

UCH-FC
Biotecnología
R896
C.1

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



DESCARTE

**“ ESTUDIO SOBRE LA EXPRESIÓN DE OXIDASA ALTERNATIVA
EN YEMAS DE VID cv. THOMPSON SEEDLESS DURANTE EL
PERIODO DE ECO Y ENDODOMANCIA ”**

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

SEBASTIÁN GERARDO RUBIO VARGAS

Dr. Francisco Pérez Correa
Director Seminario de Título



Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dra. Liliana Cardemil Oliva
Presidenta Comisión

Dr. Michael Handford

Santiago de Chile, agosto 2007

Biografía y Agradecimientos



Iniciando por el principio, nací el 17 de abril de 1981 (me parece que en Hospital El Salvador). Mis padres, a pesar de las dificultades económicas, se esforzaron para que yo y mis hermanos saliéramos adelante a través de la educación. Además siempre nos inculcaron ver televisión educativa, siempre veía el Profesor Rosa y cuanto documental repetido daban en aquel entonces (Cachureos era un sacrilegio... además de enterarme muy posteriormente de lo que ocurría con las bebidas que los niños enarbolaban felices durante el programa >_>). De esa manera siempre estuvimos en los mejores colegios que nuestros padres podían procurarnos (recuerdo el desastroso paso por un colegio adventista, era bueno...pero todo terminó cuando mi hermano no quiso ir más después de que, en una de las celebraciones religiosas periódicas, nos contaron una fabula de unos pollitos que se quemaban vivos y que solo se salvaron los que se escondieron con la mamá...la cual también se moría :S), terminando los ciclos básicos y medio, yo y mi hermano en el San Ignacio (A.O.) y mis dos hermanas en el Carmela Carvajal :D.

De esta forma llegó el momento de comenzar mi formación superior. La elección de la carrera fue cosa de área biológica-investigación básica/aplicada, y no me cabe duda que esta carrera es la mayor expresión de eso (con sus altos y bajos, claro está). Y finalmente he logrado salir de esta nueva burbuja.

Terminar agradeciendo a mi Mamá (Wilma Vargas Cabello) y mi Papá (Luís Rubio Flores) por su apoyo y formación. A mis amigos (todos...queden se con el "& col", así nadie se queda fuera y ni hay un orden jerárquico :P) y a los Plagio por los buenos momentos vividos durante estos años y por prestarme sus casas (muchas veces camas, apuntes, alcohol, cena y desayuno incluidos XD). A cuanta persona me dio su apoyo económico, sin siquiera en este momento conocerles, para tener una preocupación menos durante el Colegio y la Universidad. A Tomás Pérez y Francisco Pérez por recibirme en sus laboratorios, darme su confianza y aguantarme.

PD: ah, y a la Verena...por tanto favor concedido



INDICE

INDICE DE TABLAS.....	iii
INDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
ABREVIATURA.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
HIPOTESIS.....	19
Objetivo General.....	19
Objetivos Especificos.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Partidores para RT-PCR de isoformas de AOX.....	20
Extracción de RNA.....	20
RT-PCR.....	21
Tratamiento de frío.....	22
Exposición a Azida de Sodio.....	22
RESULTADOS.....	23
Partidores para Isoformas de AOX.....	23
Expresión de transcritos de AOX en yemas ecodormantes de Vid en Vicuña y en la Región Metropolitana.....	28
Efecto de las bajas temperaturas sobre la expresión de AOX a nivel de los transcritos de m-RNA y de proteína en yemas endodormantes de vid.....	29
Efecto de la NaN2 sobre la expresión de transcritos de AOX en yemas de Vid.....	30
DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIONES.....	33
BLIBLIOGRAFIA.....	34
APENDICE.....	38
Aox en el genoma de Vitis.....	38
secuencias promotoras.....	43
Bibliografía Apéndice.....	47



INDICE FIGURAS

Figura 1.....	6
Figura 2.....	10
Figura 3.....	12
Figura 4.....	14
Figura 5.....	15
Figura 6.....	25
Figura 7.....	26
Figura 8.....	27
Figura 9.....	28
Figura 10.....	29
Figura 11.....	30
Figura A.1.....	40
Figura A.2.....	41
Figura A.3.....	42
Figura A.4.....	45



INDICE TABLAS

Tabla 1.....	9
Tabla A.1.....	38
Tabla A.2.....	39



Resumen

Vitis vinifera cv. Thompson Seedless es un frutal caducifolio, lo que significa que alterna periodos de crecimiento con periodos de latencia. Durante el periodo de desarrollo, *V. vinifera* genera estructuras llamadas yemas que permanecen en un estado de dormancia hasta la temporada siguiente, brotando durante la primavera reiniciando el crecimiento. En *V. vinifera* cv. Thompson Seedless cultivadas en zonas subtropicales, como el Valle del Elqui en Chile, se observa una anomalía en la brotación caracterizada por una brotación escasa y dispareja. Esta brotación errática se ha relacionado con una falta de frío invernal en las zonas subtropicales que tendría como consecuencia un alargamiento del período de endodormancia de las yemas.

Observaciones recientes indican que en el Valle del Elqui no se produce un alargamiento del período de la ED en yemas de Thompson Seedless, por lo que la brotación errática de las yemas en la primavera se debe a otra causa. Al comparar las horas frío acumuladas durante la temporada invernal en el valle de Elqui con las del valle del Maipo no se observan diferencias. Sin embargo, en Elqui se observan temperaturas máximas extremadamente altas durante los meses de Junio y Julio. Estas altas temperaturas invernales podrían afectar la respiración mitocondrial de las yemas dormantes, provocando una alteración en el estado redox del tejido lo que llevaría a un estrés oxidativo de las yemas que provocaría el fenómeno observado en Elqui.

La Oxidasa Alternativa (AOX) es una ubiquinol oxidasa, ubicada en la membrana interna de la mitocondria de plantas, que entrega los electrones cedidos por el ubiquinol directamente al oxígeno para formar agua sin aumentar el gradiente transmembrana de protones, produciendo de este modo un bypass en el flujo de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (CTE). Debido a esta actividad se han propuesto varias funciones a la AOX, entre las que se destacan: Termogénesis, control de la eficiencia del metabolismo

mitocondrial y el control de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la mitocondria. Se han descrito dos familias de AOX en plantas -Aox1 y Aox2- que se diferencian principalmente en la regulación de su expresión. Mientras que la familia Aox1 se expresa por diferentes estímulos ambientales, la expresión de la familia Aox2 depende del tejido y estado de desarrollo.

En este trabajo se diseñaron partidores específicos para dos de las cinco secuencias de transcritos asignados como AOX en la base de datos de Genomic Facilities de la UCLA. La expresión de dichos transcritos se estudió en yemas de *Thomposon Seedless* colectadas en los valles de Elqui y Maipo. Adicionalmente, se estudio el efecto de las bajas temperaturas y la Azida de Sodio, un veneno mitocondrial, sobre la expresión de los transcritos de AOX en yemas endodormantes.

Los resultados mostraron que la expresión los dos transcritos de AOX, AOX23 y AOX53 es inducida por distintos factores, mientras AOX23 es inducido por frío, AOX53 es inducido por tratamientos con Azida de Sodio. A mediados de Julio, se observo que los dos transcritos se expresaron en yemas colectadas en el valle de Maipo, mientras que en las yemas colectadas en el valle de Elqui solo uno de los transcritos se expresó.

Abstract

Vitis vinifera cv. Thompson Seedless is a caducifolious fruit tree, which means that alternates growing and recess periods during their life cycle. Latent buds are produced during *V. vinifera* development, which remains in a dormancy stage till the next season sprouting in the spring and reinitiating growth. In Thompson Seedless grown in subtropical areas such as the Elqui valley in Chile, anomalous sprouting of buds is observed during spring, which is characterized by few and uneven bud break. This erratic bud break has been related to the lack of chilling in subtropical regions, which has been thought that extends the duration of the bud-ED period.

Recently, it has been shown that duration of bud-ED is not longer in buds of Thompson Seedless grown in Elqui than in Maipo valley. Therefore, other reasons must exist that explain the erratic bud break observed in buds grown in Elqui. Comparison of chilling hours accumulated during the fall winter season in Elqui and in Maipo showed no differences. However, in Elqui maximum temperatures during June and July are extremely high. This high maximum winter temperature could affect mitochondrial respiration of endodormant buds causing a disruption in the redox state of the tissue which in turn could provoke an oxidative stress that could explain the erratic bud break observed in Elqui.

Alternative oxidase (AOX) is an ubiquinol oxidase found in the internal membrane of plant mitochondria. The AOX takes the ubiquinol electrons and directly gives it to molecular oxygen to make water, without increasing the transmembrane proton gradient. In this way, the AOX makes a bypass in the mitochondrial electron transport chain flux. For this activity some function has been proposed for the AOX, the more important are: thermogenesis, mitochondrial metabolism efficiency control and mitochondrial production of Reactive Oxygen Species (ROS) control. In plants two families of AOX proteins –AOX1 and AOX2– have been described. The main difference between these two families is the regulation of the

expression. Expression of AOX1 family is controlled by environmental stimulus, and AOX2 expression depends on the type tissue and on the developmental stage.

In this work, we designed specific primers for two AOX (AOX23 and AOX53) of the five sequences of *Vitis vinifera* EST contigs assigned as AOX in the Genomic Facilities databases (UCLA). The expression of the transcripts was studied on buds collected in Maipo and Elqui Valley. Beside that, chilling temperature effect and Sodium Azide treatment was studied on the expression of AOX transcripts in dormant buds.

Results showed that expression of both AOX transcripts AOX23 and AOX53 were induced by different factors, while AOX23 was induced by chilling temperatures, AOX53 was induced by sodium azide treatments, a mitochondrial venom that inhibits the cytochrome oxidase (COX). In mid-July both transcripts were expressed in buds of grapevines grown in the Maipo valley, while in the Elqui valley only one of the transcript was expressed. Immunoblot analysis showed positive results only in buds that were exposed to chilling temperatures.

Abreviaturas

AOX, Oxidasa Alternativa

CAT, Ciclo de Acidos Tricarboxilicos

COX, Citocromo oxidasa

CTE, Cadena Transportadora de Electrones

DEPC, dietilpirocarbonato

EcD, Ecodormancia

ED, Endodormancia

NCBI, Nacional Center of Bioinformatics Institute.

PD, Paradormancia

ROS, Especies Reactivas de Oxígeno

USACH, Universidad de Santiago de Chile

Introducción

Dormancia

Los árboles perennes caducifolios se caracterizan por un ciclo de vida que alterna periodos de crecimiento, durante la primavera y el verano, con periodos de receso del crecimiento durante el otoño y el invierno. En este último periodo las plantas pierden sus hojas, los brotes se lignifican y el crecimiento visible se detiene. Durante el periodo de crecimiento los árboles leñosos caducifolios generan estructuras llamadas yemas latentes (Figura 1). Las yemas latentes son las encargadas de reiniciar el crecimiento de la planta al comienzo del próximo periodo de desarrollo, permaneciendo en un estado de detención del crecimiento visible durante las estaciones de verano, otoño e invierno.

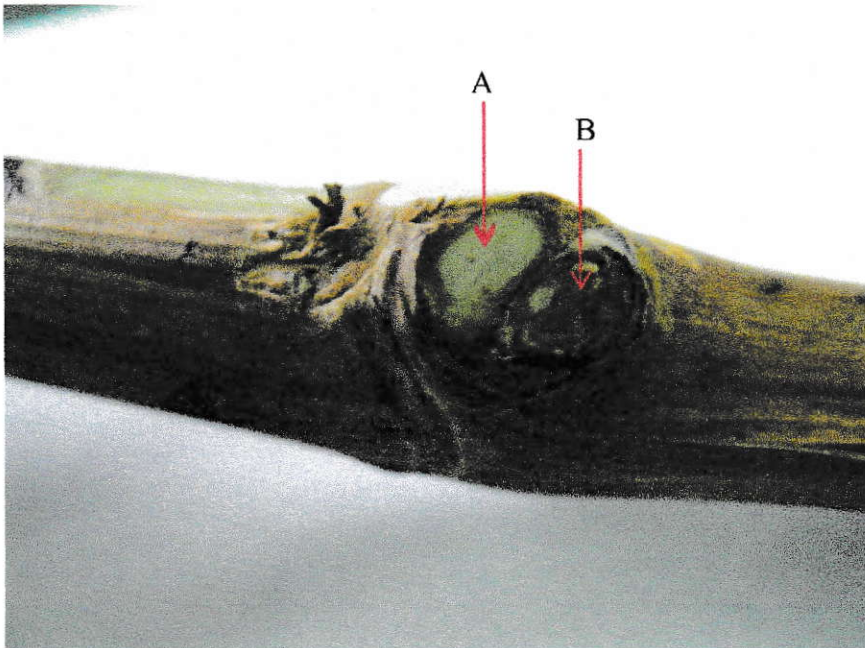


Figura1: Corte transversal de una yema axial de *V. vinifera* cv. Thompson Seedless. Se indica con flecha la yema primaria (A) y la yema secundaria (B).

Este periodo de arresto del desarrollo de las yemas es conocido como Dormancia de yemas y puede clasificarse en tres fases: Paradormancia (PD), Endodormancia (ED) y Ecodormancia (EcD) (Lang y col, 1987). La Paradormancia es el cese del crecimiento del

tejido meristemático por influencia de señales bioquímicas (fitohormonas) que son transportadas al tejido blanco, un ejemplo es la dominancia apical en que la auxina transportada desde el ápice de la rama inhibe el crecimiento de las yemas laterales, al cortar el tejido meristemático apical las yemas laterales son capaces de desarrollarse. La Endodormancia es la inhibición del crecimiento bajo señales endógenas del tejido. Por último, la Ecodormancia es el receso del crecimiento meristemático dictado únicamente por factores ambientales como falta de humedad y/o temperaturas ambientales baja, al cambiar el tejido a condiciones ambientales favorables el crecimiento se reinicia rápidamente.

Brotación errática de Yemas de *Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless en climas subtropicales

En Chile, buscando aumentar la producción de *Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless, un frutal caducifolio proveniente de climas templados, se inició el cultivo de esta variedad en las III y IV regiones, donde imperan los climas subtropicales. Estos cultivos en zonas subtropicales son incentivados por las condiciones ambientales que permitirían un excelente desarrollo de la fruta. Sin embargo, al igual que en el caso otros frutales caducifolios de climas templados que han sido trasladados a zonas subtropicales, se observó que las yemas de Thompson Seedless brotaban en forma errática.

En la brotación errática se observa una brotación dispareja y disminuida de las yemas. Este fenómeno no se observa en los frutales caducifolios que crecen en zonas templadas, lo que indicaría que alguna diferencia ambiental es la responsable de esta anomalía en la brotación. A primera vista, la mayor diferencia es la temperatura ambiental promedio durante el invierno entre las zonas templadas ($\approx 12^\circ \text{C}$) y subtropicales ($\approx 20^\circ \text{C}$). Esta diferencia de temperaturas marcó las líneas de investigación de muchos grupos científicos durante las décadas pasadas, llegando a la conclusión que la falta de frío invernal alarga el estado endodormante de las yemas y por tanto esto es lo que afectaría la brotación al llegar

la primavera derivando en la observada brotación errática. De esta forma se instauró el concepto de requerimientos de frío, lo que significa que las yemas de árboles caducifolios de climas templados requieren permanecer cierta cantidad de tiempo expuestas a bajas temperaturas para salir del estado endodormante y brotar (Saure, 1985; Dokoozlian y col, 1995).

El concepto de requerimientos de frío conlleva al desarrollo de diversos métodos de medición de frío. Dentro de estos métodos se encuentran las Horas Frío (HF), que consiste básicamente en contabilizar las horas que la planta permanece bajo una determinada temperatura límite. En *V. vinifera* se estableció que esta temperatura límite correspondería a 7° C y que para brotar requeriría acumular entre 150 y 1200 HF (Westwood, 1982).

En la variedad Thompson Seedless hay diversas estimaciones de las Horas Frío necesarias para la brotación. Kliewer y Soleimani (Kliewer y Soleimani 1972) establecen que se requieren más de 1176 HF para una brotación óptima; en el valle central de Chile Gil (Gil, 1997), estima 600 HF para el inicio de la brotación y más de 900 para una brotación óptima; Lyon (Lyon y col, 1989) estimó que 993 HF eran necesarias para alcanzar un 90% de brotación.

Sin embargo, durante los inviernos del valle del Elqui (clima subtropical) y del valle del Maipo (clima templado), lugares donde se cultiva comercialmente la variedad Thompson Seedless, podemos contabilizar similares cantidades de Horas Frío (Tabla 1) durante el año 2005 y 2006. Por tanto, la falta de frío invernal (contabilizado como HF) no sería la causante de la brotación errática. Además, podemos observar que las diferencias de las temperaturas mínimas diarias entre el valle del Elqui y el valle del Maipo (Figura 2) son pequeñas.

En contraste, las temperaturas máximas de ambos valles presentan importantes diferencias, conllevando a que en el valle del Elqui se observe una mayor oscilación de la

temperatura ambiente. Estos mayores cambios en la temperatura durante el día podrían afectar el metabolismo energético de la planta, derivando en la alteración de la brotación de las yemas. El metabolismo energético de las plantas esta centrado en dos organelos: mitocondrias y cloroplastos. En las yemas, durante el estado dormante, los cloroplastos se encuentran inactivos, por lo que se presume que la mitocondria es el organelo que se vería afectado en las yemas por la gran variación de temperaturas en el valle del Elqui.

Sample date	Maipo valley				Elqui valley			
	2005		2006		2005		2006	
	CH ^A	PCU	CH ^A	PCU	CH ^A	PCU	CH ^A	PCU
April 18	54	58	43	91	75	15	64	25
May 5	75	156	57	175	91	32	86	49
May 26	214	556	161	408	175	437	317	203
June 16	267	938	224	759	271	397	334	409
July 7	330	1298	336	1106	341	601	478	644
July 28	553	1710	446	1472	525	907	548	836
August 18	619	2028	603	1916	600	1032	638	1039

Tabla 1: Se muestran las Horas Frío (CH) acumuladas en los valle del Elqui y Maipo durante los años 2005 y 2006, en las cuales no se observa diferencias significativas hasta el 18 de Agosto (cifras encerradas en circulo rojo). Además se muestra la columna PCU (Linsley-Noakes y col, 1995), otra medida del Frío acumulado, en el cual se considera el efecto de las altas temperaturas, en las cuales si se observan diferencias entre los valles. Adaptado de Perez y col, 2007.

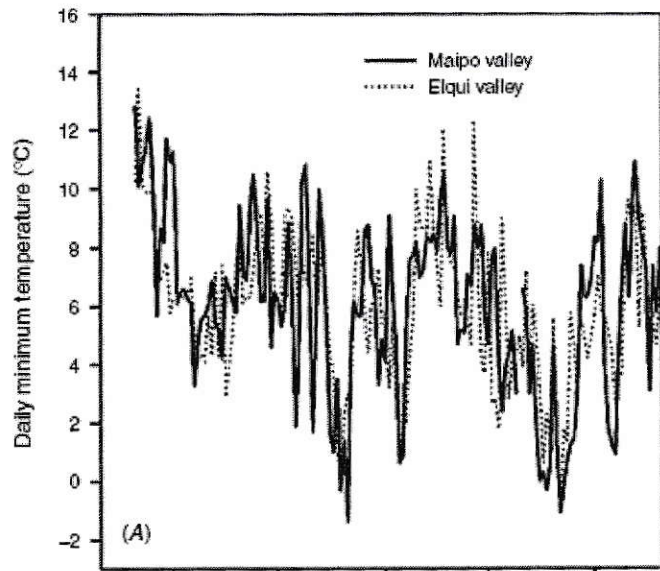
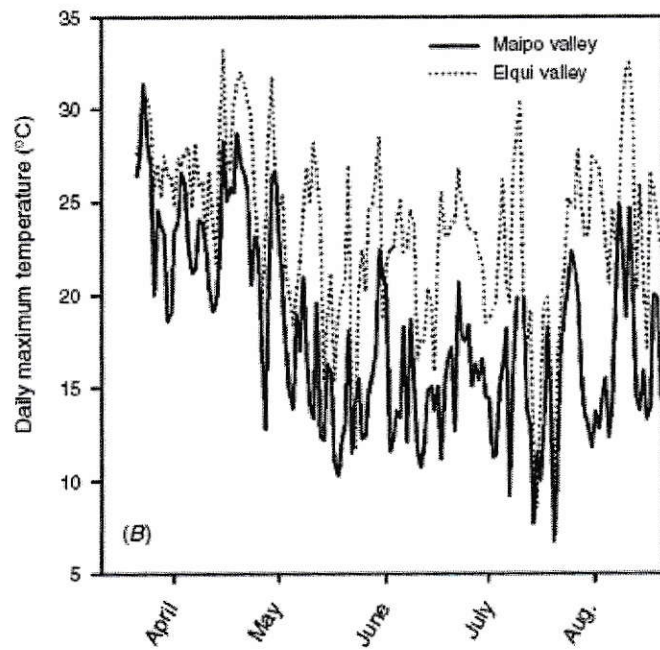


Figura 2: Grafico de temperaturas mínimas (A) y temperaturas máximas (B) en los valles del Maipo y Elqui durante el año 2005. Se observan similares temperaturas mínimas en ambos valles, sin embargo las temperaturas máximas diarias muestran importantes diferencias entre los meses de Mayo y Agosto. Adaptado de Perez y col, 2007.



Aspectos fundamentales de la Cadena Transportadora de Electrones de la Mitocondria

La mitocondria es un organelo de las células eucariontes, evolucionada probablemente de una bacteria gram negativa que interactuaba simbióticamente con los ancestros de los organismos eucariontes (Wallin, 1923). Actualmente la mitocondria se encarga de gran parte de la producción del ATP celular a partir del fosfoenolpiruvato derivado de la glicolisis que se lleva a cabo en el citoplasma de la célula. El fosfoenolpiruvato ingresa a la mitocondria para formar parte del Ciclo de ácidos Tricarboxílicos (CAT; o ciclo de Krebs). Durante el CAT se genera CO_2 y NADH. Mientras el CO_2 sale por difusión de la mitocondria y posteriormente de la célula, el NADH es utilizado como sustrato por la NADH dehidrogenasa, también conocidas como Complejo I, ubicadas en la membrana interna de la mitocondria para iniciar la Cadena Transportadora de Electrones (CTE). Por otra parte, en forma paralela y también como parte del CAT, en la matriz mitocondrial se genera FADH_2 , el cual es utilizado como sustrato para la CTE ingresando por el Complejo II (Succinato Dehidrogenasa). El balance de ingreso de sustrato a la CTE por uno u otro complejo está dictado por las condiciones ambientales y la genética de la especie a la cual pertenece la mitocondria.

Los electrones cedidos por el FADH_2 y el NADH son utilizados para reducir el pool de ubiquinonas existentes en la membrana interna de la mitocondria. Las ubiquinonas reducidas (en forma de ubiquinol) son utilizadas por el Complejo III (Citocromo c reductasa-ubiquinol oxidasa) para reducir el Citocromo C (CitC). El CitC, en el estado reducido, finalmente entrega su electrón al Complejo IV (citocromo oxidasa, COX) el cual los utiliza para reducir el oxígeno molecular a agua (Albert y col, Ed 1994).

Así la CTE está compuesta de proteínas y coenzimas insertas en la membrana interna de la mitocondria, que permiten el flujo de electrones desde los sustratos donadores de electrones (NADH y FADH_2) hasta el O_2 para formar H_2O (Figura 3). Durante este flujo de electrones se coproduce en los distintos complejos de la CTE -exceptuando el Complejo II-

un transporte de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. Este transporte induce una diferencia de concentración de protones y de carga eléctrica entre la matriz y el espacio intermembrana. Este potencial electroquímico es utilizado por el Complejo V (ATP sintasa) para la generación de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (P_i).

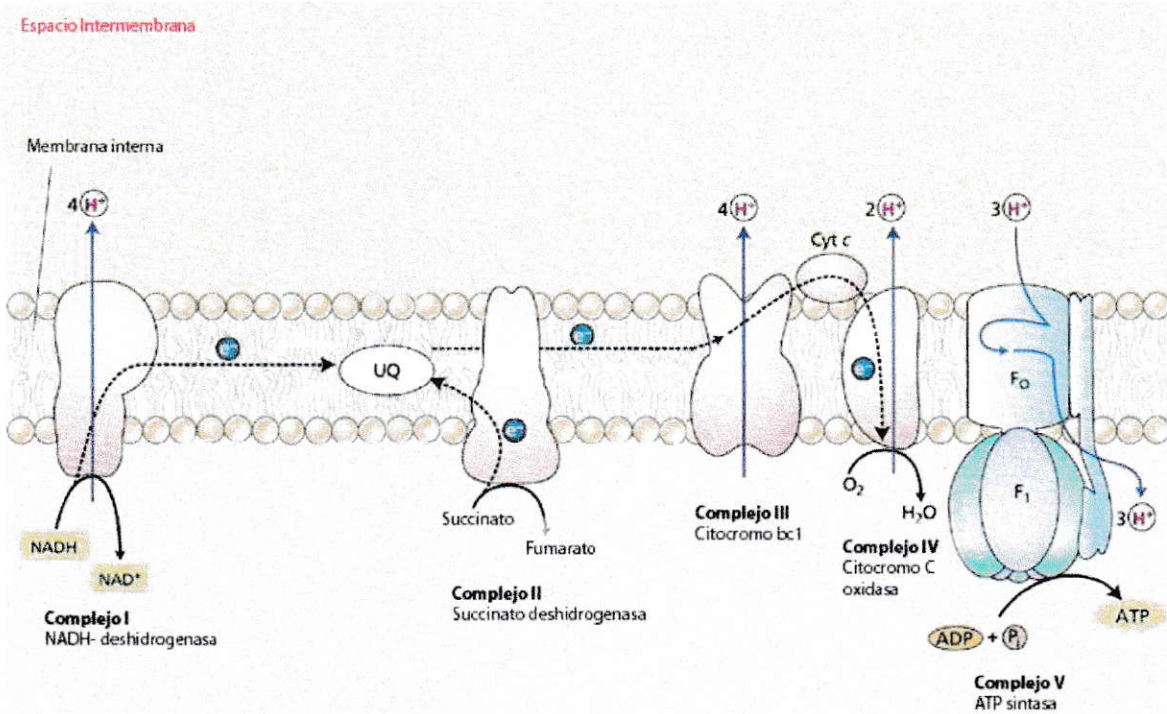


Figura 3: esquema de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria. Se destacan las cantidades de protones aportadas por cada complejo durante el transporte de los electrones. (Adaptado de la figura 11.1 de plant physiology online [www.plantphys.net])

La CTE de mitocondrias de plantas

El esquema de CTE que se muestra en la Figura 3 es el más básico que existe y pertenece a mitocondrias de animales. En mitocondrias de plantas la CTE es más compleja. Por una parte, la entrada de NADH como sustrato a la CTE no ocurre sólo en el Complejo I, sino que existen NAD(P)H-dehidrogenasa en la cara que da a la matriz de la membrana interna y en la membrana externa de la mitocondria (Figura 4). En general, estas NAD(P)H-

dehidrogenasa alternativas no son inhibidas por rotenona (un inhibidor del Complejo I) y presentan diferentes afinidades por el NADH y el NADPH. El patrón de expresión de estas enzimas aún está en estudio, sin embargo se sabe que la actividad de algunas de estas enzimas está regulada por Calcio (Rasmusson y col, 2004; Moller, 2002; Rasmusson y Agius, 2001; Kerschler, 1999).

Otra diferencia es la presencia de una segunda oxidasa terminal en las mitocondrias de plantas (Figura 4), llamada Oxidasa Alternativa (AOX). La AOX es una proteína, codificada en el ADN nuclear, que se ha caracterizado como una ubiquinol oxidasa, y utiliza los electrones cedidos por el ubiquinol para reducir O_2 a H_2O sin aumentar el gradiente transmembrana de protones, así el consumo de oxígeno no es acoplado a la síntesis de ATP. A diferencia de la COX, su centro reactivo son dos átomos de hierro no hémicos, lo que permite que no sea inhibida por cianuro. Sin embargo su actividad se ve afectada por los niveles redox de la mitocondria ya que, bajo ciertas condiciones, dos monómeros son capaces de formar un homodímero unido covalentemente por un puente disulfuro, inhibiendo la actividad oxidasa.

La Oxidasa Alternativa

La AOX se clasifica en tres familias de las cuales dos están presentes en las plantas y cada familia cuenta con dos a tres isoformas dependiendo de la especie. La familia 1 se expresa bajo diferentes estímulos bióticos y abióticos (frío, inhibición de la COX, aumento de los niveles de H_2O_2 en la célula), mientras que la familia 2 se expresa en forma constitutiva en los diferentes tejidos -dependiendo del estado de desarrollo- y está presente solo en eudicotiledonias. La familia 0 (cero) se encuentra sólo en bacterias y se diferencia de sus similares de plantas por la ausencia de la Cisteína que permite el puente disulfuro entre dos monómeros (Considine y col 2002).

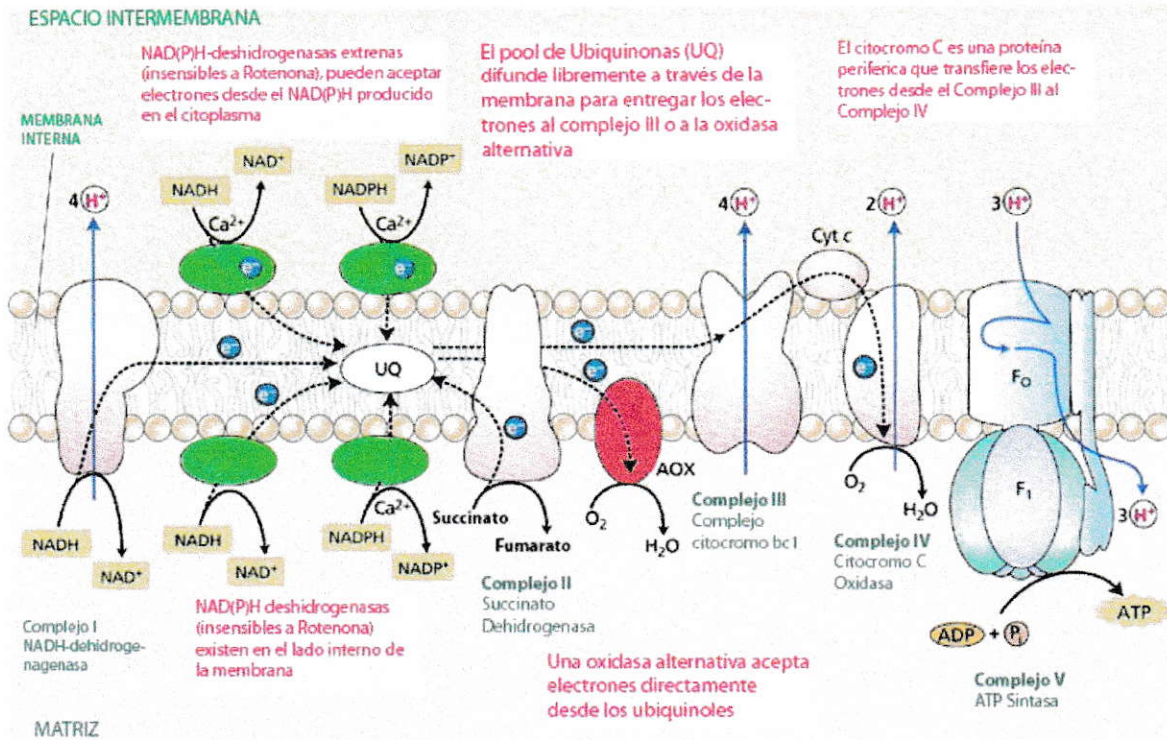


Figura 4: esquema de la cadena transportadora de electrones en las mitocondrias de plantas. En verde se muestran las NAD(P)H dehidrogenasas en la membrana interna de la mitocondria y en rojo la Oxidasa alternativa (AOX) en la cara interior de la membrana interna. (Adaptado de la figura 11.1 de plant physiology online [www.plantphys.net])

Regulación de la AOX

La actividad de la AOX es regulada por el estado redox de la célula. Como ya se dijo, la AOX es capaz de formar homodimeros unidos covalentemente por un puente disulfuro (Figura 5); sin embargo, hoy se discute si la formación de este enlace es mediado por alguna proteína o se forma espontáneamente cuando el nivel oxidativo de la célula aumenta. Lo que está claro es que la ruptura del puente disulfuro depende directamente de la actividad de enzimas de la familia de las ferritinas. Además del puente disulfuro, varias isoformas de AOX en diferentes especies estudiadas son reguladas por el piruvato, probablemente en forma alostérica (McIntoch, 1994; Millenaar y Lamber, 2003).

Forma inactiva (oxidada)

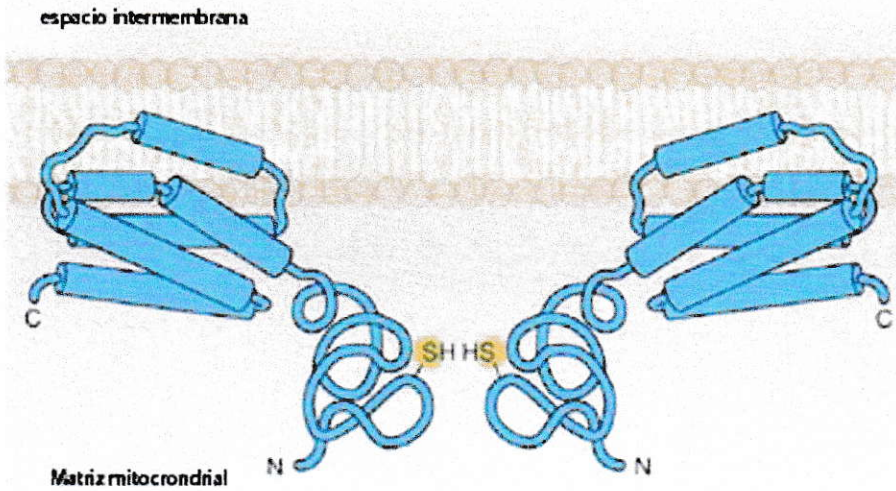
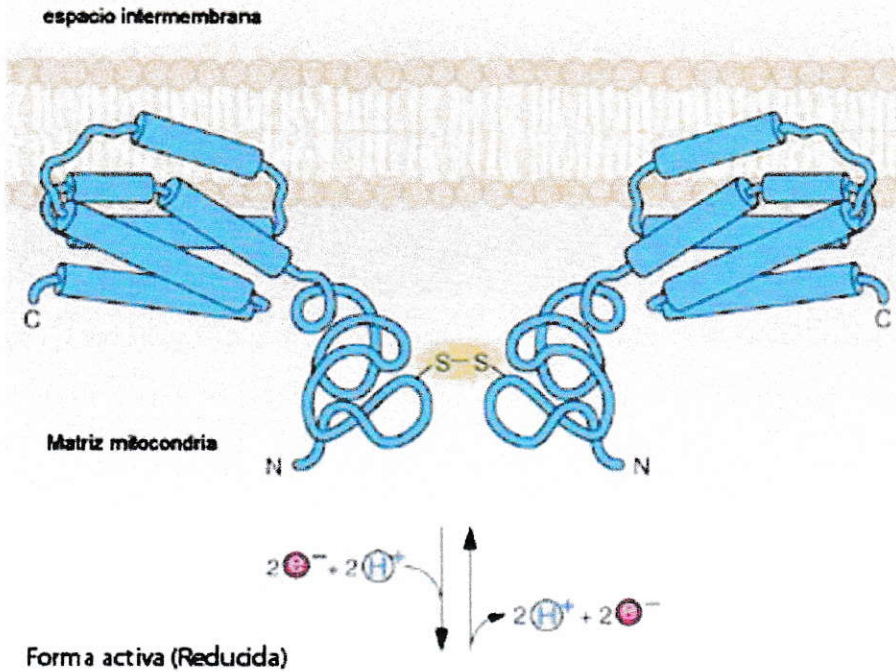


Figura 5: regulación de la actividad de la AOX a través de la formación de un puente disulfuro entre dos subunidades idénticas. La estructura que representa a la AOX es la que actualmente se supone correcta.

Estructura de la AOX

La AOX ha sido particularmente difícil de aislar en su conformación funcional (Affourtit y Moore, 2004). Por tanto los modelos que se han propuesto se basan en predicciones de estructura secundaria, perfil hidropático a partir de la secuencia aminoacídica y de estructuras ya resueltas de proteínas de la misma familia, como las metano monooxigenasas. Hoy en día se sostiene que la AOX consta de 5 α -hélices. Dos de estas α -hélices están inmersas en la membrana interna de la mitocondria, pero no la atraviesan, mientras que las otras α -hélices se encuentran en el lado que da a la matriz de la membrana interna (Figura 5). En la cavidad que forman estas α -hélices se encuentra el lugar de unión de los hierros y el sitio activo de la proteína (Gomez y col 2001). Además del sitio activo, la cola amino-terminal de la AOX estaría expuesta a la matriz de la mitocondria y contendría la Cisteína que forma el puente disulfuro con otra subunidad idéntica (Berthold y col, 2004, Umbach y col 2006).

Función de la AOX en el Metabolismo

Funcionalmente, la presencia de la AOX en la mitocondria produce un desvío del flujo de electrones, disminuyendo la eficiencia de la CTE para transformar el flujo de electrones en un gradiente electroquímico y por tanto, disminuye la eficiencia de la producción de ATP de la mitocondria. Derivado de lo anterior la presencia de la AOX en la mitocondria en diferentes situaciones tiene importantes efectos en el metabolismo. Por una parte -y esta es la primera función que se le asignó a la AOX- transforma a la mitocondria en un organelo que principalmente quema sustrato, produciendo más calor que ATP. Este rol se caracterizó en tejidos florales de diferentes *areáceas* (lirio), que durante el periodo de polinización aumentan su temperatura para la volatilización de compuestos aromáticos. Este aumento de temperatura se correlacionó a una mayor presencia de AOX en la mitocondria (Meeuse, 1975).

Otra situación en que la presencia de la AOX ha probado tener una gran importancia es durante la falta de P_i en tejidos de *Arabidopsis thaliana*, en mutantes antisentido para el gen de AOX1a las plantas fueron incapaces de crecer en esta situación. La explicación a este hecho es que la falta de P_i reduce la producción de ATP y satura la CTE, por lo cual se procesan menores cantidades de NADH y $FADH_2$. La mayor concentración de NADH y $FADH_2$ desplazaría el equilibrio de las reacciones del CAT y la síntesis de varios aminoácidos asociados a ésta. La presencia de la AOX, a pesar de disminuir la eficiencia mitocondrial, permite que se mantenga el flujo de electrones a través de la CTE y por tanto el CAT y la síntesis de los aminoácidos siguen funcionando de forma regular (Grabel'nykh y col, 2006). La saturación del CAT también ocurre cuando se inhibe en forma exógena la COX u otro complejo mitocondrial posterior a los I y II en la CTE, casos en que la AOX cumpliría la misma función (Popov y col, 2003).

Debido a que la principal acción de la AOX se asocia a una disminución en la tasa de producción de ATP, la AOX también se ha propuesto como una enzima que regula la velocidad de crecimiento de las plantas. Esta afirmación se basa en estudios en que se realizan mediciones calorimétricas y velocidad de crecimiento bajo distintas condiciones y en diferentes tejidos. Claramente el tope máximo de velocidad de crecimiento de las plantas depende del nivel fotosintético para la fijación de carbono, pero este se ve limitado por que es necesario utilizar parte del carbono fijado durante la respiración (Hansen y col, 2002). Mientras menos eficiente sea la utilización de carbono durante la respiración, menos crecerá la planta (Moore y col 2002).

Sin embargo, la función más importante que se le asigna a la AOX es la estabilización del nivel de reducción del pool de ubiquinonas y por tanto de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que se derivan normalmente de la respiración mitocondrial (Millenaar y col, 1998; Maxwell y McIntoch, 1999).

La principal fuente de ROS de la mitocondria es el pool de ubiquinonas reducidas ya que pueden reaccionar con otros elementos de la membrana distintos al Complejo III como los fosfolípidos y O_2 disuelto en la membrana para generar diferentes especies como el radical superóxido, hidroxilo y peróxido de hidrógeno (O_2^- , $HO\cdot$ y H_2O_2). Los ROS en las plantas se consideran señales moleculares que determinan la muerte de las células por el daño que producen a los diferentes componentes celulares (Amirsadeghi y col, 2007; Bhattacharjee, 2005). Sin embargo, otros grupos proponen que los ROS regulan muchas vías de señales y que una de ellas es la que desencadena la muerte celular (Foyer y doctor, 2005). Cualquiera que sea la hipótesis correcta sobre la acción de los ROS en la vida de las plantas, el control de la producción de ROS es esencial (Susuki y Mitler, 2006). Así existe un destacado conjunto de enzimas que disminuyen el estrés oxidativo disminuyendo los niveles de ROS producidos por diferentes eventos, como la catalasa, las diferentes familias de peroxidasas y la superóxido dismutasa (Berlett y Stadtman, 1997). En la prevención de un aumento en la producción de ROS mitocondrial la AOX cumple un rol fundamental, debido a su capacidad para disminuir el pool de ubiquinonas en el estado reducido disminuye la posibilidad que las ubiquinonas reaccionen con el oxígeno disuelto en la membrana mitocondrial.

Hipótesis

Debido a las diferencias climáticas del periodo invernal y principios de la primavera entre la Región Metropolitana y Vicuña, se postula una expresión diferente de la AOX en las yemas de vid cv. Thompson Seedless cultivadas en ambas regiones.

Objetivo Principal

Estudiar el patrón de expresión de AOX en yemas de *Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless bajo diferentes condiciones, a través de la técnica de RT-PCR .

Objetivos secundarios

- Desarrollar set de partidores que reconozcan secuencias de AOX de *Vitis vinifera*.
- Estudiar el efecto de las bajas temperaturas y de venenos mitocondriales sobre la expresión de AOX en yemas de Vid a través de RT-PCR.
- Estudiar posibles diferencias en la expresión de AOX en yemas de vid cv. Thompson Seedless colectadas en Vicuña y en la Región Metropolitana al finalizar el periodo invernal.

Materiales y Métodos

Material Vegetal

Las muestras consistieron en yemas de *Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless colectadas en los valles de Vicuña (Intahuasi, centro experimental del INIA) y Maipo (La Platina, centro experimentales del INIA) entre los meses de Mayo y Julio del año 2005. Cada envío consistió en 35 a 50 yemas de cada localidad.

Detección de la AOX

Partidores para RT-PCR de isoformas de AOX

Para generar partidores específicos se busco secuencias de *Vitis vinifera* asignadas como AOX en la base de datos de la NCBI. No existiendo dichas secuencias en esta base de datos, se procedió a buscar en una base de datos de EST de la universidad de California. Las secuencias fueron ingresadas al programa Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000). Los partidores obtenidos fueron comparados con las bases de datos para descartar la posible amplificación de fragmentos no deseados.

Los partidores para Actina de *V. vinifera* fueron conseguidos con el laboratorio de Fisiología Vegetal de la USACH y amplifican un fragmento de 340pb.

Extracción de RNA:

El RNA se extrajo usando una modificación del protocolo descrito por Chang y col, 1993. La muestra (0,5 y 0,7 g de yema) es congelada con N₂ líquido y molida en mortero hasta que se transforma en un polvo fino, una vez en esta condición se mezcla en tubo que contiene buffer CTAB (2 % CTAB, 2 % PVP, 0,1 M Tris pH 8, 25 mM EDTA, 2 M NaCl, agua DEPC) y 2% β-mercaptoetanol. La muestra se agita vigorosamente en vortex y se mantiene a 65° C durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo la muestra es filtrada en un tubo con lana

de vidrio por centrifugación a 400g durante 10 min a 4° C. El filtrado es traspasándolo a un tubo Corex y lavado dos veces con 1 volumen de Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). La fase acuosa recuperada se deja precipitando durante la noche con 2.5 volumen de Etanol Absoluto a -20° C. El RNA precipitado se recupera mediante centrifugación a 3000g durante 20 min a 4° C. El pellet obtenido se lava con Etanol 70% y se deja secar por algunos minutos. Finalmente el precipitado se resuspende en H₂O DEPC hasta disolver completamente. El RNA fue incubado con DNAsa (70 U/mL) durante 30 minutos a 36° C para eliminar el DNA. Para una mayor purificación, una vez que se termino el tratamiento con DNAsa, el RNA se purifico agregando 0,5 volúmenes de sílica y 1 volumen de NaI (6 M). Después de repetidas agitaciones en vortex el sobrenadante fue eliminado por centrifugación y la sílica fue lavada dos veces con buffer de lavado (10mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl, 2,5 mM EDTA, 50% v/v etanol), eliminándose el sobrenadante cada vez. El pellet de sílica y RNA fue secado a temperatura ambiente. El RNA unido a la sílica fue resuspendido en agua DEPC y separado por centrifugación.

RT-PCR

La reacción de RT-PCR se realizó empleando el kit SuperScript™ One-Step RT-PCR System con Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA), en un termociclador MJ research (PTC-150). Las síntesis de cDNA se realizo a 50° C durante 30 min y un paso de 2 min a 94° C, utilizando 1 µg de RNA como templado. La reacción de PCR se realizo por 35 ciclos de amplificación que consistieron en los siguientes pasos: denaturación 94° C por 30 seg, anillamiento 55° C por 30 seg, extensión 72° C por 45 seg y la extensión final fue de 10 min a 72° C. Los fragmentos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñido con Bromuro de Etidio, en buffer TAE 1%, a 50 Volt.

Tratamiento de Frío

Los tratamientos de frío consistieron en exponer a 4° C durante una semana en el refrigerador un número de yemas colectadas en la fecha que se indique, suficientes para realizar la extracción de RNA (alrededor de 15 yemas). El grupo control fue mantenido a temperatura ambiente en el laboratorio.

Exposición a Azida de Sodio

Dos grupos de yemas fueron colectadas el 19 de Junio en la región Metropolitana. Un grupo fue expuesto a una solución de azida de sodio al 2% (P/V) y mantenida a 23°C constante en una cámara de crecimiento, mientras el otro grupo solo fue puesto en la cámara de crecimiento a la misma temperatura (Control) .A los 7 días se extrajo el RNA de estas yemas y se realizó un RT-PCR con los partidores para AOX23 y AOX53.

Resultados

Partidores para RT-PCR de isoformas de AOX

En GeneBank de la NCBI no se encuentran secuencias asignadas como AOX proveniente de alguna de las cepas de *V. vinifera* ni de otras especies relacionadas. Sin embargo, la NCBI cuenta con una gran cantidad de secuencias de EST de diversas especies y que no han sido asignadas como posibles mensajeros de una proteína específica. Estas secuencias son de gran utilidad cuando los genes de interés aún no han sido descritos. Existen dos caminos para encontrar las secuencias de interés en esta base de datos. La primera es tomar la secuencia de una proteína homóloga a la de interés y utilizando el programa tBlastn realizar una búsqueda en la base de datos. Una vez obtenido el resultado de la búsqueda se seleccionan las secuencias que pertenecen al organismo que se estudia y se procede a ensamblar las secuencias seleccionadas. Luego estos ensamblajes se revisan (deben contener ORF grandes, evitando la presencia de intrones) y comparan con la base de datos de la base de datos para realizar una asignación a la secuencia putativa. El otro camino es tomar todas las secuencias de EST, compararlas, ensamblarlas y posteriormente realizar una asignación a cada uno de los ensamblajes (contig) y secuencias que no se pudieron ensamblar (singleton) según su similitud con otras secuencias de las bases de datos. Este último camino es el que tomó un grupo del College of Agricultural and Environmental Sciences de la University of California Davis. Actualmente esta base de datos de contigs y singletons se encuentra disponible con acceso gratuito en Internet (Da Silva y col, 2005; <http://cgf.ucdavis.edu>). De esta forma se accedió a 5 ensamblajes de EST procedentes de diferentes cepas, órganos y estados de desarrollo de *V. vinifera* asignadas como AOX. De estas 5 secuencias 3 fueron descartadas, por estar contenidas en otro ensamblaje (CTG1030354) y por ser demasiado pequeñas para diseñar partidores (CTG1037264 y CTG1039659). Así solo se tomaron en cuenta dos secuencias de EST para

el siguiente estudio nombradas AOX53 (CTG1030353 CTG1009429) y AOX23 (CTG1035923), las cuales presentan un 54% de identidad a nivel nucleotídico y las secuencias de proteínas muestran un 59% de identidad, siendo por tanto secuencias de isoformas distintas.

Para diseñar los partidores se utilizo el programa Primer3 obteniéndose los siguientes

pares:

AOX53:

OLIGO	start	len	tm	gc%	seq
LEFT PRIMER	721	20	59.94	45.00	GAAAATGAACGGATGCACCT
RIGHT PRIMER	1123	20	60.07	55.00	GGTAACCAATAGGGGCTGGT

SEQUENCE SIZE: 1307
INCLUDED REGION SIZE: 1307
PRODUCT SIZE: 403

AOX23

OLIGO	start	len	tm	gc%	seq
LEFT PRIMER	204	20	59.97	50.00	GAACTGGTGCCCTTGACATT
RIGHT PRIMER	606	20	60.07	50.00	TTGGATCAAAGCCCTACTGG

SEQUENCE SIZE: 1216
INCLUDED REGION SIZE: 1216
PRODUCT SIZE: 403

Al comparar las secuencias utilizando el programa Blastn contra la base de datos de CGF, solo son reconocidas como pertenecientes a las secuencias contra las cuales fueron diseñadas. Con esto podemos decir que estos partidores son específicos.


```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      5      15      25      35      45      55      65      75      85      95     105
AOX1A_ARAT MMITRGGAKA AKSLLVAAGP RLFSTVTRVS SHEALSASHI LKPGVTSAWI WTRAPTIGGM RFASTITLGE KTPMKEEDAN QKKTENESTG GDAAGGNKNG DKGIASSYWGV
AOX23      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AOX53      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      115     125     135     145     155     165     175     185     195     205     215
AOX1A_ARAT EPNKITKEDG SEWKWNCFRP WETYKADITI DLKHHVPTT FLDRIAYWTV KSLRWPTDLF FQRRYGCRAM MLETVAAVPG MVGGMLLHCK SLRRFEQSGG WIKALLEEAE
AOX23      PPANLTKEDG SPWKWHCFRP WETYKADISI DVEKHHKPVK FMDKFAYWTV QALKVPTHMF FQRKHMCHAM LLETVAAVPG MVGGMLLHCQ SLRRFEQSGG WIKALLEEAE
AOX53      QRPKITREDG SPWPWNCFMP WETYHADTAI DLSKHHVPKT FVDKVAYRTV KLLRIPTDIF FQRRYGCRAM MLETVAAVPG MVGGMLLHLR SLRKFEHSGG WVKALLEEAE

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      225     235     245     255     265     275     285     295     305     315     325
AOX1A_ARAT 1 1 NERMLMTFM EVAKPKWYER ALVITVQGVF FNAYFLGYLI SPKFAHRMVG YLEEEAHSY TEFLKELDKG NIENVPAPAI AIDYWRLPAD ATLRDVVMVV RADAHRDV
AOX23      NERMLMTFI ELAKPQWYER AIVFAVQGVF FNAYFLTYLA SPKVAHRITG YLEEEAHSY TEFLKDLNG SFENVPAPAI AIDYWRLPAE STLRDVVEVI RADAHRDV
AOX53      NERMLMTMV ELVRPKWYER LLVLTVQGVF FNAFFVLYVL SPKAAHRVVG YLEEEAHSY TEFLKDIDSG AIENVPAPAI AIDYWRLPKD ATLKDVITVI RADAHRDV

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      335     345     355     365     375
AOX1A_ARAT NHFASDIHYQ GRELKEAPAP IGYH.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AOX23      NHYASDIQCQ GHQFKDVPAP LGYHSTFRLT SFVEFPNLLA ALKMNQLV..
AOX53      NHFASDIHFQ GKLLNEAPAP IGYH.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

Figura 8: alineamiento de la secuencia aminoacídica derivada de los ensamblados de EST AOX53 y AOX23 con la secuencia de AOX1a de *Arabidopsis thaliana*. En amarillo se muestran los aminoácidos conservados en las tres secuencias, en rojo los aminoácidos que forman los sitios de unión a hierro, marcados como 1 y 2. En verde con un asterisco arriba, la Cisteína que forma el puente disulfuro con otra subunidad

Expresión de transcritos de AOX en yemas ecodormantes de Vid en Vicuña y en la Región Metropolitana

Se colectaron yemas en Vicuña y en la RM a fines de Julio cuando las yemas se encontraban en el estado de Ecodormancia (Lang y col, 1987). El análisis de expresión de los transcritos de AOX mediante RT-PCR demostró que ambos transcritos se expresaron en las yemas colectadas en la RM, no así en la muestra de Vicuña donde solo se expresó el transcrito de AOX53 (FIG 9).

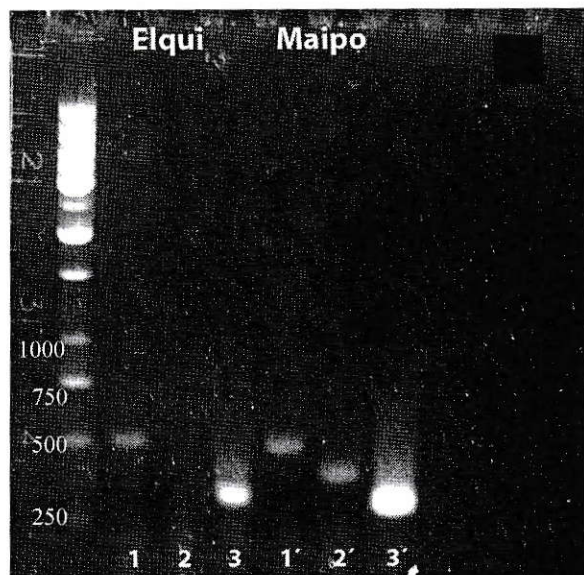


Figura 9: Análisis por RT-PCR de la expresión de transcritos de AOX de *Vitis vinifera* en las muestras de yemas colectadas en los valles del Elqui y Maipo el 21 de Julio. Carriles: 1, AOX53; 2, AOX23 y 3, actina

Efecto de las bajas temperaturas sobre la expresión de AOX a nivel de los transcritos de m-RNA y de proteína en yemas endodormantes de vid.

Dos grupos de 15 yemas fueron colectadas en la región metropolitana a mediados de Mayo. El primer grupo se mantuvo a 4° C en el refrigerador durante una semana, mientras el segundo fue mantenido a temperatura ambiente en el laboratorio. Una vez terminada la semana, las yemas fueron utilizadas para la extracción de RNA y el posterior análisis de expresión mediante RT-PCR con los partidores AOX23 y AOX53.

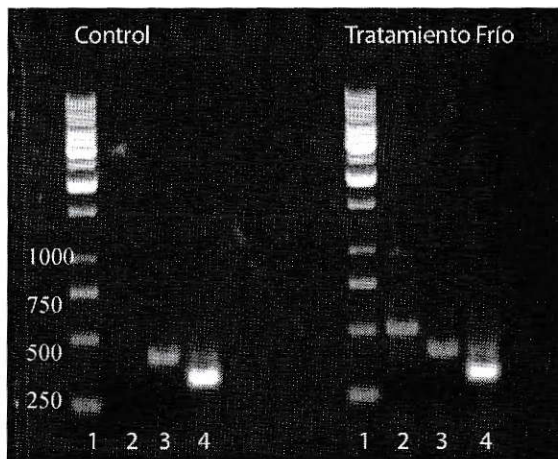


Figura 10.- Efecto de las bajas temperatura sobre la expresión de transcritos de AOX de *Vitis vinifera* en yemas de Thompson Seedless colectadas el 31 de Mayo en el valle de Maipo. La expresión de los transcritos fue analizada por RT-PCR usando partidores específicos de AOX de *Vitis vinifera* y como control interno se utilizó la expresión del gen de actina. Carriles: 1, Marcador peso molecular; 2, AOX23 (amplificado de 481 pb); 3, AOX53 (amplificado de 425 pb) y 4, actina.

Efecto de la NaN_2 sobre la expresión de transcritos de AOX en yemas de Vid

Dos grupos de 15 yemas endodormantes (Lang y col, 1987) fueron colectadas en la RM. Un grupo fue tratado con una solución de Azida de Sodio al 2% (p/v) y puesta en la cámara de crecimiento a 23°C por una semana. El segundo grupo solo se dejó en la cámara de crecimiento a 23°C. Después de una semana de permanencia en la cámara se extrajo el RNA de las yemas y la expresión de AOX se analizó por RT-PCR. En las yemas controles no se observó la expresión de ninguno de los dos transcritos de AOX, mientras que en las yemas tratadas con azida se observó la expresión del transcrito AOX23 (FIG 11).

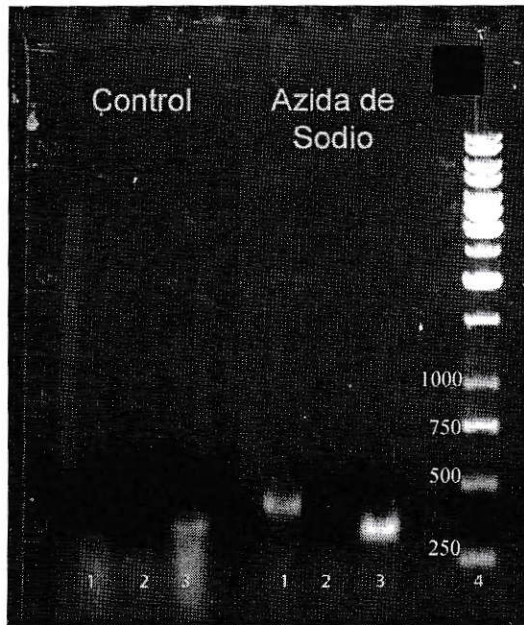


Figura 11.-efecto de un veneno mitocondrial sobre la expresión de los transcritos de AOX en yemas de *Vitis vinifera* colectadas en el valle del Maipo el 19 de Junio. Carriles: 1, AOX23; 2, AOX53; 3, Actina; 4, PM. Sólo la muestra tratada con Azida de Sodio expresa el transcrito de AOX23. AOX53 no se expresa en ninguno de los dos casos.

Este experimento fue repetido durante el año 2007 con yemas colectadas en el valle del Maipú en una fecha similar a la del año 2005 (14 de Junio) y además se siguió la expresión durante los días 0, 3, 6 y 9 a contar del inicio del tratamiento (no mostrados). En este caso la expresión de AOX23 sólo aparece a partir del día 3 en el grupo tratado con Azida de Sodio, mientras que AOX53 esta presente en el día 0 y desaparece entre los días 3 y 6 en ambos grupos.

Discusión

Las yemas ecodormantes de Thompson Seedless colectadas a fines de Julio en Vicuña solo expresaron un transcrito de AOX correspondiente a la AOX23, cuya expresión fue inducida por las bajas temperaturas en yemas endodormantes colectadas en la RM (fig 10). Mientras que las yemas ecodormantes colectadas en la misma fecha en el valle de Maipo expresaron ambos transcritos de AOX los correspondientes a AOX23 y AOX53. Esta diferencia en la expresión de los transcritos de AOX podría estar relacionada con las diferencias climáticas invernales en ambas regiones. La IV región y Vicuña poseen un clima subtropical caracterizado por las temperaturas máximas altas durante el invierno, es así como en pleno mes de Julio las temperaturas pueden alcanzar los 32° C durante el día y caer a 4° C o menos durante la noche. La RM se caracteriza por poseer un clima templado en el cual difícilmente las temperaturas superan los 20° C durante el invierno, de este modo la oscilación térmica es significativamente menor que en la IV región. En consecuencia, la expresión de AOX53 que es inducida por bajas temperaturas es razonable que se exprese en las yemas ecodormantes colectadas a fines de Julio en ambas regiones, ya que las horas frío acumuladas hasta esa fecha fue similar en ambas regiones (Perez y col, 2007). La no expresión de AOX23 en Vicuña podría deberse a una represión de su expresión por efecto de las altas temperaturas invernales. En efecto, las yemas endodormantes de la RM expresan AOX23; sin embargo, cuando dichas yemas fueron expuestas a una temperatura constante de 23° C por una semana en la cámara de crecimiento, la expresión de AOX23 fue reprimida. Más aún, el tratamiento con azida indujo su expresión, sugiriendo que la regulación de su expresión podría estar mediada por el flujo de electrones en la CTE de la mitocondria. De este modo flujos altos inhibirían su expresión mientras que flujos bajos inducirían su expresión.

Si bien la expresión de algunas isoformas de AOX en *A. thaliana* están relacionadas con

la respuesta de las plantas al ser expuestas a patógenos (Simons y col, 1999), en *Vitis* no se encontraron referencias de patógenos que ataquen las yemas, si existiendo informes de enfermedades en hojas y bayas. En principio, podemos descartar que la expresión de AOX23 en la RM se deba a un ataque de patógenos.

El amplificado del transcrito AOX23 aparece en estos experimentos con un peso superior (~480 pb) al que se estimó cuando los partidores fueron diseñados (~410 pb). Utilizando la última liberación de secuencias genómicas de *Vitis vinifera* en la base de datos de la NCBI, se identificó un contig de secuencias genómicas que contenía la secuencia de AOX23, con un inserto (que correspondería a un intron) de ~70pb. Lo anterior indica que el aumento del peso esperado del amplificado de AOX23 se debería a este intron.

Conclusiones

En este momento disponemos de dos set de partidores específicos que amplifican secuencias de dos transcritos de AOX.

La transcripción de AOX23 y AOX53 es estimulada por factores ambientales distintos. Mientras el transcrito AOX53 es inducido por frío, AOX23 se expresa cuando se produce una disminución en el flujo de electrones en la CTE de la mitocondria.

A mediados de Julio se observa una diferencia en la expresión de los transcritos de AOX de las yemas colectadas en Vicuña y la RM. Posiblemente esta diferencia en la expresión se debe a las diferencias en las condiciones climáticas invernales de ambas zonas.

Bibliografía

- Affourtit C. y Moore, A.L.; 2004. Purification of the plant alternative oxidase from *Arum maculatum*: Measurement, stability and metal requirement. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, Vol 1608, pp. 181-189.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson J; Ed 3ra, Garland Science (New York), 1994. *Molecular Biology of the Cell*, Capítulo 10: Energy Conversion: Mitochondria and Chloroplasts.
- Berlett, B.S. y Stadtman, E.R. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272: 20313–20316
- Berthold D.A., Andersson M.E. y Nordlund, P.; 2000. New insight into the structure and function of the alternative oxidase *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1460, pp. 241-254.
- Bhattacharjee S.; 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science*, Vol 89, No 7, pp. 1113-1121
- Bradford, M.M.; 1976. The quantitation of micrograms quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, Vol 72, pp. 248-254.
- Chang, S. Puryear, J. y Cairney, J.; 1993. Simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep* 11: 113-116.
- Considine, M.J. Holtzapffel, R.C. y Day, D.A.; 2002. Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. *Plant Physiol.* 129 (3): 949-953.
- Da Silva F.G., Iandolo A., Al-Kayal, F., Bohlmann, M.C., Cushman M.A., Lim H., Ergul A., Figueroa R., Kabuloglu E.K., Osborne C., Rowe J., Tattersall E., Leslie A., Xu J., Baek, J., Cramer G.R., Cushman J.C. y Cook D.R.; 2005. Characterizing the grape transcriptome. Analysis of expressed sequence tags from multiple vitis species and development of a compendium of gene expression during berry development. *Plant Physiol.*, Vol 139, No 2, pp. 574-597.
- Dokoozlian NK, Williams LE, Neja RA (1995) Chilling exposure and hydrogen cyanamide interact in breaking dormancy of grape buds. *HortScience* 30: 1244–1247
- Elthon T.E., Nickels R.L. y McIntosh L.; 1989. Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Plant Physiol.* 89 : 1311-1317.
- Fiorani F., Umbach A.L. y Siedow J.N.; 2005. The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature. A study of *Arabidopsis* AOX1a transgenic plants. *Plant Physiol.*, Vol 139, No 4, pp. 1795-1805

- Foyer C.H y Noctor G. 2005. Oxidant and antioxidant signalling: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plan, cell and environment* 28: 1056-1071
- Gil, G. 2000. La producción de fruta. Santiago. Ediciones Universidad Católica de Chile. 583.
- Gomes C.M., Le Gall J., Xavier A.V. y Teixeira, M.; 2001. Could a diiron-containing four-helix-bundle protein have been a primitive oxygen reductase?. *ChemBioChem*, Vol 2, pp. 583–587
- Grabel'nykh O.I., Kolesnichenko A.V., Pobezhimova T.P., Zykova V.V. y Voinikov V.K.; 2006. Mechanisms and functions of nonphosphorylating electron transport in respiratory chain of plant mitochondria. *Russian Journal of Plant Physiology* 53 (3): 418-429
- Hansen L D., Church J. N, Matheson, McCarlie S, Wallace V. Thygerson T., Criddle R., y Smith, Bruce N. Kinetics of plant growth and metabolism, *Thermochimica Acta* 2002 Vol 388 (1-2) pp 415-425.
- Helmerhorst, E.J., Stan, M., Murphy, M.P., Sherman, F., Oppenheim, F.G.; 2005. The concomitant expression and availability of conventional and alternative, cyanide-insensitive, respiratory pathways in *Candida albicans*. *Mitochondrion*, Vol 5, No 3, pp. 200-211.
- Kerscher S.J., Okun J.G. y Brandt U.; 1999. A single external enzyme confers alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase activity in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Cell Science* Vol 112, No 14, pp. 2347-2354
- Kliewer, W. y Soleimanil, A. 1972. Effect of chilling on budbreak in Thompson Seedless and Carignane grapevines. *Am. J. Enol. Vitic* 23: 31-34.
- Maxwell, D.P. Wang, Y. y McIntosh, L. 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(14):8271-8276.
- McIntosh, L. 1994. Molecular biology of the alternative oxidase. *Plant Physiol.* 105: 781-786.
- Meeuse B.J.D.; 1975. Thermogenic respiration in aroids. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, Vol 26, pp. 117-126.
- Millenaar, F.F. Benschop, J.J. Wagner, A.M. y Lambers, H. 1998. The role of the alternative oxidase in stabilizing the in vivo reduction state of the ubiquinone pool and the activation state of the alternative oxidase. *Plant Physiology* 118 (2): 599-607.
- Millenaar, F.F. y Lambers, H. 2003. The alternative oxidase: In vivo regulation and function. *Plant Biology* 5 (1): 2-15.
- Møller I.M.; 2002 A new dawn for plant mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases. *Trends in Plant Science*, Vol 7, No.6, pp. 235-237

- Moore A.L., Albury M.S., Crichton P.G. y Affourtit C.; 2002. Function of the alternative oxidase: Is it still a scavenger?. *Trends in Plant Science*, Vol7, No 11, pp. 478-481
- Lang, G.A. Early, J.D. Martin, G.C. y Darnell R.L. 1987. Endo-, para-, and eco-dormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *Hortic. Sci.*, Vol 22, pp. 371-377
- Linsley-Noakes, G.C. Louw, M. y Allan, P. 1995. Estimating daily positive Utah chill units using daily maximum and minimum temperatures. *J. S. Afr. Soc. hort. Sci.* 5: 19-22.
- LYON, M., POLLER, S., y RODRIGUEZ-CANO, M. 1989. Evolución del letargo de yemas en seis especies frutales en relación al frío y tratamientos con tioureso cianamida. Tesis Ing. Agr., Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 71 p.
- Pérez, F.J. Rubio, S. 2006. An improved chemiluminescence method for hydrogen peroxide determination in plant tissues. *Plant Growth Regulation* 48 (1): 89-95
- Pérez, F.J. Rubio, S. Ormeño, J. 2007. Is the mitochondria involved in the erratic budbreak in Thompson Seedless. *Functional Plant Biology* 34 (7), pp. 624-632
- Popov, V.N. Ruuge, E.K. y Starkov, A.A. 2003. Effect of Electron-Transport Inhibitors on the Generation of Reactive Oxygen Species by Pea Mitochondria during Succinate Oxidation. *Biochemistry (Moscow)* 68 (7): 747-751
- Rasmusson A.G. y Agius S.C.; 2001. Rotenone-insensitive NAD(P)H dehydrogenases in plants: Immunodetection and distribution of native proteins in mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol 39, No 12, pp. 1057-1066
- Rasmusson A.G., Soole K.L. y Elthon T.E.; 2004. Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annual Review of Plant Biology*, Vol 55, pp. 23-39
- Rozen S., Skaletsky H.; 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, Vol 132, pp. 365-386
- Saure, M. 1985. Dormancy release in deciduous fruit trees. *Hort. Rev.* 7: 239-300
- Simons, B.H., Millenaar, F.F., Mulder, L., Van Loon, L.C., Lambers, H. 1999 Enhanced expression and activation of the alternative oxidase during infection of arabidopsis with *Pseudomonas syringae* pv tomato *Plant Physiology* 120 (2), pp. 529-538
- Suzuki N. y Mittler R. 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum* 126: 45-51.
- Umbach, A.L., Fiorani, F., Siedow, J.N.; 2005. Characterization of transformed Arabidopsis with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue. *Plant Physiol.*, Vol 139, No 4, pp. 1806-1820
- Umbach, A.L., Siedow, J.N.; 2006. Regulation of plant alternative oxidase activity: A tale of two cysteines. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, Vol 1757, No 2, pp.

135-142

Yang J.-Y. y Widmann, C.; 2001. Antiapoptotic signaling generated by caspase-induced cleavage of RasGAP. *Molecular and Cellular Biology* ,Vol 21, No 16, pp. 5346-5358

Wallin I. E.; 1923. The Mitochondria Problem. *The American Naturalist*, Vol. 57, No.650,pp. 255-261

Westwood, M. 1982. *Fruticultura de zonas templadas*. Segunda edición. Madrid. Editorial Mundi Prensa. 461p.

APENDICE 1

AOX en el Genoma de Vitis

A principios de Septiembre del 2007 se liberó la secuencia genómica completa de la variedad Pinot de *V. vinifera*. Esta secuenciación fue llevada a cabo por el Centro Nacional de Secuenciación de Francia (CNS; www.cns.fr).

BLAT (Blast-like alignment tool) es, como lo indica su nombre, un programa similar al Blast. Sin embargo, esta diseñado para encontrar alineamientos mayores a 40 nucleótidos (10 aminoácidos en su versión para proteínas) con una identidad mayor al 80%. La segunda diferencia importante es que trabaja con una base de datos indexada en la memoria del servidor, esto significa que accede a una cantidad limitada de secuencias, y de forma rápida, al realizar la búsqueda (Kent, 2002). Las secuencias indexadas en la memoria del servidor pueden estar ligadas a una base de datos mayor que, en el caso de CNS, contiene la información que se considera relevante de la secuencia.

Con este programa se revisó el genoma de *V. vinifera* cv. Pinot para buscar la ubicación de los genes que dan origen a los 5 EST relacionados con Oxidasas Alternativas encontrados en la base de datos de Genomics Facilities (tabla A.1)

EST	ALIAS
CTG1030354	AOX54
CTG1037264	AOX64
CTG1039659	AOX59
CTG1030353	AOX53
CTG1035923	AOX23

Tabla A.1: muestra los ensamblajes de EST encontrados en la base de datos de Genomic Facilities y el Alias asignado para hacer más fácil la nomenclatura

Por los primeros análisis realizados con estas secuencias se sabía que AOX54 estaba contenida en AOX53 y que las secuencias AOX23, AOX59 y AOX64 podrían provenir de distintos genes, ya que fue imposible ensamblarlas utilizando el programa Contig Assambly Program (CAP; Huang, 1991) o lograr un buen alineamiento con Clustal X.

Los resultados obtenidos al utilizar estas 5 secuencias contra la base de datos de CNS con BLAT, mostraron similitud redundante con 3 secuencias de genes predichos en el genoma de *V. vinifera*. Las secuencias encontradas fueron: GSVIVT00000267001, GSVIVT00003172001 y GSVIVT00003173001. Las últimas 2 secuencias se encuentran en el mismo cromosoma a 3,3 kpb de distancia y en sentidos opuestos, en tanto que la disposición y tamaño de exones e intrones de estos genes son similares (Tabla A.2).

AOX	Exon 1	Intron 1	Exon2	Intron 2	Exon 3	Intron 3	Exon 4
GSVIVT00003172001 (AOX53)	(285bp)	(509bp)	(129bp)	(726bp)	(489bp)	(50bp)	(60bp)
GSVIVT00000267001 (AOX59)	(285bp)	(3192bp)	(129bp)	(7504bp)	(489bp)	(50bp)	(60bp)
GSVIVT00003173001 (AOX23)	(291bp)	(80bp)	(129bp)	(109bp)	(489bp)	(94bp)	(60bp)

Tabla A.2: muestra la estructura de los genes de AOX. Todos cuentan con 4 exones y tres intrones de similar tamaño.

Al revisar los resultados se observó que como se esperaba AOX53 y AOX54 alineaban con una misma secuencia (GSVIVT00000267001) y AOX23 presentaba alta identidad con una secuencia (GSVIVT00003173001). Mientras que AOX64 y AOX59 alinearon con una sola secuencia (GSVIVT00003172001) (Figura A.1).

Para entender por que AOX59 y AOX64 aparecen como entradas distintas en Genomic Facilities, siendo que serian parte del mismo gen, se procedió a ensamblar las tres secuencias (GSVIVT00003172001, AOX59 y AOX64) con el programa CAP. De esta forma se encontró que AOX59 y AOX64 no se podían entender como un solo gen, ya que sólo hay 15 nucleótidos solapados entre ambas secuencias (Figura A.2).

Interesados en otras secuencias de AOX en el genoma se realizó otra búsqueda para encontrar posibles genes de AOX, sin embargo esta búsqueda fue infructuosa.

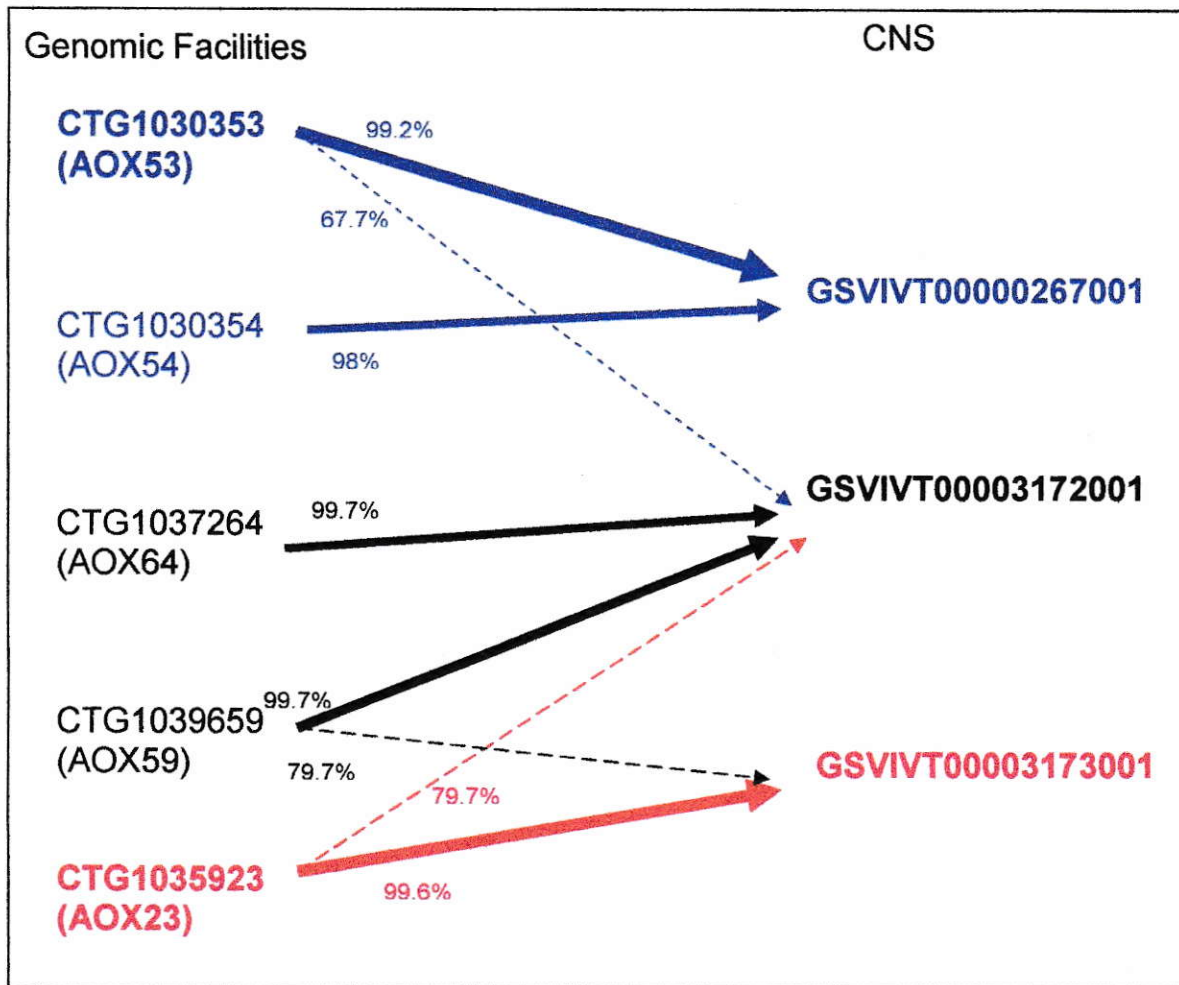


Figura A1: representación de los alineamientos de las 5 secuencias de transcritos de Genomic Facilities y los tres genes predichos encontrados en CNS. Cada uno de los colores indica a cual de las tres secuencias genómicas son similares. Las flechas continuas indican que es el alineamiento con mayor puntaje, las flechas punteadas indican el segundo hit. Los números bajo las flechas indican el porcentaje de identidad.

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 425      435      445      455      465      475      485      495      505      515      525
aox59
GSVIVT0000 GGTATGGACT GAGAAAGTAG CTTATTGGGG AGTGAAAATG CTCCGACTCC CCACTGATAT CTTCTTCAAG AGAAGGTTTG AAATGCGAGC AATGATGCTA GAAACCGTAG
AOX64      GGTATGGACT GAGAAAGTAG CTTATTGGGG AGTGAAAATG CTCCGACTCC CCACTGATAT CTTCTTCAAG AGAAGGTTTG AAATGCGAGC AATGATGCTA GAAACCGTAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 535      545      555      565      575      585      595      605      615      625      635
aox59
GSVIVT0000 CGGCAGTGCC TGGCATGGTG GGAGGGATGC TCCTGCACTG CAAGTCGCTG AGGCGGTTTC AGCACAGCGG CGGATGGATC AGAGTACTCC TAGAAGAAG- CGAGAACGAG
AOX64      CGGCAGTGCC TGGCATGGTG GGAGGGATGC TCCTGCACTG CAAGTCGCTG AGGCGGTTTC AGCACAGCGA CGGATGGATC AGAGGACTC-----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 645      655      665      675      685      695      705      715      725      735      745
aox59
GSVIVT0000 CGGATGCA-C TCATGA-CTT CATGGAAGTA GCCAAGCCCC GGT-GTACGA GCGCGCCCTT GTTTTCGCAG TTCAAGGCAT TTTCTGGAAC TTTTACTTCG TTGCCTACGT
GSVIVT0000 CGGATGCACC TCATGACCTT CATGGAAGTA GCCAAGCCCC GGTGGTACGA GCGCGCCCTT GTTTTCGCAG TTCAAGGCAT TTTCTGGAAC TTTTACTTCG TTGCCTACGT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 755      765      775      785      795      805      815      825      835
Aox59
GSVIVT0000 GATCTCTCCC AAAGTCGCCC ACCGCGCTGT CGGCTATCTG GAAGAGGAGG CCATACACTC CTACAATGAA TTCATAAAG AGCTCGACAG
AOX64      GATCTCTCCC AAAGTCGCCC ACCGCGCTGT CGGCTATCTG GAAGAGGAGG CCATACACTC CTACAATGAA TTCATAAAG AGCTCGACAG

```

Figura A.2: Ensamble de las secuencias AOX59, AOX64 y GSVIVT00003172001 utilizando el programa CAP. En amarillo se observa el segmento de secuencia compartida por las tres secuencias. Se muestra solo la parte del ensamble en que las tres secuencias se solapan.

	5	15	25	35	45	55	65	75
AOX59	MMMSRSAMK~	LLSTATV~RT	IHGGGEFRRG	FFALGARNLS	STVSAVREKP	QTEPGSRSA	GHSSFEGGDK	SVVSYWGVAP
AOX53	MNQLVARSLM	RGLINGAKCN	RSILCSVTRV	ELRDEKAAFG	RMMSTETALA	EKNQKEKSVE	EVEKQS~~KV	VFSSYWGVIQR
Aox23	MNHSAMAKVS	GLLLRKVSPQ	ASRFSRPAYM	GWMTVHPMPA	REQSTLASGD	AKEEKPIQVP	KTGSENGEQK	AIVSYWGVPP

	85	95	105	115	125	135	145	155
AOX59	VKLT KEDGTE	WKWSC CFKPSE	AYKADVS IDL	GKHHVPRVWT	EKVAYWGVKM	LRLPTD IFFK	RRFEMRAMML	ETVAAVPGMV
AOX53	PKIT TREDGSP	WPWNC FMPWE	TYHADTA IDL	SKHHVPKTFV	DKVAYRTVKL	LRIPTD IFFQ	RRYGCRAMML	ETVAAVPGMV
Aox23	ANLT KEDGSP	WKWHC FRPWE	TYKADIS IDV	EKHHKPVKFM	DKFAYWTVQA	LKIPTH MFFQ	RKHMCHAMLL	ETVAAVPGMV

	165	175	185	195	205	215	225	235
AOX59	GGMLLHCKSL	RRFEHSGGWI	RVLLEEAENE	RMHLMT FMEV	AKPRWYERAL	VFAVQGI FWN	FYFVAYVISP	KVAHRAVGYL
AOX53	GGMLLHLRSL	RKFEHSGGWV	KALLEEAENE	RMHLMT VMVEL	VRPKWYERLL	VLTVQGV FFN	AFFVLYVLSP	KAAHRVVGYL
Aox23	GGMLLHCQSP	RRFEQSGGWI	KALLEEAENE	RMHLMT FIEL	AKPQWYERAI	VFAVQGV FFN	AYFLTYLASP	KVAHRITGYL

	245	255	265	275	285	295	305	315
AOX59	EEEAIHSYNE	FIKELDSGNI	PNVPAPAI AI	DYWRLAPD ST	LRDVVMV VRA	DEAHRD VNH	YASDIHY QGL	QLKEFPAP LG
AOX53	EEEAIHSYTE	FLKDIDSGAI	ENVPAPAI AI	DYWRLPKD AT	LKDVITV VIRA	DEAHRD VNH	FASDIHF QGK	KLNEAPAP IG
Aox23	EEEAVRSYTE	FLKDLN GSF	ENVPAPAI AI	DYWRLPAE ST	LRDVVEV VIRA	DEAHRD VNH	YASDIQ CQGH	QFKDVPAP LG

AOX59	YH							
AOX53	YH							
Aox23	YH							

Figura A.3: alineamiento de las tres secuencias aminoácidas de AOX encontradas en CNS y nombradas según corresponden a las secuencias de Genomic facilities (EST). En amarillo los aminoácidos idénticos.

Secuencias promotoras

Además de la composición de intrones y exones, en CNS es posible obtener la secuencia UTR 5' (región no traducida 5') para analizar las regiones promotoras de estos genes. Utilizando la página de PlantCARE es posible hacer una búsqueda de los posibles elementos cis la secuencia URT 5'.

En la página de PlantCARE existen dos opciones. La primera es utilizar un módulo llamado Motif Sampler, la cual consiste en la comparación de las secuencias UTR 5' de varios genes que tienen un patrón de expresión similar (Thijs y col, 2002). En nuestro caso no tenemos acceso a una base de datos que nos indique que genes de vitis están expresando se de manera similar a nuestras AOX, por tanto no nos es posible utilizar esta herramienta.

La segunda opción que tiene esta página es una búsqueda por similitud con otros elementos cis descritos en otras o la misma especie (Rombauts y col, 1999). El análisis de los resultados fue engorroso, ya que se encuentran para AOX23 (por ejemplo): 5 posibles cajas TATA en los primeros 200 pb desde el extremo cercano al inicio de la traducción y más de 10 sitios de unión a distintos elementos regulados por luz. Por lo anterior se muestran solo algunos de los elementos de mayor relevancia.

Si bien todos los elementos de la base de datos que se encontraron en nuestras secuencias pertenecen a plantas de otras familias (como tabaco, coliflor y arabidopsis), este sistema es el más recomendado en nuestro caso y ha sido citado en trabajos realizados en plátano, duraznos, alamo y uva (Fong-Chin y col, 2004; Wisniewski y col, 2005; Qiang y col, 2006; Verries y col 2004). En el caso del trabajo con uva, se trata del análisis del promotor del gen de adh2, donde se identificaron varios elementos regulatorios. En este caso se colocó el gen GUS bajo el control de diferentes fragmentos

del promotor.

Lo que es destacable, ya que no era esperado al momento de hacer la búsqueda, es la cantidad de posibles elementos regulados por luz, que son demasiados para pasarlos por alto. Otra de las funciones que se le ha asignado a las AOX es la de regular de especies reducidas en la hoja durante la fotosíntesis, en especial cuando son expuestas a demasiada luz y las condiciones ambientales no son las más favorables (Atkin y col 2000; Hurry y col 1995), además la inhibición de la AOX y el complejo IV disminuye el nivel de fotosíntesis en cebada (Kromer y col, 1993). Es posible, por tanto, que AOX53 AOX23 y AOX64 se expresen en las hojas y su expresión sea regulada por luz.

El URT 5' de AOX53 es la una de las tres secuencias que presenta un motivo de respuesta a bajas temperaturas (LTR; figura A.4.b), dando un antecedente más a que AOX53 efectivamente puede expresarse por bajas temperaturas.

La región promotora de AOX23, por su parte, presenta dos elementos relacionados con estrés: HSE, shock térmico; y TCA, ácido salicílico (figura A.4.a). El ácido salicílico es un intermediario en las señales de estrés de varios tipos (Halim y col, 2006; Horváth y col 2007) y parte de la respuesta a shock térmico están mediadas por H₂O₂ (Volvok y col, 2006). También esto acompaña los resultados experimentales que indican que AOX23 se expresa bajo condiciones de estrés.

En conclusión, la estructura de los genes es altamente conservada y el análisis de la región promotora confirma los resultados observado en la parte experimental.

Figura A.4.a: Analisis de la región promotora de AOX23. No se indican: los elementos encontrados en el sentido invertido y elementos CAAT.

AOX23

aaataaaaagtaatcaattttatttttaaaattcacatctttatttttacattttttattcttat
 ttatcataattacctctacgattttttttgctattttcatgatctttactgttatttgacc
 tcctttgccctaattataattttatgaaaataaatatatacaattttatgaattttaaaataaa
 ttttaagttaattttatcaaataatcttttaaaataaaaatgcacatcttaaaataacatt
 tctaaagtataatctttgaaatgttattatatataatggtatgtttatatttagtttg
 ttaaataaa **aaaaaaatgg**tttcaatgtctcatatatttgcctaaaataaaaattatatt
 atattccaatattttttatttaa **aataaaaaagaatt**ttttttttacatttaacaatatt
 tatgaataaaaatattttaaaattttataaataatccttttatattatgttacttaataataaa
 caataaatatataattattattttttatatttttttagttcttttttcaaccacagatt
 tattttttcaatc **aaat**tattct **tgtaaaaataaat**tatataaaaataataaaaa
 atgattaaaaataaaattttttatatttttcaactaatcaagattaagtatcttgagtta
 aaatga **tttgaaaacgt**tgataaatatattttatcacttatcatattttatattttggtg
 gatatacatattacatccaaccaaccaaatacagagattaataaaaactaatatataatt
 aactaaagacttctactctaccatattgtatttaacttaatttctatccaatatttcaa
 gagatcaatc **aaat**tttaaaaaacaaataataataataaacacaattgtagaag
 gttgcttagttaccattgcagaatattgttaccaccttagaaagttgtgtccgagctt
 tgcaagaaagcaagtcaaactggaagtccatggaatctg **aaat**tctaggctc
aaatactcttcaaactgtggacagcaattgttagctaagaactatccatc **atataaa**
 accaaaaatcattgctcaacaaattcgtacaaactcaaatcattctttcaaactctctca
 agtgttgatcgatcttttttctactgttgcaattttttgtcaactccgaca **atg**

- GCTA** Caja tata
- GCTA** Motivo AT1, parte de los modulos de respuesta a luz
- GCTA** Caja I, elemento de respuesta a luz
- GCTA** Caja G, elemento cis involucrado en la respuesta a luz
- GCTA** Motivo GT1, elemento de respuesta a luz
- GCTA** SP1, elemento de respuesta a luz
- GCTA** HSE, elemento de respuesta a estrés termico
- GCTA** Elemento TCA, elemento involucrado e la respuesta a acido salicilico

Figura A.4.b: Analisis de la región promotora de AOX53. No se indican: los elementos encontrados en el sentido invertido y elementos CAAT.

AOX53

```

aagaagcatagaggaaggtttgaaagaattaattcataaataataaaagcatatTTTTTTA
tgaaataatggtacatggtgttTCTTCTGAGCAAGTTGAGAAGTTTGcattagattaag
TTTATTACCTAACTCCTCCATGTGCCTT GCTA GCTA cccacctagtatcgtatagata
cagatgTtatgTtatatcctgtaccaaacaaggctTTTTATTTTTCTATTTTTTGGAAAA
agaacaagtggaaaattaaaattgagctTTtagcTTtagcatggagagtaaaaagcgtcac
gtgatgacgaagtccgtctcctgccaatgttccgtggcaagccgaaaTcctcgtgactt
ggcctcaagtttagagccccgcTcatctagagttctccgaaaagtcaagggcattatg
gtctTgtgaa acgtgggtttataaaaattcccgacca TAC cga TctcaccTgcctcca
cattTTTTTCTCTCTCCACTGTCCAAAACCCCAATAATAAAGTGAT caacggTGGATAAA
aggacaagcaaattaagatggtacgtcactaaccatcagatactctctcctctcggcagt
tcttctctctcgcctTgtgtcattgtctTgaaccctcccacaagtcacagcccacgtc
ttatTTTTTCTCCAAAACCCCAATCAAC TTTAgactcaccagTTTTGTGGAGTTTCCC
aattTgtTggcagctctgaag atgaatcagttagttgcaagatcactgatgCGAGGCCTG
atcaatggcgccaaaatgcaaccgTtccattTTTGTGCTCGGTAACCAGAGTAGAGTTGAGG
gatgaaaaggcagcgtTTTGGGAGGATGATGAGCACGGAGACAGCATTGGCGGAGAAGAAT
cagaaaagaaaagtcggtggagggaagtggagaagcagagtaaggTTGTGTTCTCGAGCTAC
tggggaattcagcggcctaagatcaccagagaagatggga
    
```

- GCTA** LTR, elemento de respuesta a bajas temperaturas
- GCTA** ABRE, elemento de respuesta a acido absícico
- GCTA** Caja TATA
- GCTA** Caja G, elemento de respuesta a luz
- GCTA** Caja L, elemento de respuesta a luz
- GCTA** Motivo TGACG, elemento de respuesta a acido metil-jasmonico
- GCTA** Caja CCAAT, sitio de union a MYB (elemento de respuesta a luz)
- ATG** inicio de la traducción

1. Clotilde Verries, Martine Pradal, Philippe Chatelet, Laurent Torregrosa and Catherine Tesniere, Isolation and analysis of the promoter of VvAdh2, a grapevine (*Vitis vinifera* L.) ripening-related gene, *Plant Science* 167(5): 1067-1074. 2004
2. Fong-Chin Huang, Yi-Yin Do, and Pung-Ling Huang Genomic Organization of a Diverse ACC Synthase Gene Family in Banana and Expression Characteristics of the Gene Member Involved in Ripening of Banana Fruits *J. Agric. Food Chem.*, 54 (11): 3859 -3868, 2006.
3. Halim, V.A., Vess, A., Scheel, D., Rosahl, S. The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. *Plant Biology* 8 (3): 307-313 2006
4. Horváth, E., Szalai, G., Janda, T. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signalling. *Journal of Plant Growth Regulation* 26 (3): 290-300 2007
5. Huang X. A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. *Genomics* 14 (1): 18-25. 1992
6. Jaillon, O., Aury, J.-M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C. Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Huguency, P. Dasilva, C., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyère, C., Billault, A., Segurens, B., Gouyvenoux, M., Ugarte, E., Cattonaro, F., Anthouard, V., Vico, V., Del Fabbro, C., Alaux, M., Di Gaspero, G., Dumas, V., Felice, N., Paillard, S., Juman, I., Moroldo, M., Scalabrin, S., Canaguier, A., Le Clainche, I, Malacrida, G., Durand, E., Pesole, G., Laucou, V., Chatelet, P., Merdinoglu, D., Delledonne, M., Pezzotti, M., Lecharny, A., Scarpelli, C., Artiguenave, F., Pè, M.E., Valle, G., Morgante, M., Caboche, M., Adam-Blondon, A.-F, Weissenbach, J., Quétier, F., Wincker, P. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla *Nature* 449 (7161): 463-467. 2007
7. Kent, W.J. BLAT - The BLAST-like alignment tool. ***Genome Research* 12(4): 656-664. 2002**
8. Michael E. Wisniewski, Carole L. Bassett, Jenny Renaut, Robert Farrell, Jr., Thomas Tworkoski and Timothy S. Artlip Differential regulation of two dehydrin genes from peach (*Prunus persica*) by photoperiod, low temperature and water deficit *Tree Physiology*, 26:575–584 2005
9. Qiang Chenga, Bo Zhanga, Qiang Zhugea, Yanru Zengb, Mingxiu Wangc and Minren Huangd, Expression profiles of two novel lipoxygenase genes in *Populus deltoides* *Plant Science* 170 (6): 1027-1035. 2006
10. S. Rombauts, P. Dehais, M. Van Montagu and P. Rouze PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database. *Nucleic Acids Res.* 27(1): 295-296. 1999
11. Stefanie De Bodt, Guenter Theissen and Yves Van de Peer Promoter Analysis of MADS-Box Genes in Eudicots Through Phylogenetic Footprinting *Molecular Biology and Evolution* 23(6):1293-1303 2006
12. Thijs G, Marchal K, Lescot M, Rombauts S, De Moor B, Rouze P, Moreau Y. A gibbs sampling method to detect overrepresented motifs in the upstream regions of

coexpressed genes. *J Comput Biol.* 9(2):447-464 2002

13. Vasyukova, N.I., Ozeretskovskaya, O.L. Induced plant resistance and salicylic acid: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 43 (4): 367-373 2007
14. Volkov, R.A., Panchuk, I.I., Mullineaux, P.M., Schoffl, F. Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 61 (4-5): 733-746. 2006