL-EHGLAPVAVTDYHLTVGGIA-TLSNAGISGOAFRHGPOISNVHOLDVVTGKGEVVMRCS
ATCKX5 YVDVSGGELWIDVLRKFTL-EHGLAPRSWTDYHLTVGG--TLSNAGISGOAFRHGPOISNVHOLDVVTGKGEVVMRCS
ATCKX6 YVDVSGGELWIDVLRKFTL-KYGLAPRSWTDYHLTVGG--TLSNAGISGOAFRHGPOISNVHOLDVVTGKGEVVMRCS
ATCKX7 YVDVSGGELWIDVLRKFTL-EHGLAPRSWTDYHLTVGG--TLSNAGISGOAFRHGPOISNVHOLDVVTGKGEVVMRCS

**B**

Dominio *Nod-hem* dioxigenasa N-terminal

```
◊ ATFLS1 PVVDLSDPDEESVRRRAVVKASEEWGIFQVNVHGIPTELIRRLQDVGRRKFFELSSSEKESVAKPDDSKDIEGYCTKLQKDPDEGKKAIVDHLFHRVWPPSCVNYRFPWK
◊ PAVFLS1 PTTIDFSNQDDERKILNQIVASRNWGMVQVNVHGIPNPAISKLDQAVGKAPPELOPPEKVVAKPDDSKSVEGYCTKLQKDELEGKKAIVDHLFHRVWPPSAINYQFWEK
◊ PEFFLS1 PTTIDFSNQDDERKILNQIVASRNWGMVQVNVHGIPNPAISKLDQAVGKAPPELOPPEKVVAKPDDSKSVEGYCTKLQKDELEGKKAIVDHLFHRVWPPSAINYQFWEK
ATFLS2 PTTIDFSNQDDERLVAHAVVKASEEWGIFQVNVHGIPTELIRRLQDVGRRKFFELSSSEKESVAKPDDSKDIEGYCTKLQKDPDEGKKAIVDHLFHRVWPPSCVNYRFPWK
ATFLS3 PVVDLSNPDRELVAHAVVKASEEWGIFQVNVHGIPTELIRRLQDVGRRKFFELSSSEKESVAKPDDSKDIEGYCTKLQKDPDEGKKAIVDHLFHRVWPPSCVNYRFPWK
ATFLS4 PVVDLSNPDRELVAHAVVKASEEWGIFQVNVHGIPTELIRRLQDVGRRKFFELSSSEKESVAKPDDSKDIEGYCTKLQKDPDEGKKAIVDHLFHRVWPPSCVNYRFPWK
ATFLS5 PVVDLSVSDDFLVREVVKASEEWGIFQVNVHGIPTELIRRLQDVGRRKFFELSSSEKESVAKPDDSKDIEGYCTKLQKDPDEGKKAIVDHLFHRVWPPSCVNYRFPWK
ATFLS6 PVVDLSDPDEESVRRRAVVKASEEWGIFQVNVHGIPTELIRRLQDVGRRKFFELSSSEKESVAKPDDSKDIEGYCTKLQKDPDEGKKAIVDHLFHRVWPPSCVNYRFPWK
```

Dominio oxoglutarato/hierro-dependiente

```
◊ ATFLS1 YVMKINYYPPCPDPLALGVPAHTDLSGHTLLVPNEVPGLOVFKDDHWFDAEYIPSAVIVHIGDQIRMSNGRYKNVLRHRTVDKEKTRMSWVVFIEF
◊ PAVFLS1 YVMKINYYPPCPDPLALGVPAHTDLSGHTLLVPNEVPGLOVFKDDHWFDAEYIPSAVIVHIGDQIRMSNGRYKNVLRHRTVDKEKTRMSWVVFIEF
◊ PEFFLS1 YVMKINYYPPCPDPLALGVPAHTDLSGHTLLVPNEVPGLOVFKDDHWFDAEYIPSAVIVHIGDQIRMSNGRYKNVLRHRTVDKEKTRMSWVVFIEF
ATFLS2 YVMKINYYPPCPDPLALGVPAHTDLSGHTLLVPNEVPGLOVFKDDHWFDAEYIPSAVIVHIGDQIRMSNGRYKNVLRHRTVDKEKTRMSWVVFIEF
ATFLS3 YVMKINYYPPCPDPLALGVPAHTDLSGHTLLVPNEVPGLOVFKDDHWFDAEYIPSAVIVHIGDQIRMSNGRYKNVLRHRTVDKEKTRMSWVVFIEF
ATFLS4 YVMKINYYPPCPDPLALGVPAHTDLSGHTLLVPNEVPGLOVFKDDHWFDAEYIPSAVIVHIGDQIRMSNGRYKNVLRHRTVDKEKTRMSWVVFIEF
ATFLS5 YVMKINYYPPCPDPLALGVPAHTDLSGHTLLVPNEVPGLOVFKDDHWFDAEYIPSAVIVHIGDQIRMSNGRYKNVLRHRTVDKEKTRMSWVVFIEF
ATFLS6 YVMKINYYPPCPDPLALGVPAHTDLSGHTLLVPNEVPGLOVFKDDHWFDAEYIPSAVIVHIGDQIRMSNGRYKNVLRHRTVDKEKTRMSWVVFIEF
```

**C**

Dominio superfamilia acetoacetato decarboxilasa

```
AT1G28100.4 SSSYAKPPWIFKGSALYQHILVKAATVRAIPKPERLVEAFGYTLGGFFLANYYDDSPAGVFDELVVIAGLVNSPPTSCAWAAVVLVNSDEACDHGRKEVGLPSQVARFSK
PAV_SC0001107.1 SSSYAKPPWIFKGSALYQHILVKAATVRAIPKPERLVEAFGYTLGGFFLANYYDDSPAGVFDELVVIAGLVNSPPTSCAWAAVVLVNSDEACDHGRKEVGLPSQVARFSK
PRUPE.1G217100. SSSYKPPWIFKGSALYQHILVKAATVRAIPKPERLVEAFGYTLGGFFLANYYDDSPAGVFDELVVIAGLVNSPPTSCAWAAVVLVNSDEACDHGRKEVGLPSQVARFSK
```

**Figura Suplementaria 7.** Los posibles genes que codifican para proteínas relacionadas con metabolismo *PavCKX4*, *PpeCKX4*, *PavFLS1*, *PpeFLS1*, *PavUPI*, *PpeUPI* presentan los dominios característicos de las familias de CKX y FLS, y el dominio de la superfamilia acetoacetato decarboxilasa de la proteína de función desconocida 1 (UPI) de *A. thaliana*. El alineamiento de los posibles ortólogos encontrados con miembros de las familias de proteínas CKX y FLS, y con la proteína de función desconocida de *A. thaliana*, mostró regiones altamente conservadas. **A.** Se muestra el alineamiento de los dominios de unión citoquinina y FAD, y Oxidasa de unión a FAD, característicos de las proteínas citoquininas oxidadas de *A. thaliana* (1 al 7), donde se encuentra el motivo GIWePHPWLNL conservado (caja azul). Ambos dominios se han descrito ser altamente variables entre los miembros de esta familia. **B.** Se muestran los alineamientos del dominio Nod-hem dioxigenasa y Oxoglutarato/hierro-dependiente, característicos de las proteínas FLS de *A. thaliana* (1 al 6), que se encuentran altamente conservados. **C.** Se muestra el alineamiento del dominio perteneciente a la superfamilia acetoacetato decarboxilasa, el cuál fue encontrado en las secuencias de las 3 especies, siendo muy conservado.

Dominio de la familia tipo *LURP-one*

AT5G41590.1 GACTTLLTVWRKSLVSCGFTVIDSNGDLVYRVONYARTNPEELFLMDKDCNSLFLMRRRKKKTLVDSWGIYFANDTRQE--FELPKC-PTWYMRKN  
 PAV\_SC0000886.1 GACTTLLTVWRKSLVSCGFTVIDSNGDLVYRVONYVYGHPEEVLMDASGKSVLTMRRRKKKTLVDSWVFVHEGE--VGDYCRTRTSKSSPTFCVRKN  
 PRUPE.5G107300. GACTTLLTVWRKSLVSCGFTVIDSNGDLVYRVONYVYGHPEEVLMDASGKSVLTMRRRKKKTLVDSWVFVHEGE--VGDYCRTRTSKSSPTFCVRKN

AT5G41590.1 LKNNIFSTKSDFLAYVYSGSD--RKNSTFLRCSYRCKSCKLHVHVPINKTVEIKRREVRTNCGVFCSDVFDLWVNPQFDGCLAMALVLLDQVFS  
 PAV\_SC0000886.1 --NNVLANPNLILAYVYREAWGHKRYAYLIEGYSYTHRSCKVLDEYRN--VVAEIKRREANIIGVSYGVEVPHLIVHPGFDGCFAMALVLLDQVFS  
 PRUPE.5G107300. --NNMLANPNLILAYVYREAWGHKRYAYLIEGYSYTHRSCKVLDEYRN--VVAEIKRREANIIGVSYGVEVPHLIVHPGFDGCFAMALVLLDQVFS

Figura Suplementaria 8. Los posibles genes que codifican para proteínas relacionadas con respuesta a patógeno *PavUP2* y *PpeUP2*, presentan el dominio de la familia de proteínas *LURP-one*, también presenta en la secuencia de *A. thaliana*. Se muestra el alineamiento del dominio perteneciente a la familia de proteínas *LURP-one*, el cual fue encontrado en las secuencias de las 3 especies, siendo muy conservado.

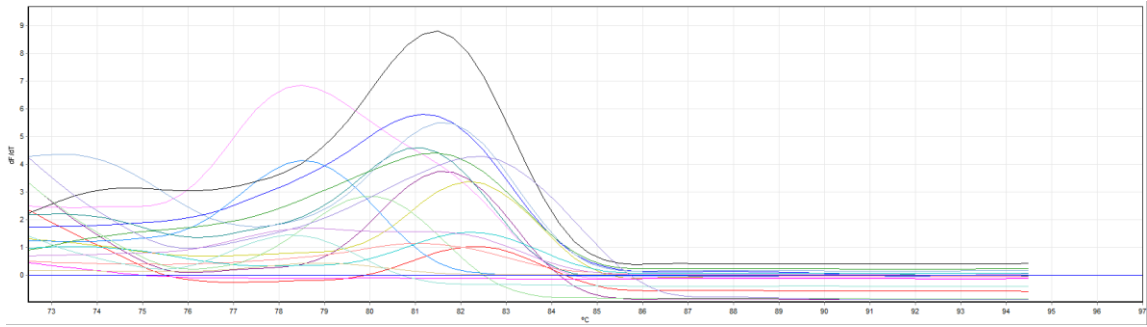
ATPAP2 VTAETVAF--MFGDMGCATPYTFEIRTQDESISTVWKILRDIKALGD--PAMISHI--GD--SYARGY----SWVDEPFAQVEPIASTVYHVC--GNHEV----  
 ATPAP3 SKPDGTVSFLVIGDWGRGGSY-----NOSVALOMGRIGEKLDI--DFVISTGDNFYDNGLSLHDFLFCDSFTNIYTAPSLQKQWYSV--GNHDYRGDV  
 ATPAP5 VGPDPVPTFGVIGDLC----QNY-----ASNQTLNYMNSN----P--HGQAVLFGADLSYADDDHPN--HDQRKWDVGRFMEPCAAAYQDFIFAA--GNHEI----  
 ATPAP6 IGPDPVPTFGVIGDLC----QNY-----ASNQTLNYMNSN----P--HGQAVLFGADLSYADDDHPN--HDQRKWDVGRFMEPCAAAYQDFIFAA--GNHEI----  
 ATPAP7 KKSGLSFLVIGDWGRGGSY-----NOSVALOMGRIGEKLDI--DFVISTGDNFYDNGLSLHDFLFCDSFTNIYTAPSLQKQWYSV--GNHDYRGDV  
 ATPAP8 PEPDGSLSFLVIGDWGRGGSY-----NOSVALOMGRIGEKLDI--DFVISTGDNFYDNGLSLHDFLFCDSFTNIYTAPSLQKQWYSV--GNHDYRGDV  
 PAVPAP8 TKDGSLSFLVIGDWGRGGSY-----NOSVALOMGRIGEKLDI--DFVISTGDNFYDNGLSLHDFLFCDSFTNIYTAPSLQKQWYSV--GNHDYRGDV  
 PPEPAP8 TKDGSLSFLVIGDWGRGGSY-----NOSVALOMGRIGEKLDI--DFVISTGDNFYDNGLSLHDFLFCDSFTNIYTAPSLQKQWYSV--GNHDYRGDV  
 ATPAP9 EGSDELAF--MFGDMGCATPYTFEIRTQDESISTVWKILRDIKALGD--PAMISHI--GD--SYARGY----SWVDEPFAQVEPIASTVYHVC--GNHEV----  
 ATPAP10 IGPDPVPTFGVIGDLC----QNY-----ASNQTLNYMNSN----P--HGQAVLFGADLSYADDDHPN--HDQRKWDVGRFMEPCAAAYQDFIFAA--GNHEI----  
 ATPAP11 ---HIRY---YSDLC----QNY-----ASNQTLNYMNSN----P--HGQAVLFGADLSYADDDHPN--HDQRKWDVGRFMEPCAAAYQDFIFAA--GNHEI----  
 ATPAP12 SGPDPVPTFGVIGDLC----QNY-----ASNQTLNYMNSN----P--HGQAVLFGADLSYADDDHPN--HDQRKWDVGRFMEPCAAAYQDFIFAA--GNHEI----

ATPAP2 -----DFT---STQ--MKPDWAASIIYGNDDGGEGCV--PYSIKFNMDGNS--ESTGM--KAPPTRNLY--SYVDMGTVHFVYESTETNEL--GGGCG  
 ATPAP3 RAQLSPLRALDNRWVCMRSEFVNAEIVDFFVDDTT-----PFVDKVPIQPNKHVYD-----L--SGQLRPTVYLNND-----  
 ATPAP5 --DYAQSIGETDFFKP-----YKRRHVVYRASQSN-----L--SSV-----  
 ATPAP6 --DFVNIQEPHAFKP-----YTHRPVNAVYASQSTSP-----L--YVSVRRASAHIVYSSYSAVY--YTPC  
 ATPAP7 EAQLSKVLTQKDWRFRRSFLVSSGMVDFEFADTN-----PFVEKVFTEPEDHTYD-----WRNVLPRNKVLSN-----  
 ATPAP8 YAQLSEILRLDCRWICLRSFVYVNAEIVDFFVDDTT-----PFVDRKVFDEPEDHTYD-----WRGVLPRNKVLSN-----  
 PAVPAP8 -----GIAEFPFVDTT-----PFVVKLVLD--KHNYD-----L--WRASVPRGTYVANI-----  
 PPEPAP8 EAQLSPALRKRKIDSRWLCCQSFELNLTGIAEFPFVDTT-----PFVVKLVLD--KHNYD-----L--WRASVPRGTYVANI-----  
 ATPAP9 -----DW---PNO--MKPDWAAYVYVYKDSGGEGCV--PYSIKFNMDGNS--ESTGM--KAPPTRNLY--SYVDMGTVHFVYESTETNEL--GGGCG  
 ATPAP10 --DYAQSIGETDFFKP-----YKRRHVVYRASQSTSP-----L--SSV-----  
 ATPAP11 -----DYAQSISSETDFFKP-----YKRRHVVYRASQSTSP-----L--YVSVRRASAHIVYSSYSAVY--YTPC  
 ATPAP12 -----DFVNDIGETDFFKP-----YKRRHVVYRASQSTSP-----L--YVSVRRASAHIVYSSYSAVY--YTPC

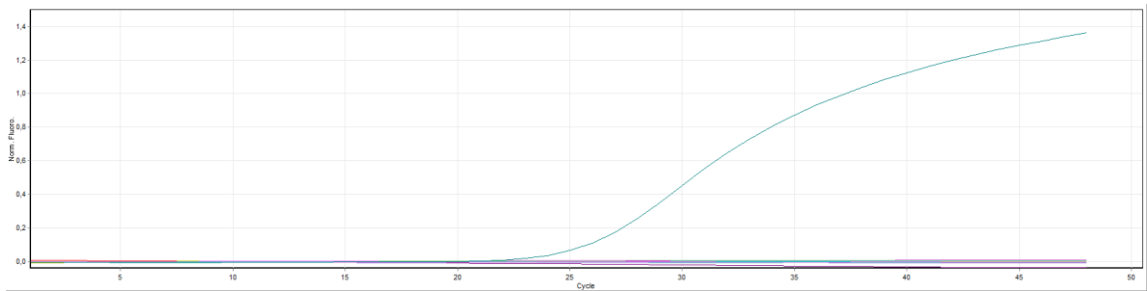
ATPAP2 YEFIKRDLESVDRKKTPEVVVQCHREPMYTSNEVRD--MIRQKMEVLEPDLVKNVCLALWGHVRYRERFCPSN--NTCG----TQWQGNVHVLIGMAG  
 ATPAP3 --DKELDVALRESVAHWKIVGCHRTIKSAG---HNGTIELEKHLDPILQANEVDLYVNGHDCLEH---ISSV-----DSNIQEMTGGGCG  
 ATPAP5 NSWLDQEFKKVNRSETEPWLIVLVHAPWNSNN--YVYMGESMRVYFBEWVYENKVDIVFAGHVHAYERSERVSNTQYNIITDGMSTPVDQNAVYVHTIGDGG  
 ATPAP6 YIWEQELKVNRETEPWLIVLVHAPWNSNN--YVYMGESMRVYFBEWVYENKVDIVFAGHVHAYERSERVSNTQYNIITDGMSTPVDQNAVYVHTIGDGG  
 ATPAP7 --HLDLEIKRRAATKRVYVGHGKTAG---NHGVTQELVDQVLEEKVLDLYNCHDCLEH---ISSV-----HKKQELTSGGCG  
 ATPAP8 --LQDLKVALNKSTARKKIVVGHHAIRSVG---HNGTIELEKHLDPILQANEVDLYNCHDCLEH---ISSV-----NSGMQEMTSGGCG  
 PAVPAP8 --LQDLKVALNKSTARKKIVVGHHAIRSVG---HNGTIELEKHLDPILQANEVDLYNCHDCLEH---ISSV-----DSPIQVHTSGGCG  
 PPEPAP8 --LQDLKVALNKSTARKKIVVGHHAIRSVG---HNGTIELEKHLDPILQANEVDLYNCHDCLEH---ISSV-----DSPIQVHTSGGCG  
 ATPAP9 YSFLKSDLESVNRKTEPWLIVLVHAPWNSNN--YVYMGESMRVYFBEWVYENKVDIVFAGHVHAYERSERVSNTQYNIITDGMSTPVDQNAVYVHTIGDGG  
 ATPAP10 YQWLEEEFPKVNRETEPWLIVLVHAPWNSNN--YVYMGESMRVYFBEWVYENKVDIVFAGHVHAYERSERVSNTQYNIITDGMSTPVDQNAVYVHTIGDGG  
 ATPAP11 NSWLDQEFKKVNRSETEPWLIVLVHAPWNSNN--YVYMGESMRVYFBEWVYENKVDIVFAGHVHAYERSERVSNTQYNIITDGMSTPVDQNAVYVHTIGDGG  
 ATPAP12 YKWLDEKELQGVNRSETEPWLIVLVHAPWNSNN--YVYMGESMRVYFBEWVYENKVDIVFAGHVHAYERSERVSNTQYNIITDGMSTPVDQNAVYVHTIGDGG

ATPAP2 QDWQPIWQPRP--HFD  
 ATPAP3 RAKGGDQVNYEPEE  
 ATPAP5 -----NIEG  
 ATPAP6 -----NIEG  
 ATPAP7 HANRGHVQPW--DPKE  
 ATPAP8 HANRGG--DNDWN--LQE  
 PAVPAP8 HANRGGVKSX--NRA  
 PPEPAP8 HANRGGVKSX--NRA  
 ATPAP9 KDSQPMWEFRAN--HED  
 ATPAP10 -----NIEG  
 ATPAP11 -----NIEG  
 ATPAP12 -----NIEG

Figura Suplementaria 9. Los posibles genes que codifican para proteínas relacionadas con respuesta a patógeno *PavPAP8* y *PpePAP8*, presentan el dominio de la familia de proteínas fosfatasas metal dependientes de *A. thaliana*. Se muestra el alineamiento del dominio perteneciente a la familia de proteínas PAP, el cual se ve que es altamente variable entre los miembros de esta familia, como ha sido descrito para *Arabidopsis*. Se ve que se encuentran presentes los motivos consensos DxG, GDxxY, GNH(E,D), VxxH y GHxH (cajas azules), descritos previamente para *Arabidopsis*.



**Figura Suplementaria 10.** Los partidores diseñados para amplificar los posibles ortólogos de los genes *GIS3* y *PAP8*, en cereza y durazno, generan múltiples amplicones. Se observa que en la curva de melting existen diferentes *peaks*, y no un *peak* único que es lo esperado, con lo cual se infiere que los partidores están amplificando inespecíficamente. En la figura, a modo de ejemplo, se muestra el caso de los partidores para *PAP8* en muestras de cDNA de cereza.



**Figura Suplementaria 11.** Los partidores diseñados para amplificar los posibles ortólogos de los genes *FLS1* y *UP2*, en cereza y durazno, no presentan amplificación. Se observa que en la curva de progreso no existe amplificación para las muestras estudiadas, sólo para el control positivo (DNAG de durazno). En la figura, a modo de ejemplo, se muestra el caso de los partidores para *FLS1* en muestras de cDNA de durazno.

**Tabla suplementaria 1.** Lista de partidores utilizados en el desarrollo de este seminario de título para el análisis de expresión génica mediante RT-qPCR. Los partidores que amplifican producto tanto en cereza como durazno están anotados como “Prunus”; mientras que, los partidores que amplifican producto sólo en cereza o en durazno están anotados como “Pav” o “Ppe”, respectivamente. Los partidores para el gen de referencia *UBQ10* amplifican el producto en ambas especies.

Nombre del partidor	Dirección	Gen	Secuencia 5'	Tm °C	Tamaño amplicón (bp)
Prunus01F	Forward	<i>NRP2</i>	ATGATATCATCAAGTCCATTCCCG	55,8	156
Prunus01R	Reverse	<i>NRP2</i>	TGGCGTAACCAGACTTCACA	51,4	
Prunus02F	Forward	<i>UP1</i>	CTTGGTGGCTTCTTTCTTGC	51,7	160
Prunus02R	Reverse	<i>UP1</i>	CCTTTCGTCCATGATCACAA	50,6	
Prunus03F	Forward	<i>PRNPH3</i>	GTCGTCTTCTACGTCCTTCTCTC	50,8	174
Prunus03R	Reverse	<i>PRNPH3</i>	GCACCCAAACTCTGGAAGAGTT	54	
Ppe04F	Forward	<i>GIS3</i>	GCACAACCTCCCCCTACATCCCCAT	62,8	175
Ppe04R	Reverse	<i>GIS3</i>	TAGCTCTGCAGCCTCAGCCATG	59,2	
Pav04F	Forward	<i>GIS3</i>	ACAATTTCCACAGTAACTTCCGC	54,1	166
Pav04R	Reverse	<i>GIS3</i>	GGGAATGCTGAACTCACG	50,3	
Prunus05F	Forward	<i>PAP8</i>	GTGTTTTGCATTTCTTTGGTTCG	54	156
Prunus05R	Reverse	<i>PAP8</i>	CCTTCCCATCTGTAAAGCAAC	50,7	
Ppe07F	Forward	<i>CRF2</i>	ATGAATCCGGCTGTTAAGTACA	50,9	200
Ppe07R	Reverse	<i>CRF2</i>	TCGTTGATGAACCTCTTGACTC	50,9	
Pav07F	Forward	<i>CRF2</i>	TGTCCAATCAAATACACTGAGCAC	53,4	164
Pav07R	Reverse	<i>CRF2</i>	AACTCGTCTTCTTCGCCACT	50,6	
Prunus08F	Forward	<i>SHD</i>	ATGAGGAAGTGGACGATCCC	52,6	162
Prunus08R	Reverse	<i>SHD</i>	TAGCCCATTGGGAACAGCC	54,7	
Prunus09F	Forward	<i>CKX4</i>	GGGTACAGTCTTCGTGATGATC	50,2	164
Prunus09R	Reverse	<i>CKX4</i>	GCTATGCTGAAAGGAGTGGAAATA	53,7	
Prunus12F	Forward	<i>FLS1</i>	AGATCCTGAACCAAATTGTAGAGG	52,6	160
Prunus12R	Reverse	<i>FLS1</i>	TCTGGAGGCTTCGCATAAAC	52,1	
Prunus13F	Forward	<i>UP2</i>	TGAAATCTTTGTCAAGGTCTGTCC	54	174
Prunus13R	Reverse	<i>UP2</i>	CGACCCGATAAACGAGATCT	50,9	
Prunus15F	Forward	<i>CPK28</i>	ATGGGTGGTTGCTTCTCCA	52,5	157
Prunus15R	Reverse	<i>CPK28</i>	CATTGGGTCTATTGGTCCTTCT	51,5	
UBQ10_FW	Forward	<i>UBQ10</i>	AAGGCTAAGATCCAAGACAAGAG	54,6	146
UBQ10_REV	Reverse	<i>UBQ10</i>	CCACGAAGACGAAGCACTAAG	55,6	