

UCH-FC
Biotecnología
P 222
C 1



Escuela de Pregrado
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

Cambios en el metabolismo energético en yemas de *Vitis*
vinifera durante la transición de paradormancia a
endodormancia

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

María Francisca Parada Ramírez

Director del Seminario de Título: Dr. Francisco J. Pérez Correa

Noviembre 2015

Santiago-Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato:

MARÍA FRANCISCA PARADA RAMÍREZ

“Cambios en el metabolismo energético en yemas de *Vitis vinifera* durante la transición de paradormancia a endodormancia”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Francisco Pérez Correa
Director Seminario de Título

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Francisco Pérez Correa', written over a horizontal line.



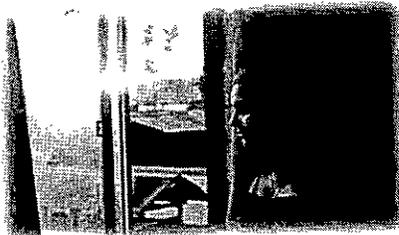
Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Michael Handford
Presidente

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Michael Handford', written over a horizontal line.

Dra. Claudia Stange Klein
Evaluadora

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Claudia Stange Klein', written over a horizontal line.



Creo que nadie te conoce tanto como tu mejor amigo, por eso le pedí a Kathy que escriba mi biografía:

“Nos conocimos el 2010 en un asado de bienvenida a los “mechones”, tenía un look particular, su pelo siempre largo y sonrisa amistosa. Empezamos a conversar y nos caímos bien, se convirtió en mi madrina Biotec y con eso comenzó nuestra amistad. Recuerdo cuando me pasó su cuaderno de Botánica con sus apuntes, ahí sospeché que le gustaban las plantas, lo que confirmé cuando se convirtió en mi ayudante de los laboratorios de ese ramo, esos felices viernes de ver algas, flores y frutas. Tuvimos varios ramos juntas, nos apoyamos mutuamente y entendimos que seríamos la mejor dupla para hacer los trabajos, laboratorios y para contarnos la vida. Con el tiempo fui descubriendo varios detalles de su vida, como que le gusta mucho la música, que viene de Melipilla, que ama los animales y es vegana, que es una persona muy sincera y empática, con facilidad para hacer amigos (¡es increíble el número de gente que la saluda en los pasillos de la facultad!) y siempre está preocupada de ellos. Un verano de hace algunos años me comentó muy entusiasmada que había logrado entrar a hacer investigación al laboratorio de Bioquímica Vegetal, siempre tuvo claros sus intereses y dio los pasos correctos para lograrlos; soy testigo de todo el amor y dedicación que puso en ese trabajo y de los logros que obtuvo gracias a su constancia y esfuerzo. Muchas veces la vi darle más horas al día para cumplir con los ramos y con

los experimentos, le sugerí que bajara su exigencia, pero ella dio mucho más, logró cumplir con todo y de la mejor manera posible. La vi muy contenta también cuando adoptó a Tavo, su hijo erizo de tierra, al que ama y cuida como mamá; sé que Tavo llegó a darle mucha felicidad. El año 2014 me sorprendió con su participación en la organización del Primer Congreso de la Facultad de Ciencias, una vez más nos demostraste a todos los que te conocemos como eres cuando algo te apasiona y estoy segura que muchas más personas se inspiraron con tu dedicación. Aprendí muchas cosas de ella, le agradezco que haya sido mi ayudante en Botánica y Fisiología Vegetal, ha sido la mejor y estoy segura que sus alumnos del preuniversitario Víctor Jara y de las clases que realiza piensan lo mismo de sus capacidades pedagógicas y su actitud personal. Lamento mucho haberte "abandonado" con mi cambio de carrera, haberte dejado sola en esos ramos que faltaban para terminar la carrera y romper nuestro buen equipo de trabajo y estudio, pero estoy muy orgullosa de ti y de todo lo que has hecho durante tu paso por la Universidad, estás a punto de cerrar un ciclo en el que afortunadamente pude ver como día a día te esforzabas por ser mejor, por vencer los miedos, el nerviosismo y todas esas preocupaciones que te impedían brillar como brillas ahora. "Hay que tener fe", tienes que confiar en ti misma, con tu forma de ser, tu sentido de la responsabilidad, humildad y perseverancia llegarás donde te lo propongas y serás la mejor del área (son hechos "científicamente" comprobados jaja). Te admiro mucho, estoy feliz de haberte conocido y que me hayas inspirado a seguir mis sueños. Gracias por ser la mejor amiga, compañera y ayudante de nuestro paso por la Facultad de Ciencias. Seguiremos siendo amigas, aunque ya no estemos en el mismo lugar, siempre habrá algo que contar. ¡Mucho éxito en todo!

Katherinne Rojas Berríos"

A mis amigos, por no permitir que me rindiera

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis compañeros y amigos de laboratorio, por su ayuda y compañía: Ricardo V, Seba R, Luisa R, Ximena N, Karla A. A mi profe por toda su ayuda y comprensión

Gracias a mis amigos por acompañarme todos estos años con su cariño y consejo, todo se lo debo a ustedes: Cami F, Vale G, Erick A, Ignacio M, Kathy R, Nico V, Kary O, Ernesto L, Dani G, Gerardo S, Dani F, Diego P, Bryan R, Nico S y quizás varios más que no he nombrado

A mis papás por apoyarme a pesar de todo

A Daniel y su familia por todo su cariño y apoyo en estos años

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Antecedentes generales.....	4
Ciclo de crecimiento-dormancia	4
Dormancia de yemas en vides	5
Regulación medioambiental de la dormancia en yemas.....	7
Control hormonal de la dormancia en yemas	9
Metabolismo energético y dormancia en yemas de vid	11
Hipótesis	16
Objetivos	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Estado de dormancia de las yemas.....	18
Medición de la tasa de respiración de las yemas	19
Cuantificación de niveles de azúcares y almidón	20
Tratamientos de fotoperiodo.....	21
Tratamientos de hipoxia	22
Purificación de ARN y síntesis de cDNA	22
Búsqueda de secuencias génicas en bases de datos y diseño de primarios para RT-qPCR	23
Análisis de expresión génica por PCR en tiempo real (RT-qPCR).....	24
Análisis estadístico.....	25
RESULTADOS	26
Comparación entre la respiración y la dormancia en yemas de vid a lo largo del ciclo anual de crecimiento	26
Efecto de la transición de PD a ED y del fotoperiodo sobre la expresión de genes relacionados a la fermentación (<i>VvADH2</i>) y a la vía de las pentosas fosfato (<i>VvG6PDH</i>).....	27

Efecto de la transición de PD a ED y del fotoperiodo sobre la expresión de genes de la ruta biosintética de almidón y en el contenido de almidón en yemas de vid.....	30
Niveles de azúcares solubles en yemas durante la transición de PD a ED	31
Efecto de la transición de PD a ED y del fotoperiodo sobre la expresión de genes relacionados a la respiración aeróbica (ciclo TCA y mETC) en yemas de vid.....	33
Efecto de la temperatura sobre la tasa de consumo de oxígeno en yemas para- y endodormantes	35
Efecto de compuestos rompedores de dormancia sobre la tasa de consumo de oxígeno en yemas endodormantes	36
Efecto de la glucosa sobre la tasa respiratoria de yemas	37
Efecto del ácido abscísico sobre la tasa respiratoria y en los niveles de azúcares solubles de yemas de vid paradormantes	38
Efecto de la hipoxia, ABA y transición hacia la ED sobre los niveles de expresión de los genes <i>VvSnRK1</i> en yemas de vid.....	40
Efecto del fotoperiodo sobre la expresión del gen <i>VvNCED3</i> de la ruta biosintética de ABA en yemas de vid	43
DISCUSIÓN.....	44
La tasa respiratoria de las yemas de vid está inversamente relacionada con la profundidad de la dormancia	44
ABA como un regulador clave en la dormancia de yemas de vid	48
CONCLUSIONES.....	51
PROYECCIONES.....	53
PRESENTACIONES EN CONGRESOS	53
BIBLIOGRAFÍA.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Partidores utilizados en los experimentos de RT-qPCR.....24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo anual de crecimiento de la vid	7
Figura 2 Vías metabólicas del catabolismo de la glucosa 6-fosfato.....	15
Figura 3 Tasa de respiración [nmol O ₂ min ⁻¹ GPF] de yemas de <i>Vitis vinifera</i> cv. Thompson Seedless a lo largo del ciclo anual en comparación a la profundidad de dormancia de las mismas establecida de acuerdo a su BR ₅₀ (días).	27
Figura 4 Efecto de la transición de PD a ED y del fotoperiodo sobre la expresión de los genes <i>VvADH2</i> y <i>VvG6PDH</i> en yemas de <i>Vitis vinifera</i>	29
Figura 5 Efecto de la transición de PD a ED y del fotoperiodo sobre la expresión de los genes de la ruta biosintética de almidón; y contenido de almidón a lo largo del ciclo de crecimiento en yemas de <i>Vitis vinifera</i>	31
Figura 6 Niveles de azúcares solubles glucosa, sacarosa y fructosa en yemas de <i>Vitis vinifera</i> cv. Thompson seedlees	32
Figura 7 Efecto de la transición de PD a ED y del fotoperiodo sobre la expresión de los genes relacionados a la respiración aeróbica	34
Figura 8 Efecto de la temperatura sobre la tasa de consumo de oxígeno de yemas endodormantes y paradormantes de <i>Vitis vinifera</i> cv. Thompson Seedless	36
Figura 9 Efecto de los compuestos rompedores de dormancia, cianamida hidrogenada (H ₂ CN ₂) y azida de sodio (NaN ₃) sobre la tasa respiratoria de yemas endodormantes de nodo único de <i>Vitis vinifera</i> cv. Thompson Seedless.	37
Figura 10 Efecto de la glucosa sobre la tasa de consumo de oxígeno en A) yemas paradormantes y B) yemas endodormantes de <i>Vitis vinifera</i> cv. Thompson Seedless ..	38
Figura 11 Efecto del ácido abscísico (ABA) sobre la tasa respiratoria de yemas de <i>Vitis vinifera</i> cv. Thompson Seedless.....	39
Figura 12 Efecto del ácido abscísico (ABA) sobre los niveles de azúcares solubles en yemas paradormantes de <i>Vitis vinifera</i> cv. Thompson Seedless	40
Figura 13 Efecto de la hipoxia, ácido abscísico (ABA) y transición hacia la ED sobre los niveles de expresión de los genes <i>VvSnRk1</i> en yemas de <i>Vitis vinifera</i> cv. Thompson Seedless.....	42
Figura 14 Efecto del fotoperiodo sobre la expresión de <i>VvNCED3</i> en yemas de vid...	43

LISTA DE ABREVIATURAS

- 1,4-GB: enzima ramificadora de almidón (1,4-glucose branching)
- ABA: ácido abscísico
- ACO: aconitasa o aconitatohidratasa
- ADH: alcoholdehidrogenasa
- AGPase: ADP-glucosapirifosforilasa (ADP-glucosepyrophosphorylase)
- ARN: ácido ribonucleico
- ATP: adenosíntrifosfato
- BLAST: herramienta básica de búsqueda de alineamiento local (Basic Local AlignmentSearchTool)
- BLAT: herramienta de alineamiento tipo Blast (Blast-LikeAlignmentTool)
- BR₅₀: tiempo medio para que ocurra la brotación del 50% de una población de yemas bajo condiciones forzadas de brotación
- BSTFA: N,O-Bis (Trimetilsilil) Trifluoroacetamida
- cDNA: DNA complementario
- CITC: citocromo c
- COX: citocromooxidasa
- CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio (CetilTrimethylAmmoniumBromide)
- dNTP: deoxinucleótidostrifosfato
- ED: endodormancia
- EDTA: ácido etileno diaminotetraacético (EthyleneDiamideTetraceticAcid)
- EST: marcador de secuencia expresada (expressedsequencetag)
- FC: fotoperiodo corto
- FID: detector de ionización de llama (FlameIonization Detector)
- FL: fotoperiodo largo
- FUM: fumarasa o fumaratohidratasa

G6PDH: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (glucose 6-phosphate dehydrogenase)
GC: cromatografía de gases (gas chromatography)
GPF: gramos de peso fresco
H₂CN₂: cianamida hidrogenada
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
mETC: cadena transportadora de electrones mitocondrial (mitochondrial electron transporter chain)
NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleótido
NaN₃: azida de sodio
NCED: 9-cis-epoxycarotenoide dioxygenasa (9-cis epoxy carotenoid dioxygenase)
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PD: paradormancia
Q₁₀: cambio proporcional en la respiración cada 10 °C de aumento en la temperatura
RF: requerimiento de frío
RT-qPCR: PCR cuantitativo en tiempo real
SnRK1: SNF Related Kinase (*sucrose-non-fermenting-1-related*)
SS: almidón sintasa (starch synthase)
TCA: ciclo de los ácidos tricarbóxicos (tricarboxylic acid cycle)

RESUMEN

La endodormancia (ED) es un rasgo de las plantas leñosas de clima templado que se manifiesta en respuesta a estímulos medioambientales como las bajas temperaturas, el acortamiento del fotoperiodo o la deshidratación, y se caracteriza por una detención temporal del crecimiento, permitiendo así la sobrevivencia de las plantas durante el periodo invernal. En la vid (*Vitis vinifera* L.), se ha demostrado que la ED es inducida bajo condiciones de fotoperiodo corto (FC), donde las yemas presentan cambios metabólicos que les permite soportar las bajas temperaturas invernales.

En este estudio, se encontró una relación inversa entre la profundidad de la ED y la tasa de consumo de oxígeno en yemas de vid. Además, se encontró que genes que codifican para enzimas relacionadas con la respiración aeróbica disminuyen su expresión en respuesta al FC, mientras que genes que codifican para enzimas relacionadas con vías del metabolismo del carbono, incluyendo la biosíntesis de almidón, aumentan su expresión. Por otra parte, estímulos como el incremento en la temperatura o la adición de glucosa, que normalmente aumentan la tasa respiratoria en los tejidos vegetales, como en yemas paradormantes, tuvieron un efecto muy débil o ninguno sobre la tasa respiratoria de yemas endodormantes, sugiriendo la presencia de un inhibidor respiratorio o metabólico dentro de estas yemas. En este trabajo, proponemos que dicho inhibidor podría corresponder al ácido abscísico (ABA), ya que la aplicación de esta fitohormona disminuye la tasa respiratoria de yemas paradormantes y aumenta los niveles de expresión del gen *VvSnRK1*, que codifica

para una enzima perteneciente a una familia de proteínas kinasas conocidas por su papel como sensor energético, promoviendo tolerancia al estrés y la sobrevivencia.

Finalmente, se observó que el FC también induce la expresión del gen *VvNCED3*, que codifica para la enzima 9-cis-epoxicaroteno dioxigenasa, enzima clave en la biosíntesis de ABA. Así ABA, a través de *VvSnRK1* podría jugar un rol importante en la regulación de los cambios metabólicos que acompañan la ED en yemas de vid.

ABSTRACT

Endodormancy (ED) is a feature of temperate woody plants that manifests in response to environmental stimuli such as cold temperatures, photoperiod shortening or dehydration, and is characterized by a temporary growth arrest, thus permitting the survival of plants during the winter period. In the grapevine (*Vitis vinifera* L.), it has been demonstrated that ED is induced under short-photoperiod (SP) conditions where buds show metabolic changes that allow them to cope with low winter temperatures.

In this study, an inverse relationship between the depth of ED and the rate of oxygen consumption was found in grapevine buds. Furthermore, it was found that genes coding for enzymes related in its aerobic respiration decreased their expression levels in response to SP, whereas genes that encode for enzymes related to carbon metabolism, including starch biosynthesis, are upregulated. On the other hand, stimuli such as temperature rise or the addition of glucose, that normally increase the respiratory rate of plant tissue, as in paradormant buds, had little or no effect on the respiratory rate of endodormant buds, suggesting the presence of a metabolic or respiratory inhibitor within these buds. In this work, we propose that this inhibitor could correspond to abscisic acid (ABA), since the application of this phytohormone reduces the respiratory rate in paradormant buds and increases the expression level of *VvSnRK1*, that encodes for an enzyme belonging to a family of protein kinases known for its role as energy sensors, promoting stress tolerance and survival. Finally, it was observed that a SP also induces the expression of *VvNCED3*, coding for the enzyme 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, which is a key enzyme in ABA biosynthesis. Thus, ABA,

through the mediation of *VvSnRK1*, could play an important role in the regulation of metabolic changes accompanying ED in grapevine buds.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes generales

La familia Vitaceae comprende alrededor de 1000 especies asignadas a 17 géneros distintos que son típicamente arbustos o lianas leñosas que trepan usando sus tendriles o zarcillos. Aunque la mayoría de las especies reside en zonas tropicales y subtropicales, tan solo algunas especies de climas templados lideran el mercado mundial para la producción tanto de vinos, pasas, uva fresca o jugos. El género *Vitis* comprende alrededor de 60-70 especies, y *Vitis vinifera* L., es la especie más cultivada hoy en día (Keller M, 2015).

Ciclo de crecimiento-dormancia

El hábito de crecimiento de las plantas perennes leñosas en zonas templadas está caracterizado por alternar períodos de crecimiento y dormancia en respuesta a las fluctuaciones estacionales en las condiciones medioambientales como la temperatura y el fotoperiodo (Rohde & Bhalerao, 2007). Estas plantas desarrollan anualmente órganos complejos llamados yemas, las que poseen un meristema apical (SAM) encargado de mantener la población de células troncales o madres (Cooke y col., 2012). *Vitis vinifera* produce dos tipos de yemas en cada axila foliar, una yema simple que es axilar a la hoja (yemas axilares o laterales); y una yema compuesta, formada por la yema primaria y dos yemas más pequeñas llamadas secundarias, que se encuentran protegidas por bracteólas; estas yemas compuestas son también llamadas dormantes o latentes (Morrison J, 1991). Las yemas compuestas crecen formando tallos solo después de pasar por un período de dormancia, mientras que las yemas laterales no entran en dormancia sino que elongan hacia tallos laterales o son

abortadas el mismo año en que son iniciadas. El meristema de la yema latente se diferencia hacia todos los elementos básicos de los brotes incluyendo el primordio indiferenciado el que se puede desarrollar hacia inflorescencia o tendrilos (Mullins y col., 1992). Sin embargo, este proceso de diferenciación celular se ve interrumpido por la entrada de las yemas latentes a la endodormancia (ED), periodo durante el cual el meristema entra en receso. Al final de la ED, el meristema retoma su actividad y las yemas reanudan el crecimiento de los brotes asociados con el desarrollo y la formación de flores (Morrison J, 1991).

Dormancia de yemas en vides

La dormancia de yemas evolucionó como una estrategia morfogénica y secundariamente fue adoptada por propósitos adaptativos. La yema apareció alrededor de 100-400 millones de años antes que la semilla (Rohde & Bhalerao, 2007). Lang y col. (1987) concluyeron que la dormancia solo ocurre en las estructuras de las plantas que contienen un meristema, y es un estado fisiológico que se caracteriza por la incapacidad de iniciar el crecimiento de los meristemas bajo condiciones favorables, y que le permite a la planta resistir las condiciones adversas del invierno (Rohde & Bhalerao, 2007).

Durante el ciclo anual de crecimiento es posible distinguir distintos estadios de desarrollo de la dormancia; a) la paradormancia en que el crecimiento es inhibido por factores exógenos a la yema (inhibición correlativa); b) la endodormancia o dormancia verdadera en que la detención del crecimiento se debe a factores endógenos presentes dentro de la yema. Este estado se caracteriza por una baja tasa metabólica de las yemas, y operacionalmente, se define como un retardo en la brotación de las

yemas bajo condiciones óptimas de luz y temperatura; c) la ecodormancia es un estado quiescente en el cual el crecimiento de la yema depende de factores ambientales (Lang y col., 1987) (Fig. 1). La endodormancia también ha sido definida como un estado en el cual la morfogénesis primaria en el tallo embrionario dentro de la yema se encuentra obstruido por un mecanismo intrínseco, y dado que el meristema apical del tallo (SAM) tiene un papel central en la morfogénesis primaria, podría ser el *locus* de este mecanismo intrínseco. De esta forma, la endodormancia sería un estado de auto-detención y podría ser mejor entendido en términos de una interrupción estratégica de la auto-organización en el SAM, en que la comunicación celular se detiene frente a señales de fotoperiodo corto, entrando en un estado *offline* (van der Schoot & Rinne, 2011).

Recientemente, se realizó un análisis de la variación transcriptómica a lo largo del desarrollo de las yemas latentes en *V. vinifera*, demostrando que los mayores cambios transcripcionales están asociados a las transiciones para/endodormancia, endo/ecodormancia y ecodormancia/brotación. Sin embargo, a pesar de toda esta información, aún es desconocido cuáles son los principales cambios metabólicos y bioquímicos que hacen que el meristema de las yemas latentes se vuelva menos sensible a las señales promotoras de crecimiento durante la ED (Díaz-Riquelme y col., 2012).



Figura 1. Ciclo anual de crecimiento de la vid. Se muestran los meses del año asociados al estado fisiológico de las yemas. Modificado de Díaz-Riquelme y col., 2012.

Regulación medioambiental de la dormancia en yemas

En la mayoría de las plantas leñosas de clima templado el estado dormante se establece progresivamente, y para ello, es necesario el cese del crecimiento, el que es causado por señales ambientales. Éstas corresponden a la luz y la temperatura, las que juegan un papel significativo en la inducción y salida de la endodormancia, con la luz jugando el papel dominante en la mayoría de las plantas perennes leñosas (Horvath y col., 2003).

Efecto del fotoperiodo

El papel del fotoperiodo en el control del cese del crecimiento es bien conocido, y la inactividad se alcanza en cualquier ápice a través de señales emitidas por las hojas, las que detectan el fotoperiodo, mediados por los fitocromos (Campoy y col., 2011). Mientras que muchas plantas leñosas cesan el crecimiento en respuesta tanto a la temperatura como al fotoperiodo, se ha demostrado que las vides son capaces de iniciar el cese del crecimiento en respuesta solo al FC (Fennell & Hoover, 1991; Wake & Fennell, 2000), al igual que en álamo (Olsen y col., 1997). Por otra parte, en peras y manzanas se ha demostrado que el cese del crecimiento y la inducción de la dormancia es controlado por las bajas temperaturas (Cook y col., 2005; Heide &

Prestrud, 2005). Fennell & Hoover (1991) demostraron que *V. labruscana* y *V. riparia* responden al FC iniciando el cese del crecimiento, y en contraste con el álamo y otras especies, *Vitis* no genera una yema terminal en respuesta al fotoperiodo corto (FC), sin embargo, al alcanzar un largo de día crítico se inducen otros fenotipos distintivos como el desarrollo del peridermo, detención del crecimiento y dormancia de las yemas latentes (Fennell & Hoover, 1991; Wake & Fennell, 2000; Grant y col., 2013). El crecimiento de las yemas latentes es inicialmente detenido por las señales de PD del ápice (He y col., 2012), pero estas yemas latentes, mantienen un proceso activo de división celular y diferenciación hasta que perciben la señal de FC que provoca la entrada a la ED (Kühn y col., 2009; Grant y col., 2013).

Efecto del frío

La liberación de la dormancia ocurre por exposición de las yemas a bajas temperaturas por largos periodos de tiempo y la acumulación de frío restaura la habilidad de crecimiento pero no promueve el crecimiento (Rohde & Bhalerao, 2007). La salida de la dormancia por efecto del frío libera al SAM a un estado de quiescencia o supresión del crecimiento, donde se ha recuperado la capacidad de crecimiento y desarrollo, pero que no es activado hasta que las condiciones de crecimiento adecuadas estén presentes (van der Schoot & Rinne, 2011). Las yemas de los frutales caducifolios como la vid requieren acumular una cierta cantidad de frío para brotar homogéneamente en la primavera, esto se conoce como requerimiento de frío (RF) y es un carácter que está determinado genéticamente y varía con la especie (Pérez y col., 2009), y el no cumplimiento de los RF produce una brotación errática y dispareja que hace inviable la producción a nivel comercial del cultivo. Sin embargo, en el caso de la vid este

problema ha sido parcialmente resuelto a través del uso de químicos como la azida de sodio (NaN_3) y la cianamida hidrogenada (H_2CN_2) (Pérez y col., 2009).

Control hormonal de la dormancia en yemas

El control del ciclo de dormancia está dado no sólo por factores medioambientales como el fotoperíodo sino que también existe regulación hormonal. Se ha estudiado principalmente la relación de la dormancia con las fitohormonas giberelinas y ácido abscísico.

Giberelinas (GAs)

Se ha asociado a las GAs con la inducción del cese del crecimiento, en que un nivel reducido de GA activa es un prerequisite para éste. El FC causa la disminución de GA20 oxidasa, la enzima del paso limitante en la biosíntesis de GA. Se ha sugerido que la reducción de las GAs activas, en lugar de la sensibilidad hacia las GAs juega un mayor papel en el cese del crecimiento (Hoffman, 2011). Como es necesaria GA activa para la elongación del tallo, la brotación de las yemas es dependiente de niveles suficientes de GA. En árboles de *Populus*, bajos niveles de GA activa por sobreexpresión de la enzima catabólica GA2-oxidasa o alteración en la percepción por la sobreexpresión de GA *INSENSITIVE* o receptores RGA-like, muestran establecimiento temprano de las yemas y brotación tardía de las mismas (Zawaski y col., 2011; Cooke y col., 2012). Además, en álamo también se ha demostrado que la aplicación de GA estimula la síntesis de β -1,3-glucanasas necesarias para la degradación de tapones de callosa en los plasmodesmos del meristema apical, lo que es necesario para la reactivación de los meristemas y la salida de la dormancia (Rinne y col., 2011).

Ácido abscísico (ABA)

ABA ha sido reconocido como una señal clave inducida en estrés por frío o sequía, postulándose un papel clave de esta hormona en la regulación de la dormancia en yemas. Se ha sugerido que la profundidad de la dormancia está relacionada con los niveles endógenos de ABA (Tamura y col., 1993). En frutales como manzano (*Malus domestica*), cerezo (*Prunus cerasus*) y durazno (*Prunus persica*), altos niveles de ABA están asociados a un bajo nivel de brotación, sugiriendo que ABA estaría retrasando la brotación de las yemas y por tanto su salida de la endodormancia (Seeley & Powell, 1981; Mielke & Dennis, 1978; Bowen & Erickson, 1978).

Para el caso de la vid, estudios indican que los estímulos rompedores de dormancia como los compuestos cianamida hidrogenada (H_2CN_2), azida de sodio (NaN_3), como también la hipoxia, podrían estar modificando el metabolismo de ABA y de esta forma ejerciendo su efecto (Zheng y col., 2015). Además, los niveles de ABA alcanzan un máximo durante el periodo de ED (Zheng y col., 2015). A pesar de estos antecedentes, el mecanismo de acción de dicha hormona en relación a la dormancia en las yemas no ha sido claramente dilucidado hasta el momento.

Otras hormonas

En diversas especies se ha descrito una relación de las auxinas con la dormancia. Los niveles de la auxina 3- ácido indol acético (IAA) declinan gradualmente bajo FC, en sauce y abedul de plata, en paralelo con un incremento en la endodormancia. Los niveles de IAA son bajos en tubérculos de papa endodormantes e incrementa en las yemas del tallo en forma previa al inicio del crecimiento (Chao y col., 2007). Por otro lado, la hormona etileno ha sido involucrada en la mediación de la inducción de la

dormancia y en su liberación, posiblemente a través de la regulación cruzada con ABA. Aunque la biosíntesis y señalización parece preceder a ABA durante el inicio de la dormancia en *Populus*, también podría actuar sinérgicamente con ABA, dado que constructos con ganancia de función de *ETHYLENE RESPONSE1 (ETR1)* entran en dormancia y forman yemas con morfología alterada (Cooke y col., 2012). Finalmente, las citoquininas, a pesar de su papel central en la regulación de la división celular, no han sido muy estudiadas en relación con la dormancia. Sin embargo, se ha demostrado en kiwi que la aplicación exógena de citoquininas son capaces de inducir un mayor porcentaje de brotación respecto a los controles, como también una mayor uniformidad del crecimiento de las yemas (Fabbroni, 2009).

Metabolismo energético y dormancia en yemas de vid

La estacionalidad y los consecuentes cambios en el fotoperiodo, tienen efecto sobre el flujo de energía desde un órgano fuente como las hojas hacia uno sumidero como las yemas y es sentido por el estado redox de los componentes de la cadena de transporte de electrones, los que contribuyen a la reducción de transmisores redox, especies reactivas de oxígeno (ROS) y antioxidantes, y estos cambios pueden alterar la expresión génica a nivel transcripcional y post-transcripcional (Ensminger y col, 2006; Foyer & Noctor, 2005; Dietz & Pfannschmidt, 2011). Se presume que una serie de cambios metabólicos ocurren por efecto del acortamiento del fotoperiodo y la inducción de la dormancia, de forma de permitir la sobrevivencia de las yemas de vid durante el invierno.

La respiración entrega energía en forma de ATP y poder reductor que son necesarios en distintos procesos biológicos, y está generalmente regulada por el suministro de

carbono y/o la demanda de ATP de los procesos celulares (Amthor, 1989; Noguchi & Terashima, 1997). Puede ser dividida en tres vías metabólicas principales: la glicólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos mitocondrial (TCA) y la cadena de transporte de electrones mitocondrial (mETC). La oxidación de la glucosa en el proceso de glicólisis continúa con la producción de poder reductor en forma de NADH y FADH₂ en el ciclo TCA, los que pueden ingresar a la mETC para generar finalmente ATP que sostendrá los distintos procesos biológicos (Fernie y col., 2004). El ciclo TCA consta de una serie de reacciones enzimáticas, entre las cuales la enzima aconitasa o aconitasa hidratasa (ACO) cataliza la isomerización de citrato a isocitrato y la enzima fumarasa o fumarasa hidratasa (FUM) cataliza la reacción reversible de hidratación/deshidratación de fumarato a malato (Sweetlove y col., 2010). En cuanto al mETC, la citocromo c oxidasa (COX) es la enzima terminal de esta vía y se encuentra embebida en la membrana mitocondrial interna donde media la transferencia de electrones desde la forma reducida de citocromo c al oxígeno molecular (Dhar y col., 2013). El complejo COX está formado por 13 subunidades, 10 de las cuales están codificadas en el genoma nuclear y las 3 de mayor tamaño están codificadas en el genoma mitocondrial (Dhar y col., 2013). Además, la proteína citocromo c (CITC) la que está asociada a la membrana interna mitocondrial, transfiere electrones entre los complejos III y IV (COX) (Noctor y col., 2007).

En ausencia de oxígeno, el funcionamiento continuo de la glicólisis requiere del reciclaje de NAD⁺, el que es generado en la fermentación, en el paso enzimático catalizado por ADH, produciéndose sólo dos moléculas de ATP (Fernie y col., 2004; Strommer, 2011). La alcohol deshidrogenasa (ADH) es la enzima terminal de la fermentación etanólica y convierte acetaldehído a etanol, proceso durante el cual se



produce NAD^+ el que permite que durante la glicólisis se genere una cantidad limitada de ATP (sólo dos moléculas) (Strommer, 2011).

Por otra parte, la vía de las pentosas fosfato entrega una fuente de poder reductor en forma de NADPH para la mantención de distintos procesos biosintéticos. En esta ruta, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) es la enzima clave y cataliza el primer paso enzimático de la vía en que ocurre la conversión de glucosa 6-fosfato (G6P) a 6-fosfogluconolactona (PGL) liberando una molécula de NADPH en el proceso (Kruger & von Schaewen, 2003).

Otra vía de destinación de la glucosa en forma de G6P, es su ingreso a la ruta biosintética de almidón. En las plantas superiores, el almidón es sintetizado en los plastidios de células fotosintéticas y no fotosintéticas, y es el principal carbohidrato de reserva, jugando importantes papeles durante el ciclo de vida de la planta. Corresponde a un glucano insoluble compuesto de dos polímeros de glucosa: amilopectina que es de mayor tamaño y posee una alta frecuencia de enlaces α -1-6-glucosídicos, y amilosa que es de menor tamaño y lineal (Leterrier y col., 2008). La biosíntesis de almidón se compone de reacciones enzimáticas secuenciales catalizadas por ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPase), almidón sintasa (SS), enzima ramificadora de almidón (1,4-GB) y enzima desramificadora de almidón (DBE) (Zeeman y col., 2010). La ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPase) es una enzima heterotetramérica que cataliza la producción de ADP-glucosa y pirofosfato inorgánico (PPi) a partir de glucosa 1-fosfato (G1P) y ATP, donde la ADP-glucosa será el precursor inmediato de la síntesis del almidón (Huang y col., 2014). Las almidón sintasas (SS; EC 2.4.1.21) elongan cadenas de glucanos de amilosa y amilopectina. Catalizan la transferencia de una molécula de glucosa a la ADP-glucosa vía un enlace

α -1,4-glucosídico. La actividad coordinada de distintas isoformas de SS ayudan a generar el gránulo de almidón (Leterrier y col., 2008). La ramificación del almidón es generada por las enzimas ramificadoras (1,4-GB; EC 2.4.1.28) que cortan los enlaces α -1,4-glucosídicos existentes y transfieren el segmento cortado de seis o más unidades de glucosa al C6 de un residuo glicosil de otra (o la misma) cadena de glucano. Finalmente, las enzimas desramificadoras de almidón (DBE; EC 3.2.1.41 y 3.2.1.68) hidrolizan enlaces α -1,6-glucosídicos de la amilopectina, siendo cruciales para la estructura final del gránulo de almidón (Zeeman y col., 2010).

Finalmente, existe evidencia de que la aplicación de H_2CN_2 a yemas de vid dormantes, genera un estrés respiratorio transitorio el que resulta en un incremento temporal en la razón AMP/ATP. El AMP es una conocida señal de estrés sensada por kinasas SNF-like (sucrose-non-fermenting-like) (Or y col., 2000). *SnRK1* (sucrose-non-fermenting-1-related) en plantas codifica para una proteína perteneciente a una familia altamente conservada de proteínas kinasas, homólogos de las SNF de levaduras y que actúan como sensores energéticos regulando la expresión de genes en respuesta a deficiencias energéticas que incluyen condiciones de oscuridad e hipoxia (Baena-González y col., 2007).

Un esquema de la integración de estas rutas metabólicas se muestra en la figura a continuación, destacando los genes a analizar en el desarrollo de este trabajo:

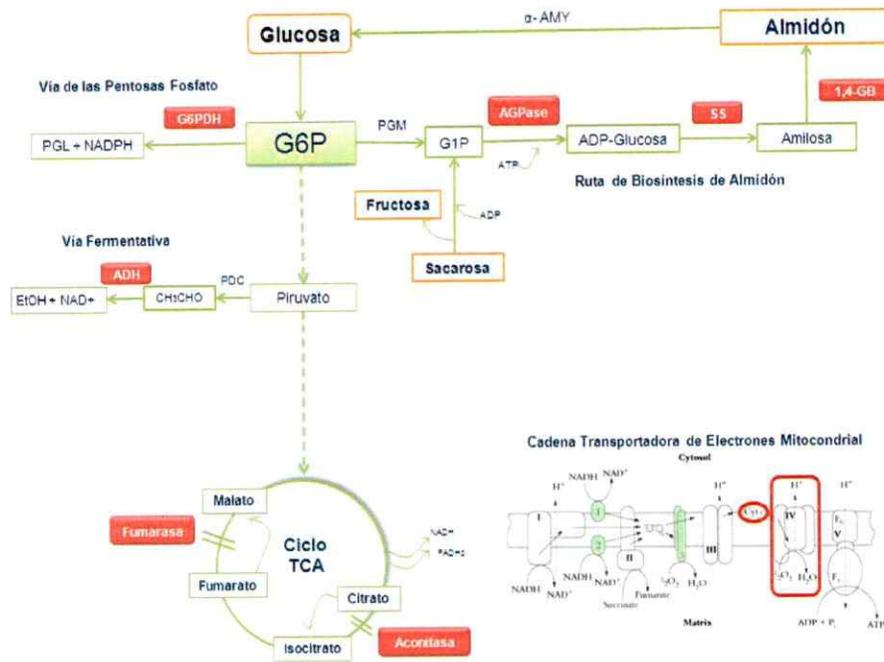


Figura 2. Vías metabólicas del catabolismo de la glucosa 6-fosfato. Se muestra la interconexión entre las vías de las pentosas fosfato, fermentativa, de biosíntesis de almidón, ciclo TCA y cadena de transporte de electrones mitocondrial (mETC) analizados en el proceso de dormancia de yemas de vid. En color rojo se destacan los genes analizados y en color naranja los metabolitos cuantificados. 1,4-GB: enzima ramificadora de almidón (glucose branching), α -AMY: α -amilasa, ADH: alcohol deshidrogenasa, ADP: adenosín difosfato, AGPase: ADP-glucosa pirofosforilasa (ADP-glucose pyrophosphorylase), ATP: adenosín trifosfato, CH_3CHO : acetaldehído, EtOH: etanol, FADH_2 : flavín adenín dinucleótido, G1P: glucosa 1-fosfato, G6P: glucosa 6-fosfato, G6PDH: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, NAD^+ : nicotinamida adenina dinucleótido, NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, PDC: piruvato descarboxilasa, PGL: 6-fosfogluconolactona, PGM: fosfoglucomutasa, SS: almidón sintasa (starch synthase).

Hipótesis

Considerando que la transición de paradormancia a endodormancia en yemas de *Vitis vinifera* es un proceso de reajustes metabólicos, en particular, del metabolismo energético, y que por otra parte, existen cambios en los niveles de la hormona ácido abscísico (ABA) asociados al ciclo de dormancia, se plantea la siguiente hipótesis: "ABA es un regulador clave asociado a los cambios metabólicos que acompañan la entrada a la endodormancia"

Objetivos

a. Objetivo general

- Establecer relación entre cambios en el metabolismo energético y la dormancia en yemas de *Vitis vinifera*

b. Objetivos específicos

1. Determinar cambios en la tasa respiratoria en las yemas de *Vitis vinifera* a lo largo del ciclo anual de crecimiento, relacionándolos con la profundidad de la dormancia
2. Determinar el efecto de la temperatura sobre la tasa respiratoria de yemas endodormantes y paradormantes
3. Establecer efecto de compuestos rompedores de la dormancia sobre la respiración de yemas endodormantes
4. Determinar posibles cambios metabólicos asociados a la dormancia mediante la cuantificación de los niveles de expresión de genes claves de las siguientes vías metabólicas: ciclo TCA, fermentación alcohólica, cadena de transporte de

electrones mitocondriales (mETC), pentosas fosfato y biosíntesis de almidón, durante la transición de PD a ED, y el efecto del fotoperiodo sobre los mismos

5. Determinar posibles cambios metabólicos asociados a la dormancia mediante la cuantificación de los niveles de azúcares solubles y almidón durante la transición de PD a ED, estableciendo su relación con metabolismo respiratorio
6. Dilucidar la posible relación de la hormona vegetal ácido abscísico (ABA) con cambios metabólicos asociados a la dormancia de yemas

MATERIALES Y MÉTODOS

Estado de dormancia de las yemas

La brotación de esquejes de yema única bajo condiciones forzadas de crecimiento es un indicador común usado para describir la profundidad de la dormancia en vides (Koussa y col., 1994; Dennis, 2003). Este sistema permite trabajar con un gran número de yemas, otorgando una representación apropiada del estado de dormancia de una población dada de yemas en un punto específico del tiempo durante el ciclo de dormancia. Se colectaron varas de 8 años de edad (*Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless) crecidas en la estación experimental del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA La Platina) ubicado en Santiago (33°34'S latitud), cada 2-3 semanas, desde el 11 de diciembre hasta mediados de agosto de la temporada 2012/2013. Se cortaron varas que poseían 10 yemas y fueron llevadas al laboratorio. Las varas fueron cortadas en esquejes de yema única (10-12 cm de largo) y 30 de ellos se montaron en una base de polipropileno en una bandeja con agua para cada colección de datos y se mantuvieron en la cámara de crecimiento a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ y bajo 16 h de fotoperiodo $150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (condiciones forzadas). El agua fue reemplazada en las bandejas cada 5 días por un período de 30 días. La aparición de tejido verde visible en la punta de la yema fue considerada como indicativo de la brotación de la yema. Para estimar la profundidad de la dormancia se utilizó el parámetro BR_{50} el que es una estimación del tiempo medio para que ocurra la brotación del 50% de las yemas bajo condiciones forzadas (Pérez y col., 2007).

Medición de la tasa de respiración de las yemas

La respiración fue monitoreada por el consumo de oxígeno usando un electrodo tipo Clark (Hansatech, Norfolk, UK) a 25 °C. El oxígrafo fue calibrado con 1 ml de agua saturada con aire y la concentración referencia de O₂ fue de 260 nmol/ml. Cada experimento se llevó a cabo utilizando una yema suspendida con un hilo para evitar que esta toque el fondo e interfiera con el agitador magnético. A la cámara del oxígrafo se agregó 1 ml de buffer fosfato 100 mM pH 7,0, el que se mantuvo en constante agitación durante el transcurso de los experimentos, y dentro de éste se sumergió la yema suspendida. Se utilizaron yemas de *V. vinifera* cv. Thompson Seedless colectadas en diferentes periodos del año de la temporada 2012/2013. Los experimentos para determinar el efecto de la temperatura, la glucosa y ABA sobre la respiración se realizaron con yemas paradormantes y endodormantes, y los experimentos para determinar el efecto de compuestos rompedores de dormancia H₂CN₂ y NaN₃ se realizaron sólo en yemas endodormantes. Los experimentos de efecto de la temperatura sobre la respiración se realizaron a 5, 10, 15 y 25 °C usando un baño termostático (VWR, Scientific Products, USA). Para los experimentos con glucosa y ABA, esquejes de yema única fueron rociados con una solución de 2% glucosa y 100 µM ABA, respectivamente. Ambos compuestos fueron disueltos en agua por lo que ésta fue usada como control. El efecto de los compuestos rompedores de dormancia H₂CN₂ y NaN₃ se determinó rociando esquejes de yema única con 2,5 % H₂CN₂ y 2 % NaN₃, respectivamente. Ambos compuestos fueron disueltos en agua por lo que ésta fue usada como control. Finalmente, para todos los tratamientos los esquejes fueron colocados en una cámara de crecimiento a 23 ± 1 °C y 16 h fotoperiodo

y la tasa de respiración de las yemas fue medida en oscuridad a 30 °C, excepto para los estudios de influencia de la temperatura.

Cuantificación de niveles de azúcares y almidón

Se colectaron yemas de *Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless en diferentes fechas durante la temporada 2013. Las yemas (0,2 gr aprox.) se molieron con pistilo y mortero en nitrógeno líquido y se realizó una extracción con 3 ml de acetona fría y luego con 1X de cloroforno con alcohol isoamílico (24:1). La suspensión se centrifugó a 13.000 g por 3 min y el pellet fue secado y extraído con 2 ml de etanol 80% (v/v) por 30 min en un baño con agua caliente a 60°C. Esta extracción se repitió 3 veces y el contenido de almidón del pellet fue determinado después de la extracción con etanol de los azúcares solubles por extracción ácida usando el reactivo antrona (Hansen & Moller, 1975). El sobrenadante seco obtenido de la extracción con etanol fue disuelto en 100 µl de piridina y una alícuota de 15 µl fue derivatizada agregando 5 µl BSTFA (Sigma-Aldrich, USA), la mezcla fue calentada a 90 °C por 30 min. Los análisis cromatográficos de las muestras de azúcares derivatizadas se realizaron utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu GC 2014 (Shimadzu Corporation, Kioto, Japón) equipado con una columna capilar CBP1 y un detector FID. Las condiciones de operación fueron las siguientes: temperatura del inyector y detector a 180 °C y 300 °C, respectivamente; flujo de gas carrier (helio) a 1 ml/min; volumen de inyección de 1 µl con un flujo *splitter* 50:5. El horno fue programado a temperaturas de 60-200 °C a una tasa de 30 °C min⁻¹ y de 200-280 °C a una tasa de 5 °C min⁻¹. Se construyeron curvas estándar para la determinación de las concentraciones de azúcares.

Tratamientos de fotoperiodo

En un proyecto con colaboradores de Brasil, se analizó el efecto del fotoperiodo sobre la expresión de genes codificantes para enzimas relacionadas con la síntesis de almidón (*VvAGPase*, *VvSS1*, *VvSS3* y *Vv1,4-GB*), fermentación (*VvADH2*), vía de las pentosas fosfato (*VvG6PDH*), ciclo TCA (*VvACO2*; *VvFUM*), mETC (*VvCOX6a*; *VvCITC*) y síntesis de ABA (*VvNCED3*) en yemas de *Vitis vinifera* cv. Italia mejorada. Los experimentos fueron realizados cerca del trópico en Messoró, Brasil, donde existen variaciones muy pequeñas en el largo del día y en la temperatura lo que facilita el desarrollo de este tipo de experimentos. Como material vegetal se utilizaron esquejes de *V. vinifera* cv. Italia mejorada en portainjertos IAC 572 crecidos en la Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), localizada en Messoró (5°12'16''S), donde el fotoperiodo natural durante todo el año es 12/12 hrs día/noche y la temperatura fluctúa entre los 29-31 °C. Se realizaron 3 réplicas por tratamiento. Los esquejes enraizados (15 por tratamiento) fueron plantados en una mezcla 1:1:1 (v:v:v) de tierra, arena y estiércol en maceteros de 5 L. Una vez comenzado el crecimiento, se desarrolló una vara en cada esqueje. El 15 de octubre de 2013, vides con un crecimiento uniforme y con 12-16 hojas desarrolladas, fueron seleccionadas y asignadas al azar a los distintos tratamientos de fotoperiodo por 8 semanas. Los experimentos de fotoperiodo fueron realizados en invernaderos bajo FL (14/10 hrs día/noche) y FC (10/14 hrs día/noche), dado que el largo de día crítico para la transición hacia la dormancia es de 13 hrs en *V. vinifera* (Kühn y col., 2009). Se suplementó con luz artificial automáticamente a las 17:30 hrs de cada tarde usando un tubo fluorescente de 100 W, mientras que la restricción lumínica fue impuesta con una cubierta doble de plástico negro a las 4:30

hrs de cada mañana. Después de los tratamientos, las yemas fueron liofilizadas y enviadas al laboratorio para realizar los distintos análisis de expresión génica.

Tratamientos de hipoxia

Varas de *Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless fueron colectadas durante la ED (3 de julio de 2013) y fueron separadas en grupos de 45 esquejes de yema única cada uno. El primer grupo fue mantenido a temperatura ambiente en la oscuridad (control), y los otros cinco grupos fueron sometidos a hipoxia por 3, 6, 12, 18 y 24 hrs. Después del tratamiento, cada grupo fue dividido en tres subgrupos de 15 yemas cada uno (réplicas biológicas) para los análisis de expresión génica. Para obtener bajas concentraciones de oxígeno (hipoxia), los esquejes fueron colocados en cámaras de vidrio con agua en el fondo, y se inyectó N_2 con un flujo continuo a 100 ml min^{-1} . La concentración de oxígeno en la solución en las cámaras fue determinada polarográficamente usando un electrodo de O_2 tipo Clark. La concentración de O_2 en condiciones control varía entre $250\text{-}260 \text{ nmol ml}^{-1}$ y luego del tratamiento de hipoxia llega al 8,5 % de O_2 .

Purificación de ARN y síntesis de cDNA

Para los experimentos de fotoperiodo, el ARN total fue extraído y purificado a partir de yemas liofilizadas (0,05-0,1 gr) de *V. vinifera* cv. Italia mejorada. Para los experimentos de transición hacia la ED y con ABA, el ARN total fue aislado y purificado desde yemas de *V. vinifera* cv. Thompson Seedless (0,5-0,7 GPF). En todos los casos el ARN total fue extraído usando un protocolo mejorado del método de Chang y col. (1993), descrito en Noriega y col. (2007) basado en el uso de CTAB. El ADN fue eliminado mediante un tratamiento con DNAasa libre de RNAasa ($1U/ \mu\text{L}$) a 37°C por 30 min y 65°C por 10 min con EDTA 50mM ($1U/ \mu\text{L}$) para inactivar la actividad

DNAasa. La primera hebra de cDNA fue sintetizada desde 1 µg de ARN purificado y usando 1µL oligo(dT)₁₂₋₁₈ (0.5 µg x µL⁻¹) como primer, 1 µL dNTP mix (10 mM) y 1 µL de Superscript® II RT (Invitrogen, CA, USA).

Búsqueda de secuencias génicas en bases de datos y diseño de partidores para RT-qPCR

La búsqueda de secuencias para los genes de interés se realizó a partir de la información otorgada en la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Una vez obtenidos los EST se realizó un WEB-BLAT en la base de datos genómica de Vitis, GENOSCOPE (<http://www.genoscope.cns.fr/blat-server/cgi-bin/vitis/webBlat>). Del WEB-BLAT se obtuvo información sobre las características del gen como ubicación en genoma, código, estructura, tamaño, secuencia genómica, secuencia de cDNA virtual y secuencia proteica predicha. Con la secuencia completa de la proteína se puede corroborar que las secuencias codifiquen para las proteínas de interés, utilizando la herramienta BlastP de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). Con la misma secuencia también se verificó en GENOSCOPE la existencia de otras isoformas. Una vez confirmada la identidad de las secuencias, se diseñaron los partidores específicos utilizando el software Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000), para que sean amplificadas secuencias de 80-150 pb. Finalmente, los partidores fueron chequeados con el programa OligoCalculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) para descartar complementariedad entre la secuencia *forward* y *reverse*. Los partidores *forward* y *reverse* utilizados en los experimentos de RT-qPCR se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Partidores utilizados en los experimentos de RT-qPCR. Se muestran el código obtenido de base GENOSCOPE tanto como los partidores *forward* y *reverse* para cada uno de los genes de *Vitis vinifera* analizados.

Gen	Código	Partidor Forward	Partidor Reverse
<i>VvADH2</i>	GSVIVT00034834001	5'CTGTGGTTCATGTTGGTTGC3'	5'ACCGAAAATGGCGACTGAT3'
<i>VvG6PDH</i>	GSVIVT01001847001	5'CGCCAGGGATTCTTACTC3'	5'CTGAATGCTCGGATGTAGCA3'
<i>VvAGPase</i>	GSVIVT01030141001	5'CGGGCTTATGCCAGTAACAT3'	5'GGGTTCTCAGGACTCTGCTG3'
<i>VvSS1</i>	GSVIVT01038557001	5'CCATCAAGGTCCATTGCTTT3'	5'AAAAGCGCCATAACCATCAC3'
<i>VvSS3</i>	GSVIVT01012723001	5'TGTAGGAATGACGGGAAAG3'	5'AAACTGGAGCGCTAGACCAA3'
<i>Vv1,4GB</i>	GSVIVT01008673001	5'GCCATTGTGTACCGTGAGTG3'	5'GGGAATCTTGATGCTCCAAA3'
<i>VvACO2</i>	GSVIVT01037657001	5'TCAGGGGATCTTGACGAATC3'	5'ATGCATGAACACGACCTTCA3'
<i>VvFUM1</i>	GSVIVT01028056001	5'TCCCTACACCCATTACAT3'	5'GCTGAAATCGGAAGAACTGC3'
<i>VvCOX6a</i>	GSVIVT01006593001	5'GATGGTGAGACTCTGGTCTTCG3'	5'GGCCAGCAGAGGAAGAATAGT3'
<i>VvCITC</i>	GSVIVT01036385001	5'CTGAATGGCCTTTTCGGTAG3'	5'TCCCAAATAACAGCCATGTTCC3'
<i>VvSnRK1α</i>	GSVIVT01011467001	5'ATTGTTTCATGCACCTCACA3'	5'GCCTGCCCTTCTCTACAATG3'
<i>VvSnRK1β</i>	GSVIVT01025806001	5'TCCCATCGAAACAATGACA3'	5'TTGGATRAGGCAGCTAATGG3'
<i>VvNCED3</i>	GSVIVT01038080001	5'TTTGTGGCAGCAGAGAAGAC3'	5'AGGGAACCTCGTGAGGGAAGT3'
<i>VvUBIQUITINA</i>	GSVIVT01038618001	5'CAGCACCGACAAAGACTTG3'	5'CCCAGTTAGGGTTTTACAG3'

Análisis de expresión génica por PCR en tiempo real (RT-qPCR)

El análisis de expresión génica se realizó por PCR cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR) usando un equipo Eco Real-Time PCR (Illumina, Inc.SD, USA) y el mix KAPA SYBR FAST (KK4602) qPCR master mix (2 X). La amplificación del cDNA se realizó bajo las siguientes condiciones: denaturación a 94°C por 2 min y 40 ciclos a 94°C por 30 s, 55°C por 30 s y 72°C por 45 s. Se realizaron tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas para cada tratamiento. Las yemas colectadas el 30 de noviembre fueron utilizadas como control en los experimentos de dormancia y yemas expuestas a FL fueron usadas como control en los experimentos con fotoperiodo. La inducción o

represión en los niveles de transcritos fueron calculados usando el método $\Delta\Delta Ct$ (Livak & Schmittgen, 2001), usando *VUBIQUITINA* como gen referencia. Se seleccionó *VUBIQUITINA* como gen referencia porque los niveles de su transcrito se mantienen estables en diferentes tratamientos y estados fisiológicos (Borges y col., 2014; Coito y col., 2012; González-Agüero y col., 2013; Monteiro y col., 2013). Además en los distintos experimentos se verificó que el Ct para este gen fuese constante y no se viese alterado por los tratamientos.

Análisis estadístico

Valores de BR_{50} para cada colección de datos fueron estimados usando el análisis Probit del software estadístico Minitab (Minitab 13.31, MinitabInc, USA). Para la comparación de todos los otros datos de este estudio se utilizó la prueba de t-Student en Excel para el análisis estadístico y se consideró un $p < 0,05$ como una diferencia significativa.

RESULTADOS

Comparación entre la respiración y la dormancia en yemas de vid a lo largo del ciclo anual de crecimiento

Se midió la tasa respiratoria de yemas de *Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless a lo largo del ciclo anual de crecimiento, en vides crecidas en Santiago, Chile (33° 31'S) en la temporada 2012/2013. Se determinó una tasa respiratoria promedio de 180 [nmol O₂ min⁻¹ GPF] durante el período de PD, la que cayó drásticamente a finales de Enero, momento en el cual ocurre la transición de PD a ED (Fig. 3). Durante la ED, la tasa respiratoria se mantuvo baja, alrededor de 40 [nmol O₂ min⁻¹ GPF], para finalmente incrementar en forma previa a la brotación (Fig. 3). Por otra parte, se determinó que el BR₅₀ (indicador de profundidad de dormancia) durante la PD se mantiene bajo, alrededor de 10 días, mientras que al ocurrir la transición de PD a ED, éste aumenta hasta llegar a un valor de 40 días, manteniéndose en niveles altos hasta el momento en que la yema se prepara para brotar donde decae nuevamente (Fig. 3). De esta forma se pudo establecer que existe una relación inversa entre la profundidad de la dormancia de las yemas y la tasa respiratoria, llegando esta última a sus mínimos niveles durante el período de ED.

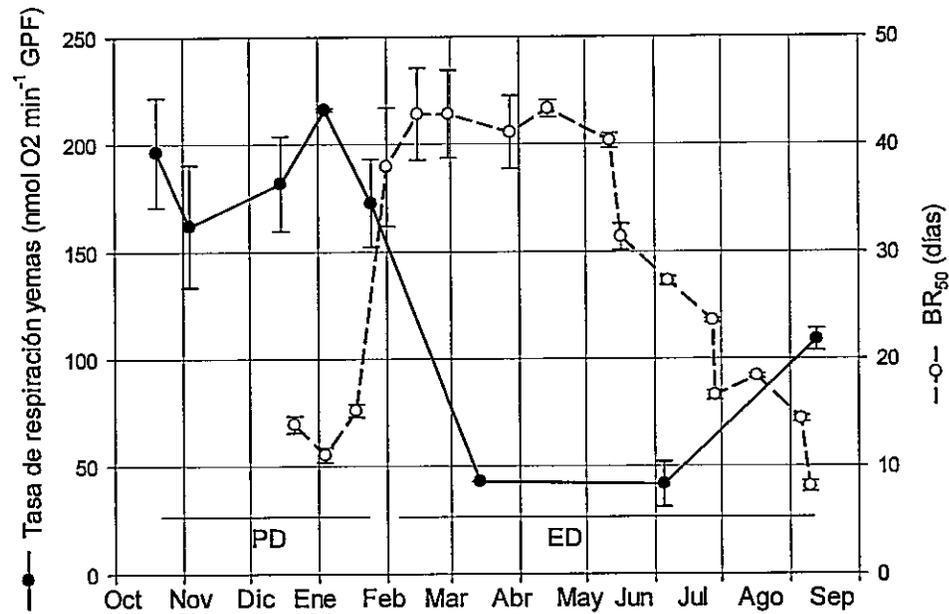


Figura 3. Tasa de respiración [$\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ GPF}$] de yemas de *Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless a lo largo del ciclo anual en comparación a la profundidad de dormancia de las mismas establecida de acuerdo a su BR_{50} (días). La tasa respiratoria de yemas de nodo único fue determinada polarográficamente con un electrodo de oxígeno tipo Clark a 25°C . Barras representan el error estándar ($n=3$). Valores de BR_{50} para cada colección de datos fueron estimados usando el análisis Probit del software estadístico Minitab®. Barras representan el error estándar ($n = 30$). PD: paradormancia, ED: endodormancia.

Efecto de la transición de PD a ED y del fotoperiodo sobre la expresión de genes relacionados a la fermentación (VvADH2) y a la vía de las pentosas fosfato (VvG6PDH)

Para determinar si las vías fermentativa y de las pentosas fosfato son activadas durante la transición de PD a ED, se estudió tanto el efecto de la transición hacia la ED como el efecto del fotoperiodo sobre la expresión de los genes *VvADH2* y *VvG6PDH*. La transición de la PD a la ED es inducida por el acortamiento del fotoperiodo en yemas de vid (Fennell & Hoover, 1991). Los experimentos en que se analizó la transición hacia la ED se llevaron a cabo en *V. vinifera* cv. Thompson Seedless

crecidas en Santiago, Chile, mientras que los experimentos de fotoperiodo fueron llevados a cabo en *V. vinifera* cv. Italia mejorada crecidas en Messoro, Brasil.

Se han identificado tres isogenes que codifican para la enzima alcohol deshidrogenasa en *V. vinifera* (Tesnière & Verriès, 2000), de los cuales *VvADH2* es el principal isogen que se expresa en yemas de *V. vinifera*, el que posee una alta respuesta a hipoxia y a inhibidores de la respiración (Vergara y col., 2012a). Por otra parte, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) es la enzima clave de la vía de las pentosas fosfato. Se han descrito previamente los genes codificantes para sus isoformas cloroplastidiales y citosólicas en *V. vinifera* (Vergara & Pérez, 2010), y en este estudio se realizó el análisis de la isoforma citosólica. La isoforma cloroplastidial no fue analizada ya que se ha demostrado que durante la dormancia existe una marcada caída de la expresión de todos los transcritos relacionados a la fotosíntesis, siendo el proceso que se ve más afectado en la transición hacia la ED en *Vitis vinifera* (Díaz-Riquelme y col., 2012).

Se determinó que tanto para *VvADH2* como *VvG6PDH* existe un incremento transitorio significativo en su expresión génica durante la transición de PD a ED (Fig. 4). Por otra parte se observa que la expresión de *VvADH2* como de *VvG6PDH* incrementó significativamente bajo condiciones de fotoperiodo corto.

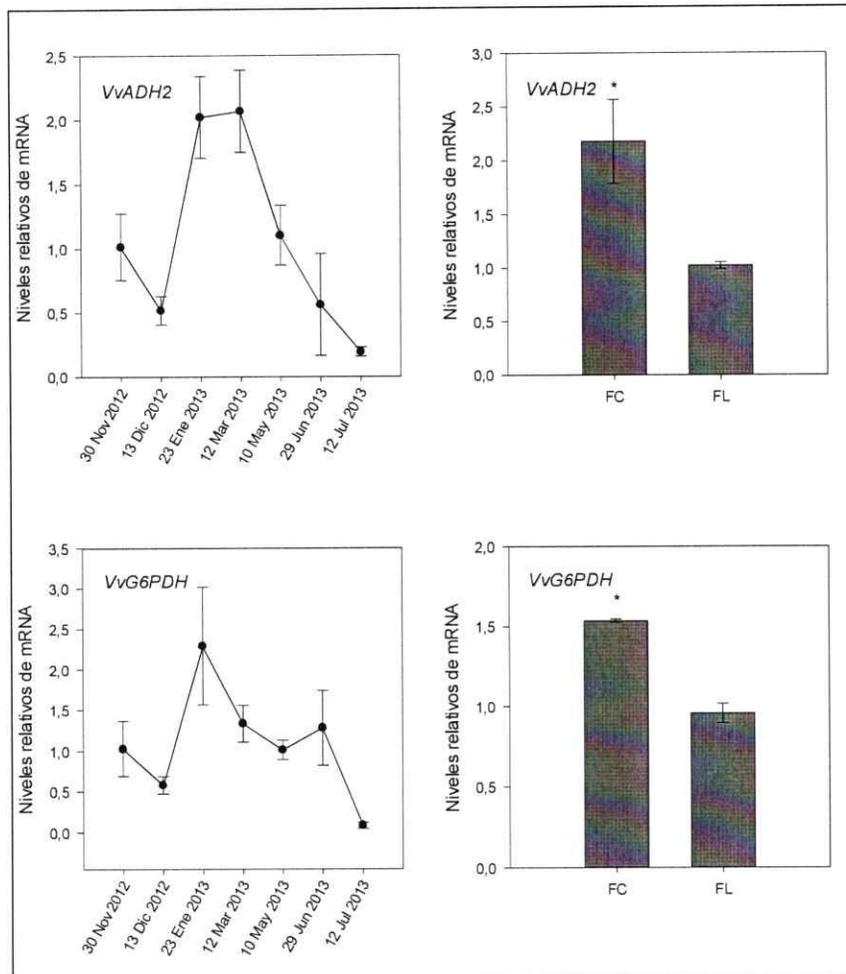


Figura 4. Efecto de la transición de PD a ED y del fotoperiodo sobre la expresión de los genes *VvADH2* y *VvG6PDH* en yemas de *Vitis vinifera*. El nivel de transcrito fue determinado por RT-qPCR normalizando contra *VvUBIQUITINA* usando el método $\Delta\Delta Ct$. Muestras colectadas el 30 de Noviembre fueron usadas como control en los experimentos de dormancia, y plantas expuestas a FL fueron usadas como control en los experimentos de fotoperiodo. Valores son el promedio de tres replicas biológicas, para cada una de las cuales se realizaron tres replicas técnicas. Barras representan error estándar. (*) indica diferencias significativas (Student test $P \leq 0,05$) respecto a las muestras sometidas a FL.

Efecto de la transición de PD a ED y del fotoperiodo sobre la expresión de genes de la ruta biosintética de almidón y en el contenido de almidón en yemas de vid

Se determinaron los cambios en los niveles de expresión de los genes involucrados en la ruta biosintética de almidón. Fueron analizados los genes *VvAGPase*, *VvSS1*, *VvSS3* y *Vv1,4-GB* a lo largo del ciclo anual de crecimiento (Fig. 5B). Los niveles de *VvSS3* y *Vv1,4-GB* incrementan fuertemente durante la transición de PD a ED, mientras que los niveles de *VvSS1* y *VvAGPase* varían levemente en el mismo periodo. A mediados de marzo, todos los genes analizados bajan drásticamente su expresión en forma transitoria, luego la expresión de *VvSS1*, *VvSS3* y *Vv1,4-GB* se mantiene alta hasta finales de junio, mientras que la expresión de *VvAGPase* cae gradualmente a medida que progresa el ciclo de crecimiento. Por otra parte, se determinó el efecto del fotoperiodo sobre la expresión de dichos genes. Luego de 8 semanas de exposición a tratamientos de fotoperiodo largo (FL) y fotoperiodo corto (FC) se observó que el FC induce significativamente la expresión de *VvSS3*, *VvAGPase* y *Vv1,4-GB* (Fig.5A). Finalmente, se determinó un incremento progresivo en el contenido de almidón en las yemas durante la ED (Fig. 5C).

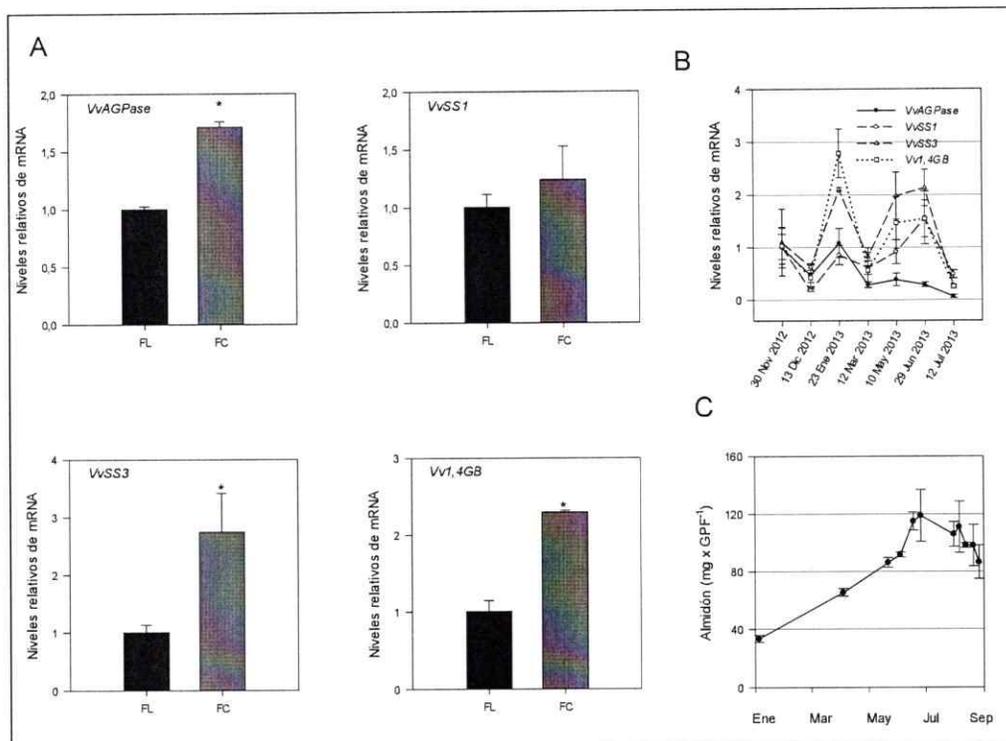


Figura 5. Efecto de la transición de PD a ED y del fotoperiodo sobre la expresión de los genes de la ruta biosintética de almidón; y contenido de almidón a lo largo del ciclo de crecimiento en yemas de *Vitis vinifera*. A) Efecto del fotoperiodo sobre la expresión de los genes de la ruta biosintética de almidón *VvAGPase*, *VvSS1*, *VvSS3* y *Vv1,4GB* en yemas de *V. vinifera* cv. Italia mejorada. B) Efecto de la transición de PD a ED sobre los genes de la ruta biosintética de almidón *VvAGPase*, *VvSS1*, *VvSS3* y *Vv1,4GB* en yemas de *V. vinifera* cv. Thompson Seedless en la temporada 2012-2013. El nivel de transcrito fue determinado por RT-qPCR normalizando contra *VvUBIQUITINA* usando el método $\Delta\Delta Ct$. Muestras colectadas el 30 de noviembre fueron usadas como control en los experimentos de dormancia. Valores son el promedio de tres replicas biológicas, para cada una de las cuales se realizaron tres replicas técnicas. C) Contenido de almidón a lo largo del ciclo de desarrollo en yemas de *V. vinifera* cv. Thompson Seedless en la temporada 2012-2013. Barras representan error estándar (*) indica diferencias significativas (Student test $P \leq 0,05$) respecto a las muestras sometidas a FL.

Niveles de azúcares solubles en yemas durante la transición de PD a ED

Se realizó un análisis en yemas de *Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless de los niveles de azúcares solubles por cromatografía de gases entre los meses de mayo y septiembre. Se determinó que durante el período de dormancia existe una disminución en los niveles de azúcares solubles glucosa, sacarosa y fructosa, alcanzando un

mínimo a finales de junio, para luego ir aumentando sus niveles progresivamente a medida que las yemas se preparan para brotar (Fig. 6).

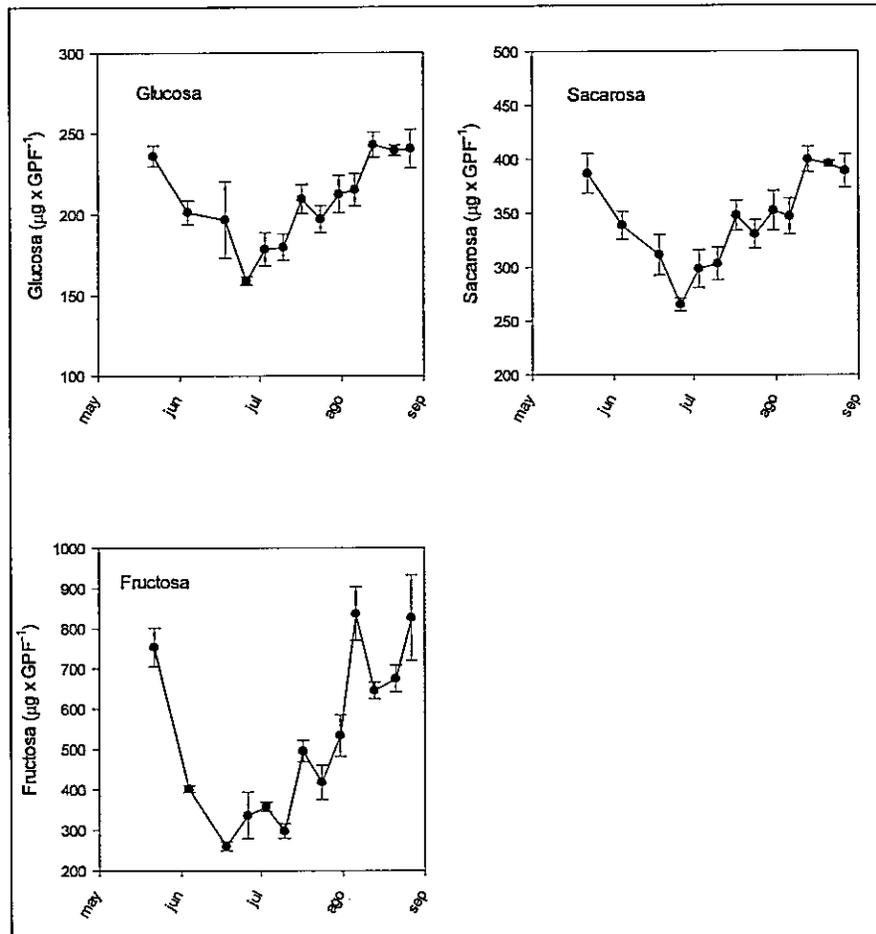


Figura 6. Niveles de azúcares solubles glucosa, sacarosa y fructosa en yemas de *Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless. Estos fueron cuantificados en el periodo de mayo a septiembre por cromatografía de gases. Valores son el promedio de tres replicas biológicas. Barras representan error estándar.

Efecto de la transición de PD a ED y del fotoperiodo sobre la expresión de genes relacionados a la respiración aeróbica (ciclo TCA y mETC) en yemas de vid

Se determinaron los cambios en los niveles de expresión de genes involucrados en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), *VvACO2* y *VvFUM1* y la cadena de transporte de electrones mitocondrial (mETC), *VvCOX6a* y *VvCITC*. En el genoma de *Vitis vinifera* se pudo identificar tres genes codificantes para aconitasa mitocondrial, *VvACO1* (GSVIVT0103058801), *VvACO2* (GSVIVT01037657001) y *VvACO3* (GSVIVT01005190001). En este estudio se analizó *VvACO2* debido a su alta expresión en las yemas de vid (Halaly y col., 2008). En el genoma de *V. vinifera* se identificó un gen de *VvFUM* de destinación mitocondrial (GSVIVT01028056001) y uno cloroplastidial (GSVIVT01031185001), y en este estudio se analizó el gen mitocondrial (*VvFUM1*). La isoforma cloroplastidial no fue analizada ya que la evidencia indica que existiría una baja actividad fotosintética durante el período de dormancia (Díaz-Riquelme y col., 2012). Por otro lado, *VvCOX6a* es una subunidad mitocondrial y codifica para la citocromo oxidasa (GSVIVT01006593001) y fue analizada debido a su alta expresión en yemas de vid (Halaly y col., 2008). Además se realizó el análisis del gen *VvCITC* (GSVIVT01036385001) de expresión nuclear y que codifica para la proteína citocromo c (Noctor y col., 2007).

Se determinó que la expresión de *VvACO2* y *VvFUM1* incrementó durante la transición de PD a ED y luego ocurre una disminución progresiva en su expresión durante el periodo de dormancia. Al término de la ED y en forma previa a la brotación, la expresión de *VvFUM1* incrementa significativamente mientras que la de *VvACO2* continúa descendiendo (Fig. 7). En el caso de *VvCOX6a* y *VvCITC*, ocurrió una disminución progresiva en la expresión durante el periodo de ED. Por otra parte, se

observa que la expresión de *VvFUM1* incrementó significativamente bajo condición de fotoperiodo corto y la de *VvCITC* disminuyó significativamente bajo la misma condición, mientras que la expresión de *VvACO2* y *VvCOX6a* no fueron afectadas significativamente.

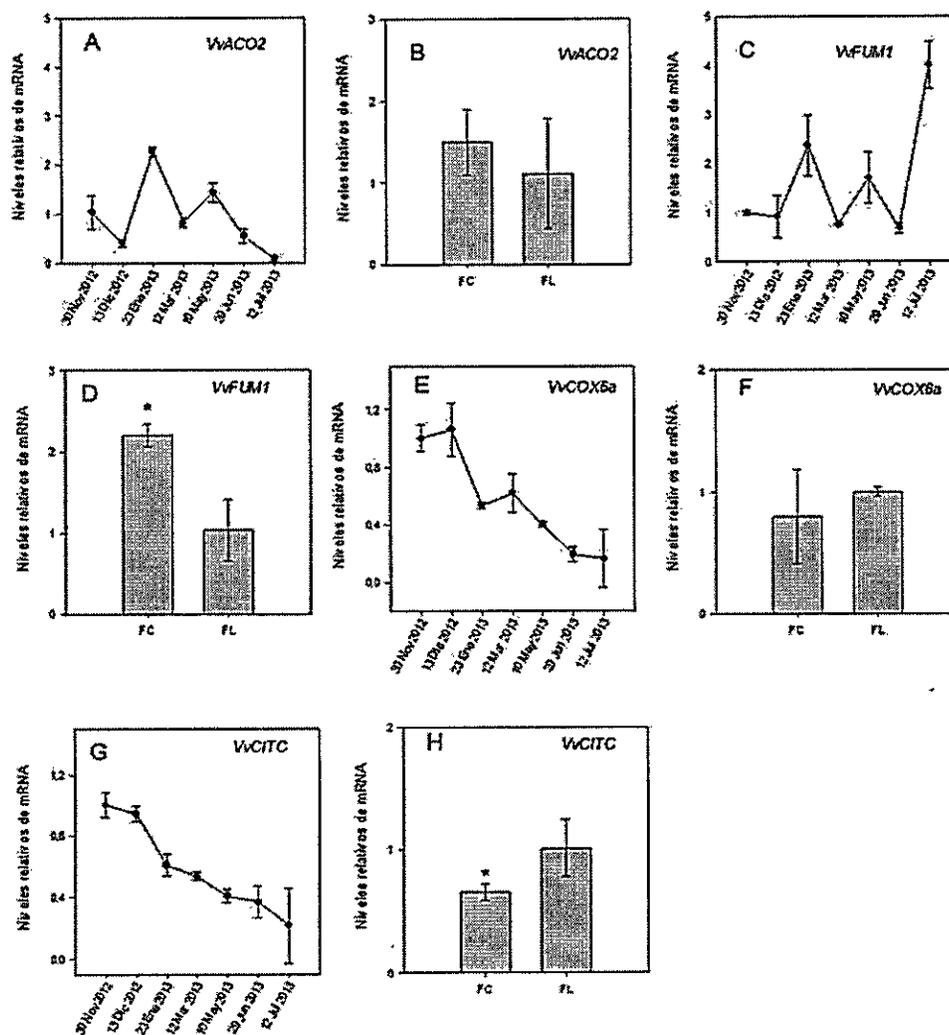


Figura 7. Efecto de la transición de PD a ED y del fotoperiodo sobre la expresión de los genes relacionados a la respiración aeróbica. Se muestra la expresión de los genes *VvACO2* y *VvFUM1* del ciclo TCA y los genes *VvCOX6a* y *VvCITC* de la mETC en yemas de *Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless a lo largo del ciclo de desarrollo como el efecto del fotoperiodo sobre los mismos genes en yemas de *Vitis vinifera* cv. Italia meliorada. El nivel de transcrito fue determinado por RT-qPCR normalizando contra *VvUBIQUITINA* usando el método $\Delta\Delta C_t$. Muestras colectadas el 30 de

noviembre fueron usadas como control en los experimentos de dormancia, y plantas expuestas a fotoperiodo largo fueron usadas como control en los experimentos de fotoperiodo. Valores son el promedio de tres replicas biológicas, para cada una de las cuales se realizaron tres replicas técnicas. Barras representan error estándar. (*) indica diferencias significativas (Student test $P \leq 0,05$) respecto a las muestras sometidas a FL.

Efecto de la temperatura sobre la tasa de consumo de oxígeno en yemas para- y endodormantes

Se determinó la tasa de consumo de oxígeno para yemas paradormantes (colectadas en septiembre de 2013) y de yemas endodormantes (colectadas en abril de 2014) de *V. vinifera* cv. Thompson Seedless a diferentes temperaturas en el rango de 5-25 °C (Fig. 8). Se observó que la tasa respiratoria de las yemas endodormantes es menos sensible a los cambios en la temperatura que las yemas paradormantes. En el rango de 5-15 °C la tasa respiratoria de yemas endodormantes se mantuvo relativamente estable en 20 ± 3 [nmol O₂ min⁻¹GPF], mientras que para las yemas paradormantes, aumentó desde 25.4 ± 0.4 a 48.6 ± 8.9 [nmol O₂ min⁻¹GPF]. En el rango de 15-25 °C, la tasa respiratoria para ambos tipos de yemas aumentó, sin embargo el efecto de la temperatura fue mucho más significativo sobre las yemas paradormantes que sobre las endodormantes. Las diferencias son significativas para las tasas de respiración medidas a distintas temperaturas respecto a la temperatura de 5 °C ya sea en yemas endodormantes como en paradormantes, como también existe una diferencia significativa entre las mediciones realizadas a la misma temperatura pero en distinto estado de dormancia, para cada una de las temperaturas medidas.

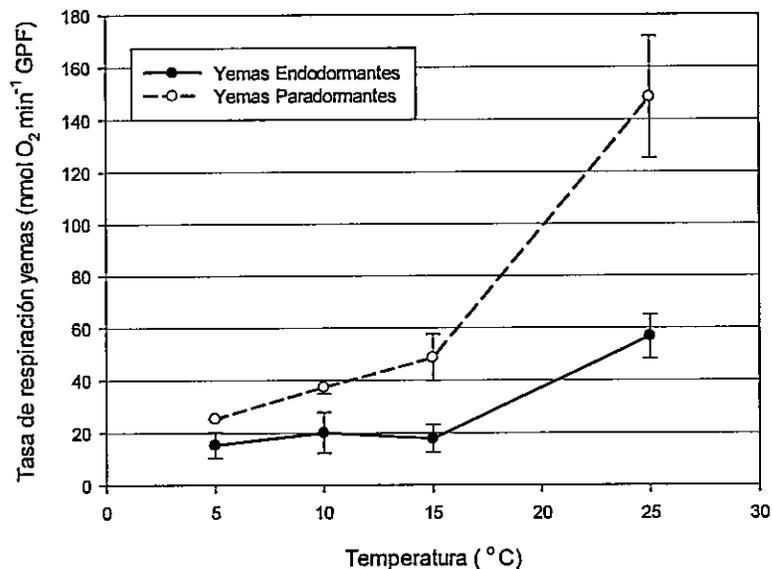


Figura 8. Efecto de la temperatura sobre la tasa de consumo de oxígeno de yemas endodormantes y paradormantes de *Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless. La tasa respiratoria fue determinada polarográficamente con un electrodo de oxígeno tipo Clark a 5, 10, 15 y 25 °C. Barras representan el error estándar (n=3).

Efecto de compuestos rompedores de dormancia sobre la tasa de consumo de oxígeno en yemas endodormantes

Se determinó que la tasa respiratoria de las yemas control, aumenta con el período de residencia de éstas en la cámara de crecimiento bajo condiciones forzadas, indicando que en la medida que las yemas se liberan de la ED aumenta la tasa respiratoria y que existe un fuerte incremento en la respiración justo antes de que broten las yemas (Fig. 9). Para el caso de las yemas endodormantes tratadas con los compuestos rompedores de dormancia cianamida hidrogenada (H_2CN_2) y azida de sodio (NaN_3), este incremento en la tasa respiratoria se adelantó en el tiempo, lo que es consistente con su capacidad para liberar a las yemas de la ED (Fig. 9).

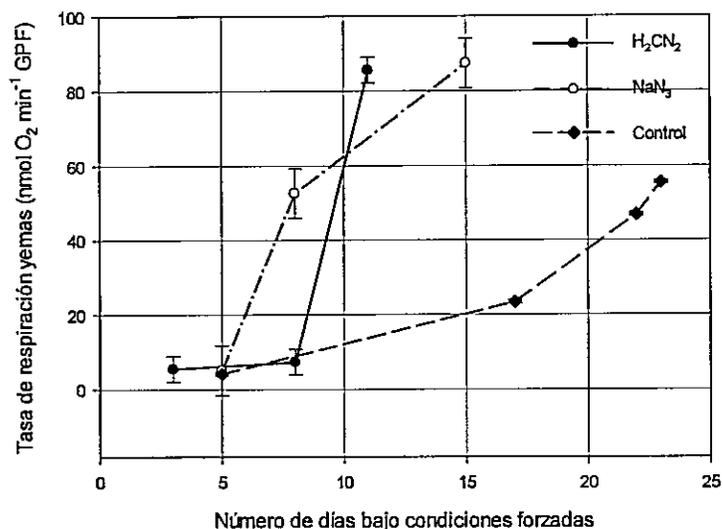


Figura 9. Efecto de los compuestos rompedores de dormancia, cianamida hidrogenada (H_2CN_2) y azida de sodio (NaN_3) sobre la tasa respiratoria de yemas endodormantes de nodo único de *Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless. Las yemas fueron rociadas con una solución de cianamida al 2,5 % o de azida de sodio al 2,0 % y con agua como control. Luego fueron mantenidas en una cámara de crecimiento a $23 \pm 1^\circ C$ y bajo fotoperiodo de 16/8 hrs de luz/oscuridad. La tasa respiratoria fue determinada polarográficamente con un electrodo de oxígeno tipo Clark a $25^\circ C$. Barras representan el error estándar ($n=3$).

Efecto de la glucosa sobre la tasa respiratoria de yemas

Dado que se ha demostrado que la glucosa es un estímulo que normalmente aumenta la respiración en plantas (Atkin & Tjoelker, 2003), se analizó el efecto de la glucosa sobre la tasa respiratoria de yemas de *Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless paradormantes (colectadas el día 9 de enero de 2015) y yemas endodormantes (colectadas el 15 de marzo de 2015), las que fueron tratadas con una solución de 2% de glucosa usando yemas tratadas con agua como control. Se midió la tasa de respiración 1, 2 y 7 días post-tratamiento. Se determinó que en yemas paradormantes, la glucosa produce un aumento en la tasa respiratoria a los 2 y a los 7 días post-

tratamiento (Fig. 10A). Por el contrario, en yemas endodormantes la glucosa no produce un cambio significativo en la tasa respiratoria (Fig. 10B).

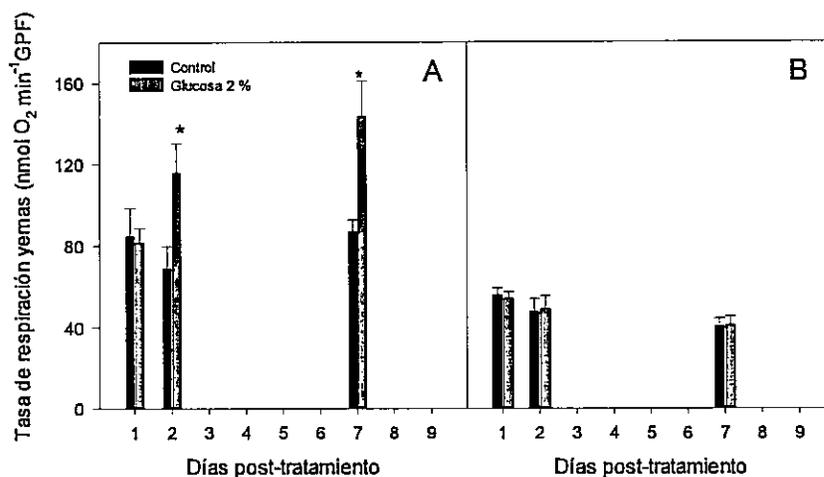


Figura 10. Efecto de la glucosa sobre la tasa de consumo de oxígeno en A) yemas paradormantes y B) yemas endodormantes de *Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless. Las yemas fueron tratadas con una solución de glucosa al 2% usando agua como control. Luego de los tratamientos fueron mantenidas en cámara de crecimiento a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y con fotoperíodo de 16/8 hrs de luz/oscuridad. La tasa respiratoria fue determinada polarográficamente con un electrodo de oxígeno tipo Clark a 25°C , a los 1, 2 y 7 días post-tratamiento. Barras representan el error estándar ($n=5$). (*) indica diferencias significativas (Student test $P \leq 0,05$) respecto a las muestras control, no tratadas con glucosa, en el día respectivo de medición.

Efecto del ácido abscísico sobre la tasa respiratoria y en los niveles de azúcares solubles de yemas de vid paradormantes

Se analizó el efecto del ácido abscísico (ABA) sobre la tasa respiratoria de yemas paradormantes y endodormantes de *Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless. Para ello las yemas fueron tratadas una vez con $100 \mu\text{M}$ ABA y agua como control, luego fueron mantenidas en la cámara de crecimiento y se midió la tasa respiratoria a los 1 y 3 días post-tratamiento. Se determinó que en el caso de las yemas paradormantes el primer día post-tratamiento no existen cambios significativos en la tasa respiratoria, mientras que a los 3 días post-tratamiento existe una reducción significativa en la respiración en

las yemas tratadas con ABA (Fig. 11A). Para el caso de las yemas endodormantes, no existen cambios significativos en la tasa respiratoria al ser tratadas con ABA (Fig. 11B).

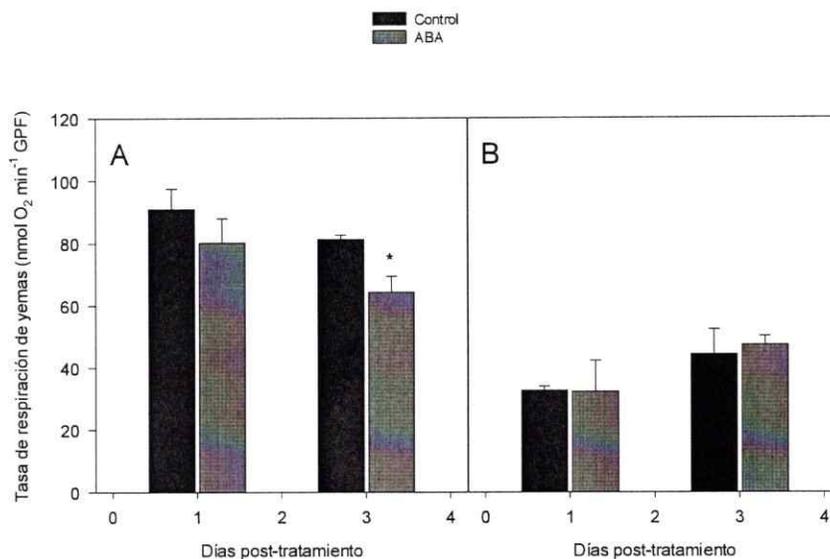


Figura 11. Efecto del ácido abscísico (ABA) sobre la tasa respiratoria de yemas de *Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless. Las yemas fueron tratadas con 100 μ M ABA y agua como control, luego fueron mantenidas en la cámara de crecimiento a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y bajo fotoperiodo de 16/8 hrs de luz/oscuridad. La tasa respiratoria fue determinada a los 1 y 3 días post-tratamiento, de forma polarográfica con un electrodo de oxígeno tipo Clark a 25°C , para yemas A) paradormantes y B) endodormantes. Barras representan el error estándar ($n=5$). (*) indica diferencias significativas (Student test $P \leq 0,05$) respecto a las muestras control, no tratadas con ABA, en el día respectivo de medición.

Por otro lado, se analizó los niveles de azúcares solubles sacarosa, glucosa y fructosa en yemas paradormantes tratadas con 100 μ M ABA y agua como control, a los 3 días post-tratamiento. Se determinó que los niveles de azúcares no se ven afectados por la aplicación de ABA (Fig. 12).



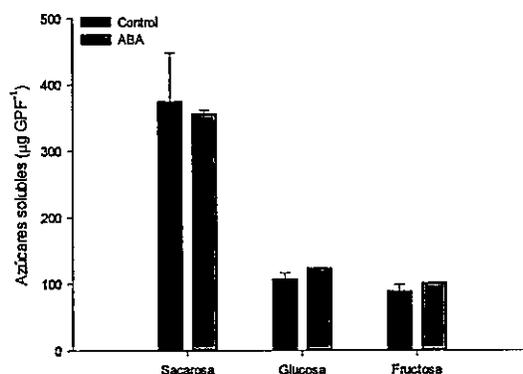


Figura 12. Efecto del ácido abscísico (ABA) sobre los niveles de azúcares solubles en yemas paradoras de *Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless. Las yemas fueron tratadas con 100 µM ABA y agua como control, luego fueron mantenidas en la cámara de crecimiento a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y bajo fotoperiodo de 16/8 hrs de luz/oscuridad. Los niveles de azúcares sacarosa, glucosa y fructosa fueron cuantificados por cromatografía de gases a los 3 días post-tratamiento. Barras representan el error estándar ($n=3$).

Efecto de la hipoxia, ABA y transición hacia la ED sobre los niveles de expresión de los genes VvSnRK1 en yemas de vid

A partir del análisis bioinformático del homólogo de la subunidad catalítica de la proteína SNF1, proteína serina-treonina kinasa de levaduras, se determinó *in silico* por identidad de secuencia, que existen dos isogenes en el genoma de *Vitis vinifera*, *VvSnRK1α* (GSVIVT01011467001) y *VvSnRK1β* (GSVIVT01025806001).

Se analizó el efecto de la hipoxia sobre la expresión de *VvSnRK1α* y *VvSnRK1β*, sometiendo a yemas de *V. vinifera* cv. Thompson Seedless a 3, 6, 12, 18 o 24 hrs de hipoxia. Se determinó que ambos transcritos se acumulan después de 6 horas de tratamiento, sin embargo después de 12 hrs de tratamiento sus niveles caen considerablemente y luego de 18 y 24 hrs post-tratamiento sus niveles aumentan fuertemente (Fig. 13A). Además se analizó si ABA regula transcripcionalmente la expresión de *VvSnRK1α* y *VvSnRK1β*, aplicando 100 µM ABA y usando agua como

control sobre yemas de vid, para posteriormente analizar por RT-qPCR la expresión de los transcritos 1 y 3 días post-tratamiento. Los resultados muestran que ABA aumenta significativa y gradualmente la expresión de ambos transcritos, aunque *VvSnRK1β* fue más sensible a la aplicación de ABA (Fig. 13B). Dado que los niveles de ABA son mayores en yemas endodormantes que en yemas paradormantes (Zheng y col., 2015), se analizó el efecto de la transición hacia la ED sobre la expresión de *VvSnRK1α* y *VvSnRK1β* en yemas de vid, determinándose que la transición hacia la ED aumenta significativamente la expresión de ambos transcritos en yemas de *V. vinifera* cv. Thompson Seedless (Fig. 13C).

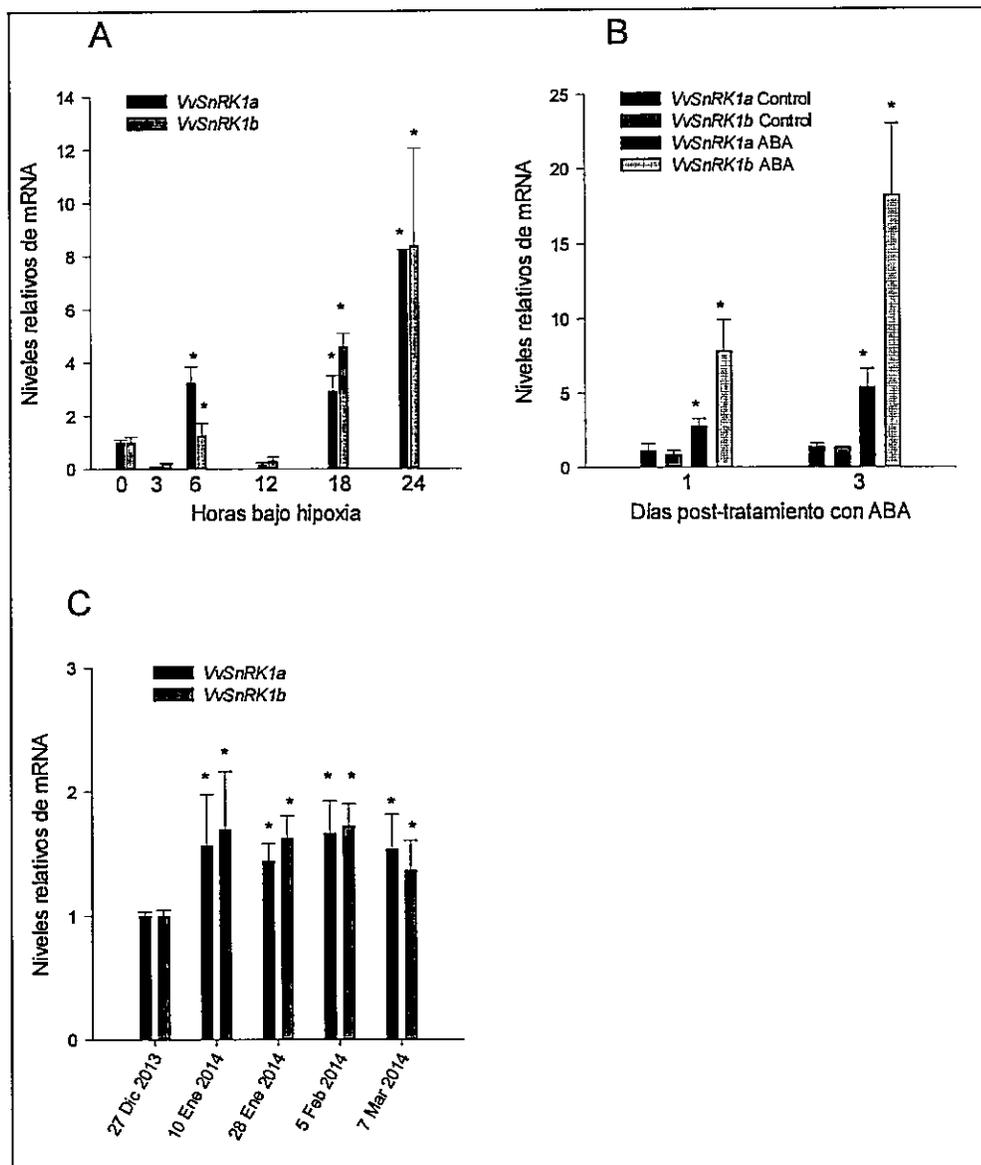


Figura 13. Efecto de la hipoxia, ácido abscísico (ABA) y transición hacia la ED sobre los niveles de expresión de los genes *VvSnRK1* en yemas de *Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless. A) Esquejes de yema única fueron sometidos a hipoxia por burbujeo de nitrógeno por 3, 6, 12, 18 o 24 hrs, para posteriormente realizar los análisis de expresión génica de las yemas. B) Las yemas fueron tratadas con 100 μ M ABA y agua como control y luego fueron mantenidas en la cámara de crecimiento a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y bajo fotoperiodo de 16/8 hrs de luz/oscuridad hasta su análisis. C) Niveles de transcritos se cuantificaron durante la transición a la ED, entre los meses de diciembre y marzo de 2015. El nivel de transcrito fue determinado por RT-qPCR normalizando contra *VvUBIQUITINA* usando el método $\Delta\Delta\text{Ct}$ y este fue analizado a 1 y 3 días post-tratamiento. Valores son el promedio de tres replicas biológicas, para cada una de las cuales se realizaron tres replicas técnicas. Barras representan error estándar ($n=3$). (*) Indica diferencias significativas (Student test $P \leq 0,05$) respecto a A) muestras 0 hrs bajo hipoxia, B) muestras control, no tratadas con ABA y C) muestras colectadas el 27 de diciembre de 2013.

Efecto del fotoperiodo sobre la expresión del gen VvNCED3 de la ruta biosintética de ABA en yemas de vid

Se han identificado previamente por análisis bioinformáticos tres homólogos putativos de *NCED* en vides (Zheng y col., 2015), gen que codifica para la enzima 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa la que es una enzima clave en la síntesis de ABA (Qin & Zeevaart, 2002; Lefebvre y col., 2006). Los tres genes *VvNCED* se expresan en yemas maduras de vid, y durante el presente estudio, *VvNCED3* fue analizado dado que aumenta significativamente su expresión en respuesta a la aplicación de H_2CN_2 , en contraste con *VvNCED1* que disminuye su expresión y *VvNCED2* que responde en menor medida (Zheng y col., 2015). Éste fue analizado en respuesta al fotoperiodo en yemas de *V. vinifera* cv. Italia mejorada y los resultados muestran que los niveles de *VvNCED3* varían a lo largo del día tanto bajo FC como FL, sin embargo, bajo condición de FC los niveles de transcrito son significativamente más altos al amanecer y al atardecer (6 hrs y 18 hrs en Brasil, respectivamente) (Fig. 14).

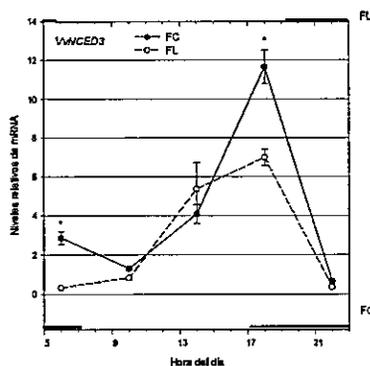


Figura 14. Efecto del fotoperiodo sobre la expresión de *VvNCED3* en yemas de vid. Experimentos de fotoperiodo fueron realizados en yemas de *V. vinifera* cv. Italia mejorada en invernaderos bajo FL (14/10 hrs luz/oscuridad) o FC (10/14 hrs luz/oscuridad). Después de 8 semanas de tratamiento las yemas de vid fueron colectadas a diferentes horas del día (6, 10, 14, 18, 22 hrs) y se determinó los niveles de transcrito de *VvNCED3*. El nivel de transcrito fue determinado por RT-qPCR normalizando contra *VvUBIQUITINA* usando el método $\Delta\Delta Ct$. Valores son el promedio de tres replicas biológicas, para cada una de las cuales se realizaron tres replicas técnicas. Las barras oscuras en los ejes horizontales de la figura, indican las horas de oscuridad tanto en FL como FC. Barras representan error estándar (n=3). (*) indica diferencias significativas (Student test $P \leq 0,05$) respecto a las muestras sometidas a FL a las horas respectivas (6 y 18 hrs).

DISCUSIÓN

La tasa respiratoria de las yemas de vid está inversamente relacionada con la profundidad de la dormancia

En este estudio, se determinó una relación inversa entre la profundidad de la dormancia y la tasa respiratoria de las yemas de vid (Fig. 3), y además se determinó que durante la transición de las yemas hacia la ED, la caída en la tasa respiratoria está acompañada de un incremento en el contenido de almidón (Fig. 5C). En cuanto a los datos de expresión génica, estos fueron consistentes con esta observación, dado que por un lado ocurrió una caída en los niveles de expresión génica en los genes codificantes para enzimas relacionadas a la respiración aeróbica (*VvCITC* y *VvCOX6a*) (Fig. 7E-H) y por otro lado, ocurrió un aumento en general en la expresión de los genes de la ruta biosintética de almidón (*VvSS1*, *VvSS3*, *VvAGPase* y *Vv1,4GB*) por efecto de la entrada en ED (Fig. 5B). Cabe destacar que la expresión de todos estos genes disminuye el 12 de marzo posiblemente por un fenómeno fisiológico aún no caracterizado o por alguna alteración con las muestras colectadas en esa fecha. La eficiencia de la síntesis de almidón podría estar no sólo relacionada a la tasa de transcripción de dichos genes sino también a la síntesis de las proteínas, la actividad de las enzimas de la ruta biosintética o de algún mecanismo post-traducciona no analizado en este trabajo. Por otra parte, existe un aumento en la expresión de *VvAGPase*, *VvSS3* y *Vv1,4GB* por efecto del FC (Fig. 5A), lo cual es consistente con el hecho de que la ED es inducida por el acortamiento del fotoperiodo en *V. vinifera*.

Se predice que la caída en la respiración tendrá un impacto en la producción de ATP y poder reductor, como también en la glucosa acumulada que no ingresará al ciclo TCA, por lo que deben existir mecanismos de compensación, que incluyan un ajuste del flujo metabólico activando vías alternativas. El aumento de la expresión de *VvADH2* como de *VvG6PDH* por efecto de la entrada en ED como por efecto del FC, indica una activación de las vías fermentativa y de las pentosas fosfato durante la entrada a ED. En ausencia de oxígeno, se activa la fermentación que acoplada a la glicólisis produce ATP y la vía de las pentosas fosfato que produce NADPH (Femie y col., 2004; Kruger & von Schaewen, 2003) lo que permite la mantención de distintos procesos biosintéticos. Por tanto, la activación de estas dos vías durante la ED podría permitir el mantenimiento del metabolismo a pesar de la caída en la respiración. Es posible que la caída en la respiración no se deba a cambios en los niveles de los genes del ciclo TCA, sino más bien a una caída en los niveles de expresión de genes del mETC y a un redireccionamiento del metabolismo de la glucosa hacia otras vías, como por ejemplo, la vía de las pentosas fosfato, la fermentativa y la vía de biosíntesis de almidón. Los datos de expresión génica presentados en este trabajo, demuestran que el gen *VvACO2* no cambia sus niveles en respuesta al FC, mientras que *VvFUM1* aumenta (Fig. 7B, 7D). Los niveles de expresión de *VvACO2* y *VvFUM1* oscilan a lo largo del período de dormancia (Fig. 7A, 7C), pero cabe destacar que existe un aumento drástico en la expresión de *VvFUM1* el 12 de julio, cuando las yemas salen de la dormancia y se preparan para brotar (Fig. 7C).

La temperatura, es uno de los principales factores que afecta la tasa respiratoria en las plantas. Aunque la tasa respiratoria suele ser menor cuando es medida a temperaturas

más bajas, algunas plantas son capaces de mantener tasas de respiración similares cuando crecen a distintas temperaturas, lo que se ha denominado homeostasis respiratoria (Kurimoto y col., 2004; Atkin & Tjoelker, 2003). Se utiliza el parámetro Q_{10} para designar el cambio proporcional en la respiración por cada 10 °C de incremento en la temperatura. El Q_{10} es mayor cuando el flujo respiratorio está limitado por la capacidad enzimática que cuando está limitado por el suministro de sustrato. Por el contrario, la transición desde un control enzimático hacia limitaciones impuestas por el suministro de sustrato o adenilatos, está asociado con una baja en el Q_{10} (Atkin & Tjoelker, 2003). Los resultados de este trabajo, muestran que el Q_{10} de las yemas endodormantes es significativamente menor que el Q_{10} de las yemas paradormantes, y esta diferencia fue mayor en las mediciones realizadas a temperaturas moderadamente altas (15-25 °C) respecto a las realizadas a temperaturas bajas (5 °C) (Fig. 8). Por tanto, se podría postular que la tasa de respiración de las yemas de vid endodormantes estaría limitada por el suministro de sustrato para la respiración. Otra evidencia que apoyaría esta hipótesis es que el contenido de azúcares solubles en las yemas de vid es muy baja (Fig. 6; 0,6-1,4mg GPF⁻¹) comparado con otros órganos sumideros como las bayas (0,36-18,36 g GPF⁻¹) (Muñoz-Robledo y col., 2011). Además, el aumento en la expresión de los genes codificantes para enzimas de la vía fermentativa (*VvADH2*), vía de las pentosas fosfato (*VvG6PDH*) y biosíntesis de almidón (*VvAGPase*, *VvSS1*, *VvSS3* y *Vv1,4-GB*) activa estas vías consumidoras de carbono durante la ED. El incremento en el consumo de azúcares en un órgano con bajo contenido de azúcares, como es la yema endodormante, podría generar una severa reducción en la disponibilidad de sustratos respiratorios (azúcares), y de esta forma limitar su tasa respiratoria.

Por otro lado, el efecto de adelantamiento en el *peak* respiratorio generado por la H_2CN_2 y NaN_3 sobre las yemas endodormantes (Fig. 9), puede estar relacionado a su habilidad para romper la dormancia. Sorprendentemente, a tiempos cortos, ambos compuestos inhiben transitoriamente la tasa respiratoria en yemas de vid (Pérez y col., 2009; Vergara y col., 2012a). Sin embargo, a tiempos largos, producen un adelantamiento en el *peak* respiratorio de las yemas endodormantes. Por lo tanto, una inhibición temprana de la tasa respiratoria por parte de los compuestos H_2CN_2 y NaN_3 puede producir un estrés subletal, llevando a incrementar la tasa respiratoria en las yemas endodormantes. Previamente, se ha reportado que la hipoxia y la H_2CN_2 inducen la expresión de genes que codifican para las enzimas que degradan el almidón (Rubio y col., 2014), y ambos estímulos incrementan los niveles de H_2O_2 en las yemas de vid (Vergara y col., 2012b). Debido a que el aumento de H_2O_2 ocurre principalmente por interrupción de la mETC en yemas de vid (Vergara y col., 2012b), y la hidrólisis de almidón es estimulada por inhibidores de la respiración (Rubio y col., 2014), es posible suponer que a largo plazo, los inhibidores de la respiración incrementen la tasa de respiración en yemas de vid a través de un incremento en el suministro de azúcares, y mediante este mecanismo promover la liberación de la dormancia en las yemas. Existe evidencia que indica que ABA regula la dormancia de las yemas de vid, y que los estímulos liberadores de la dormancia como H_2CN_2 , NaN_3 e hipoxia actuarían mediante la modificación del metabolismo de ABA (Zheng y col., 2015). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la glucosa aumenta la tasa respiratoria en yemas paradormantes y no de endodormantes (Fig. 10), y que ABA reduce la respiración de yemas paradormantes y no de endodormantes (Fig. 11). En conjunto, esto impide concluir que la falta de sustratos respiratorios sea la principal causa de la fuerte caída en la tasa respiratoria de las yemas endodormantes, sugiriendo además que ABA

podría estar actuando como un inhibidor respiratorio y/o metabólico dentro de la yema endodormante. Además, los mayores niveles de ABA en yemas endodormantes que en las paradormantes (Zheng y col., 2015), es consistente con los bajos niveles de respiración de las yemas endodormantes (Fig. 3), y con el menor efecto de la temperatura sobre la respiración de éstas yemas (Fig. 8).

ABA como un regulador clave en la dormancia de yemas de vid

Se determinó que ABA induce la expresión de los isogenes de *VvSnRK1* (Fig. 13A), que codifica para la subunidad catalítica de la proteína kinasasucrose-non-fermenting-1-related (*SnRK1*), que es la ortóloga en plantas de SNF1 de levaduras y AMPK de animales. Tanto *SnRK1*, SNF1 y AMPK actúan como sensores de los niveles energéticos en todos los organismos eucariontes y son activadas bajo condiciones de privación de energía o estrés metabólico, para inhibir el crecimiento y conservar la energía para la sobrevivencia de las células (Hardie, 2007; Baena-González & Sheen, 2008; Ghillebert y col., 2011). *SnRK1* participa en respuestas a azúcar, oscuridad y un rango de estreses que limitan la fotosíntesis y la respiración (Baena-González y col., 2007). Cuando se encuentra activada, *SnRK1* provoca grandes cambios transcripcionales que reestablecen la homeostasis y promueven tolerancia al estrés y sobrevivencia, a través de la inhibición del anabolismo y la activación del catabolismo (Confraria y col., 2013). Existe evidencia indicando que ABA regula positivamente la actividad de *SnRK1* por la inhibición de proteínas fosfatasa tipo 2C (PP2Cs) (Rodríguez y col., 2013), pero no existe evidencia indicando que ABA regule transcripcionalmente la expresión de *SnRK1*. Por lo tanto, postulamos que la regulación positiva de ABA sobre *VvSnRK1* observada en yemas de vid, es indirecta, y estaría mediada por un estrés respiratorio. Así, como en el caso de la hipoxia, la

inhibición de ABA sobre la tasa respiratoria en yemas, produciría un descenso transitorio en los niveles de azúcares que aumenta la expresión de *VvSnRK1*. Curiosamente, en yemas de vid bajo hipoxia, el perfil de expresión de *VvSnRK1* es contrastante con los cambios en los niveles de azúcares, porque después de 12 hrs de hipoxia el contenido de azúcares incrementa significativamente junto con una caída en los niveles de expresión de *VvSnRK1*, mientras que después de 18 y 24 hrs de hipoxia se observa una caída en los niveles de azúcares acompañado con un aumento en los niveles de expresión de *VvSnRK1* (Rubio y col., 2014). Estos resultados son consistentes con observaciones previas indicando que *SnRK1* es inducida a nivel transcripcional por la hipoxia y regulada positivamente por el déficit de azúcares y negativamente por incrementos en el contenido de azúcares. En órganos sumideros como los tubérculos de las papas, se ha reportado que la síntesis de almidón está bajo regulación de *SnRK1*. Plantas de papa transgénica sobreexpresando *SnRK1* mostraron un aumento en los niveles de almidón de cerca de 30%, mientras que los niveles de glucosa se redujeron hasta en un 56%. La expresión génica y la actividad de dos enzimas claves involucradas en la ruta biosintética de almidón, sacarosa sintasa (SUSY) y ADP-glucosa pirofosforilasa, aumentaron en el tubérculo transgénico (McKibbin y col., 2006). Además, se ha determinado que la ADP-glucosa pirofosforilasa es regulada por *SnRK1*, modulando tanto su estado redox como su expresión génica en *Arabidopsis* (Baena-González y col., 2007), como también se ha reportado que *SnRK1* es necesaria para la modulación redox de la actividad de ADP-glucosa pirofosforilasa en respuesta a sacarosa en tubérculos de papa (Tiessen y col., 2003).

Se ha demostrado que la síntesis de ABA puede ser controlado por la expresión diferencial de los genes *NCED*, que codifican para la enzima 9-cis-epoxicarotenoide

dioxigenasa, la que cataliza la primera reacción específica de la síntesis de ABA (Schwartz y col., 1997). Además la sobreexpresión de *NCED* en diversas especies de plantas incrementa tanto la tolerancia al estrés osmótico como la dormancia de las semillas (Iuchi y col., 2001; Qin & Zeevart, 2002; Thompson y col., 2000). El hecho de que el fotoperiodo corto aumente la expresión de *VvNCED3* en yemas de vid (Fig. 14), y que *VvSnRK1 α* y *VvSnRK1 β* aumenten su expresión durante la transición hacia la ED (Fig. 13C), sugiere que ABA a través de la mediación de *VvSnRK1* podría jugar un papel clave en la inducción de la dormancia en yemas de vid, regulando cambios metabólicos como la inhibición de la respiración aeróbica y la estimulación de la síntesis de almidón.



CONCLUSIONES

- La profundidad de la endodormancia está inversamente relacionada con la tasa respiratoria de las yemas de vid
- La transición de PD a ED aumenta la expresión de genes relacionados a las vías fermentativa y de las pentosas fosfato, mientras que disminuye la expresión de aquellos relacionados a la respiración aeróbica
- La transición de PD a ED aumenta el contenido de almidón
- La respiración de yemas endodormantes es menos sensible a las temperaturas bajas respecto a las paradormantes
- Los compuestos rompedores de dormancia, azida de sodio y cianamida hidrogenada, ejercen un efecto positivo sobre la respiración de las yemas, lo que tendría relación con su mecanismo de acción en el adelanto de la brotación
- La glucosa aumenta la respiración de yemas paradormantes pero no así de las en estado endodormante
- La hormona ABA inhibe la respiración de yemas paradormantes, pero no de las endodormantes
- La hormona ABA no afecta los niveles de azúcares solubles sacarosa, glucosa y fructosa
- La transición hacia ED, la hipoxia y ABA aumentan los niveles de expresión de *VvSnRK1*, un sensor energético
- El fotoperiodo corto regula la expresión de *VvNCED3*, que participa en la biosíntesis de ABA
- Finalmente, se concluye que la hormona ABA, a través de la mediación de *VvSnRK1*, podría ser clave en la inducción de ED en las yemas de vid,

regulando distintos cambios metabólicos como la inhibición de la respiración aeróbica y el aumento en la síntesis de almidón

PROYECCIONES

Este trabajo entrega nueva información sobre un posible modelo de regulación en la inducción de la endodormancia en las yemas de vid, como también los cambios metabólicos asociados. El entendimiento de este proceso fisiológico en conjunto con el mecanismo de acción de los compuestos rompedores de dormancia, puede permitir a futuro mejorar el manejo agrícola como también el desarrollo de variedades en que se altere el ciclo crecimiento-dormancia para permitir su cultivo de acuerdo a las condiciones ambientales de temperatura y fotoperiodo particulares de cada país.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

Parada F y Pérez F. 2014. Modalidad exposición oral. Respiratory changes in buds of *Vitis vinifera* during the transition from Paradormancy to Endodormancy: A shift from aerobic respiration to fermentation. IX Reunión de Biología Vegetal, p28. La Serena, Chile.

BIBLIOGRAFÍA

- Amthor J.S.** 1989. Respiration and crop productivity. Springer Verlag, NY, USA
- Atkin O.K, Tjoelker M.G.** 2003. Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. *Trends in Plant Science* **8**:343-51
- Baena-González E, Rolland E, Thevelein J.M, Sheen J.** 2007. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signaling. *Nature* **448**: 938-42
- Baena-González E, Sheen J.** 2008. Convergent energy and stress signaling. *Trends in Plant Science* **13**: 474-82
- Borges A.F, Fonseca C, Ferreira R.B, Lourenço A.M, Monteiro S.** 2014. Reference gene validation for quantitative RT-PCR during biotic and abiotic stresses in *Vitis vinifera*. *PLoS ONE* **9**(10): e111399.
- Bowen H.H, Erickson G.W.** 1978. Relationship of endogenous flower bud abscisic acid to peach chilling requirements, bloom dates, and applied gibberellic acid. *HortScience* **13**: 694-696
- Campoy J.A, Ruiz D, Egea J.** 2011. Dormancy in temperate fruit trees in a global warming context: A review. *Scientia Horticulturae* **130**: 357-372
- Chang S, Puryear J, Cairney J.** 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* **11**: 113-116
- Chao W.S, Foley M.E, Horvath D.P, Anderson J.V.** 2007. Signals regulating dormancy in vegetative buds. *International Journal of Plant Development Biology* **1**: 49-56
- Coito J.L, Rocheta M, Carvalho L, Amâncio S.** 2012. Microarray-based uncovering reference genes for quantitative real time PCR in grapevine under abiotic stress. *BMC Research Notes* **5**: 220
- Confraria A, Martinho C, Elias A, Rubio-Somoza I, Baena-González E.** 2013. miRNA mediate SnRK1-dependent energy signaling in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **4**: 197
- Cook N.C, Bellen A, Cronje P.J.R, De Wit I, Keulemans W, Van den Putte A, Steyn W.** 2005. Freezing temperature treatment induces bud dormancy in 'Granny Smith' apple shoots. *Scientia Horticulturae* **106**: 170-176
- Cooke J.E, Eriksson M.E, Junttila O.** 2012. The dynamic nature of bud dormancy in trees: environmental control and molecular mechanisms. *Plant Cell and Environment* **35**: 1707-1728
- Dennis F.G.** 2003. Problems in standardizing methods for evaluating the chilling requirements for the breaking of dormancy in buds of woody plants *HortScience* **38**: 347-350

- Dhar S, Johar K, Wong-Riley M.** 2013. Biogenomic transcriptional regulation of all thirteen cytochrome c oxidase subunit genes by specific protein 1. *Open Biology* **3**:120176
- Díaz-Riquelme J, Grimplet J, Martínez-Zapater J.M, Carmona M.J.** 2012. Transcriptome variation along bud development in grapevine (*Vitis vinifera* L). *BMC Plant Biology* **12**: 181-194
- Dietz K.J, Pfannschmidt T.** 2011. Novel regulators in photosynthetic redox control of plant metabolism and gene expression. *Plant Physiology* **155**: 1477-1485
- Ensminger I, Busch F, Huner N.P.A.** 2006. Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis. *Physiologia Plantarum* **126**: 28-44
- Fabbroni C.** 2009. Kiwifruit bud release from dormancy: effect of exogenous cytokinins. PhD tesis. Alma Mater Studiorum, Università di Bologna
- Fennell A, Hoover E.** 1991. Photoperiod influences growth, bud dormancy and cold acclimation of *V. labruscana* and *V. riparia*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **116**: 270-3
- Fernie A.R, Carrari F, Sweetlove L.J.** 2004. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 254-261
- Foyer C.H, Noctor G.** 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment* **28**: 1056-1071
- Ghillebert R, Swinnen E, Wen J, Vandesteene L, Ramon M, Norga K, Rolland F, Winderickx J.** 2011. The AMP/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation. *FEBS Journal* **278**: 3978-90
- González-Agüero M, García-Rojas M, Fonseca C, Ferreira R.B, Lourenço A.M, Monteiro S.** 2013. Identification of two putatives reference genes from grapevine suitable for gene expression analysis in berry and related tissues derived from RNA-Seq data. *BMC Genomics* **14**: 878
- Grant T.N.L, Gargrave J, Dami I.E.** 2013. Morphological, Physiological, and Biochemical changes in *Vitis* genotypes in response to photoperiod regimes. *American Journal of Enology and Viticulture* **64**: 466-75
- Halaly T, Pang X, Batikoff T, Crane O, Keren A, Venkateswari J, Ogrodovitch A, Sadka A, Lavee S, Or E.** 2008. Similar mechanisms might be triggered by alternative external stimuli that induce dormancy release in grape buds. *Planta* **228**: 79-88
- Hardie D.G.** 2007. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardian of cellular energy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**: 774-85
- Hansen J, Moller I.B.** 1975. Percolation of starch and soluble carbohydrates from plant tissue for quantitative determination with anthrone. *Analytical Biochemistry* **68**: 87-94

- He D, Mathiason K, Fennell A.** 2012. Auxin and cytokinin gene expression during active shoot growth and latent bud paradormancy in *Vitis riparia* grapevine. *Journal of Plant Physiology* **169**: 643-48
- Heide O.M, Prestrud A.K.** 2005. Low temperature, but not photoperiod, controls growth cessation and dormancy induction and release in apple and pear. *Tree Physiology* **25**: 109-114
- Hoffman D.E.** 2011. Changes in the transcriptome and metabolome during the initiation of growth cessation in hybrid aspens. PhD thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Umea
- Horvath D.P, Anderson J.V, Chao W.S, Foley M.E.** 2003. Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *TRENDS in Plant Science* **11**: 534-540
- Huang B, Hennen-Bierwagen T.A, Myers A.M.** 2014. Functions of Multiple Genes Encoding ADP-Glucose Pyrophosphorylase Subunits in Maize Endosperm, Embryo, and Leaf. *Plant Physiology* **164**: 596-611
- Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 2001. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **27**: 325-333
- Keller M.** 2015. *The Science of Grapevines. Anatomy and Physiology.* Second Edition. pp 5-6. Elsevier Inc, Amsterdam, Países Bajos
- Koussa T, Broquedis M, Bouard J.** 1994. Changes of abscisic acid level during the development of grape latent buds, particularly in the phase of dormancy break. *Vitis* **33**: 63-67
- Kruger N.J, von Schaewen A.** 2003. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organization. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 236-246
- Kühn N, Ormeño-Nuñez J, Jaque-Zamora G, Pérez F.J.** 2009. Photoperiod modifies the diurnal expression profile of VvPHYA and VvPHYB transcripts in field-grown grapevine leaves. *Journal of Plant Physiology* **166**: 1172-1180
- Kurimoto K, Day D.A, Lamberts H, Noguchi K.** 2004. Effect of respiratory homeostasis on plant growth in cultivars of wheat and rice. *Plant, Cell and Environment* **27**: 853-62
- Lang G.A.** 1987. Endo-, para-, and eco-dormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *Horticultural Science* **22**: 371-377
- Lefebvre V, North H, Frey A, Sotta B, Seo M, Okamoto M, Nambara E, Marion-Poll A.** 2006. Functional analysis of *Arabidopsis* *NCED6* and *NCED9* genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. *The Plant Journal* **45**: 309-19

- Leterrier M, Holappa L.D, Broglie K.E, Beckles D.M.** 2008. Cloning, characterization and comparative analysis of a starch synthase IV gene in wheat: functional and evolutionary implications. *BMC Plant Biology* **8**: 98
- Livak K.J, Schmittgen T.D.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $\Delta\Delta CT$ method. *Methods* **25**:402-8
- McKibbin R.S, Muttucumaru N, Paul M.J, Powers S.J, Burrell M.M, Coates S, Purcell P.C, Tiessen A, Geigenberger P, Halford N.G.** 2006. Production of high starch, low-glucose potatoes through over-expression of the metabolic regulator SnRK1. *Plant Biotechnology Journal* **4**: 409-18
- Mielke E.A, Dennis F.G.** 1978. Hormonal control of flower bud dormancy in sour cherry (*Prunus cerasus* L.). III. Effects of leaves, defoliation and temperature on levels of abscisic acid in flower primordia. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **103**: 446-449
- Monteiro F, Sebastiana M, Pais M.S, Figueiredo A.** 2013. Reference gene selection and validation for the early response to downey Mildew infection in susceptible and resistant *Vitis vinifera* cultivars. *PLoS ONE* **8**(9): e72998.
- Morrison J.C.** 1991. Bud development in *Vitis vinifera* L. *Botanical Gazette* **152**: 304-315
- Mullins M.G, Bouquet A, Williams L.E.** 1992. *Biology of the Grapevine*. Cambridge, Cambridge University Press
- Muñoz-Robredo P, Robledo P, Manríquez D, Molina R, Defilippi B.G.** 2014. Characterization of sugars and organic acids in commercial varieties of table grapes. *Chilean Journal of Agricultural Research* **71**: 452-458
- Noctor G, De Paepe R, Foyer C.H.** 2007. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *TRENDS in Plant Science* **12**: 125-134
- Noguchi K, Terashima I.** 1997. Different regulation of leaf respiration between *Spinacia oleracea*, a sun species, and *Alocasia odora*, a shade species. *Physiologia Plantarum* **101**: 1-7
- Noriega X, Burgos B, Pérez F.J.** 2007. Short-day photoperiod triggers and low temperature increase expression of peroxidase RNA transcripts and basic peroxidase isoenzyme activity in grape-buds. *Phytochemistry* **68**:1376-83
- Olsen J.E, Junttila O, Nilsen J, Eriksson M.E, Martinussen I, Olsson O, Sandberg G, Moritz T.** 1997. Ectopic expression of oat phytochrome A in hybrid aspen changes critical day length for growth and prevents cold acclimatization. *The Plant Journal* **12**: 1339-1350
- Or E, Vilozny I, Eyal Y, Ogradovitch A.** 2000. The transduction of the signal for grape bud dormancy breaking induced by hydrogen cyanamide may involve the SNF-like protein kinase GDBRPK. *Plant Molecular Biology* **43**: 483-494

- Pérez F.J, Meza P, Berti M, Pinto M.** 2000. Effect of carbon source and sucrose concentration on growth and hexose accumulation of grape berries cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **61**: 37-40
- Pérez F.J, Rubio S, Ormeño-Núñez J.** 2007. Is erratic bud-break in grapevines grown in warm winter areas related to disturbance in mitochondrial respiratory capacity and oxidative metabolism?. *Functional Plant Biology* **34**: 624-32
- Pérez F.J, Vergara R, Or E.** 2009. On the mechanism of dormancy release in grapevine buds: a comparative study between hydrogen cyanamide and sodium azide. *Plant Growth Regulation* **59**:145-52
- Qin X, Zeevaart J.A.D.** 2002. Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiology* **128**: 544-51
- Rinne P.L.H, Welling A, Vahala J, Ripel L, Ruolana R, Kangasjärvi J, van der Schoot C.** 2011. Chilling of dormant buds hyperinduces FLOWERING LOCUS T and recruits GA-inducible 1,3- β -Glucanases to reopen signal conduits and release dormancy in populus. *Plant Cell* **23**: 130-146
- Rodríguez A, Adamo M, Crozet P, Margalha L, Confraria A, Martinho C, Elías A, Rabissi A, Lumbreras V, González-Guzmán M, Antoni R, Rodríguez P.L, Baena-González E.** 2013. ABI1 and PP2CA phosphatase are negative regulators of SnF1-related protein kinase 1 signalling in Arabidopsis. *The Plant Cell* **25**: 3871-94
- Rohde A, Bhalerao R.P.** 2007. Plant dormancy in the perennial context. *Trends in Plant Science* **12**: 217-23
- Rozen S, Skaletsky H.** 2000. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* **132**: 365-86
- Rubio S, Donoso A, Pérez F.J.** 2014. The dormancy breaking stimuli "chilling, hipoxia and cyanamide exposure" up-regulate the expression of α -amylase genes in grapevine buds. *Journal of Plant Physiology* **171**: 373-81
- Ruttink T, Arend M, Morreel K, Storme V, Rombauts S, Fromm J, Bhalerao R.P, Boerjan W, Rohde A.** 2007. A molecular timetable for apical bud formation and dormancy induction in poplar. *The Plant Cell* **19**: 2370-2390
- Seeley S.D, Powell L.E.** 1981. Seasonal changes of free and hydrolysable abscisic acid in vegetative apple buds. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **106**: 405-409
- Schwartz S.H, Tan B.C, Gage D.A, Zeevaart J.A, McCarty D.R.** 1997. Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* **276**: 1872-1874
- Strommer J.** 2011. The plant ADH family. *The Plant Journal* **66**: 128-42
- Sweetlove L.J, Beard K.F.M, Nunes-Nesi A, Fernie A.R, Ratcliffe R.G.** 2010. Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *TRENDS in Plant Science* **15**: 462-470

- Tamura F, Tanabe K, Ikeda T.** 1993. Relationship between intensity of bud dormancy and level of ABA in Japanese pear 'Nijisseiki'. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **62**: 75-81
- Tesnière C.M, Verriès C.** 2000. Molecular cloning and expression of cDNAs encoding alcohol dehydrogenases from *Vitis vinifera* L. during berry development. *Plant Science* **157**: 77-88
- Thompson A.J, Jackson A.C, Symons R.C, Mulholland B.J, Dadswell A.R, Blake P.S, Burbidge A, Taylor I.B.** 2000. Ectopic expression of a tomato 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes over-production of abscisic acid. *The Plant Journal* **23**: 363-374
- Tiessen A, Prescha K, Branscheid A, Palacios N, McKibbin R, Halford N.G, Geigenberger P.** 2003. Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar signaling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *The Plant Journal* **35**: 490-500.
- Van der Schoot C, Rinne P.L.H.** 2011. Dormancy cycling at shoot apical meristem: Transitioning between self-organization and self-arrest. *Plant Science* **180**: 120-131
- Vergara R, Pérez F.J.** 2010. Similarities between natural and chemically induced bud endodormancy release in grapevine *Vitis vinifera* L. *Scientia Horticulturae* **125**:648-53
- Vergara R, Rubio S, Pérez F.J.** 2012a. Hypoxia and hydrogen cyanamide induce bud-break and up-regulate hypoxic responsive genes (HRG) and *VvFT* in grapevine buds. *Plant Molecular Biology* **79**:171-8
- Vergara R, Parada F, Rubio S, Pérez F.J.** 2012b. Hypoxia induces H₂O₂ production and activate antioxidant defence system in grapevine buds through mediation of H₂O₂ and ethylene. *Journal of Experimental Botany* **63**: 4123-31
- Wake C.M.F, Fennell A.** 2000. Morphological, physiological and dormancy response of three *Vitis* genotypes to short photoperiod. *Physiologia Plantarum* **109**: 203-210
- Zawaski C, Kadmiel M, Pickens J, Ma C, Strauss S, Busov V.** 2011. Repression of gibberellin biosynthesis or signaling produces striking alterations in poplar growth, morphology, and flowering. *Planta* **234**: 1285-1298
- Zeeman S.C, Kossmann J, Smith A.M.** 2010. Starch: its metabolism, evolution and biotechnological modification in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 209-34
- Zheng C, Halaly T, Kwame Acheampong A, Takebayashi Y, Jikumaru Y, Kamiya Y, Or E.** 2015. Abscisic acid (ABA) regulates grape bud dormancy, and dormancy release stimuli may act through modification of ABA metabolism. *Journal of Experimental Botany* **66**: 1527-42