

UCh-FC
Biotecnología
N 841
2008

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**Estudio sobre la expresión de transcritos de Peroxidasas
durante el proceso de aclimatación invernal de las yemas de vid
(*Vitis vinifera* L) cv. Thompson Seedless**

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular



Por

Ximena Alejandra Noriega Guerrero

Enero, 2008
Santiago-Chile

Director de Memoria de Título: Dr Francisco Pérez Correa



**“ESTUDIO SOBRE LA EXPRESIÓN DE TRANSCRITOS DE
PEROXIDASAS DURANTE EL PROCESO DE ACLIMATACIÓN
INVERNAL DE LAS YEMAS DE VID (*Vitis Vinífera* L) cv.
Thompson seedless”**

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

XIMENA ALEJANDRA NORIEGA GUERRERO

A large, stylized handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.



DR. FRANCISCO PÉREZ CORREA
Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación Seminario de Título

DRA. LILIANA CARDEMIL OLIVA
Presidente Comisión

A handwritten signature in blue ink, written over a horizontal line.

DRA. CLAUDIA STANGE
Corrector

A handwritten signature in blue ink, written over a horizontal line.

Santiago de Chile, Enero del 2008



Nací el 4 de Agosto del '78 poco tiempo después de mí llegaría el quinto integrante familiar para conformar el sólido equipo de mis más antiguos amores y formadores. La enseñanza escolar la inicié en el Kinder del colegio municipal "Víctor Jara" para seguir en el entonces mejor colegio de la comuna "Escuela básica N° 77, Presidente. José Joaquín Prieto", donde me encontré con un número no menor de personas entre profesores y compañeros que se empeñaron constantemente en apoyar mis pasos... continúe la enseñanza media en un colegio, que como el anterior pertenece a la Sociedad de Instrucción Primaria (S.I.P) para seguir sumando buenos compañeros y experiencias. A la universidad ingresé luego de una medianamente buena P.A.A, con más ganas de aprovechar la oportunidad, hasta entonces escasa en la historia familiar, que con claridad vocacional, es así como me incorporé al programa de Bachillerato y desde ahí comencé a vivir una sucesión de vertiginosos acontecimientos, todos multiplicados en mi traspaso a ciencias, desde caída de ciertos prejuicios, el cuestionamiento de mis perspectivas, etc. pero hasta ahora con una visión más integradora y receptiva de nuevas ideas y posibilidades respecto del hacer, crear y construir, todo consecuencia del encuentro con nueva gente, amigos, experiencias personales y la enorme cantidad de información reportada en estos años de enseñanza, sin abandonar en ningún momento la raíz y origen aportado por mi familia, amor, respeto.

Dedicado

A mis abuelos y padres, en ellos partió la vida para mí y desde ellos también se expande

Musical y a todo color.





AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mi amada familia, mis padres Silvia y José, cuyo incondicional amor y esfuerzo siempre a buscado desvanecer todas las limitaciones que pudiesen haber para aprender y crecer, a mis hermanos Gloria y Andrés, por compartir esta vida en familia, por el complemento y el manos ofrecidas. También doy sentidas gracias a mi familia completa, abuelos, tíos, primos, por la constante buenas intenciones y apoyo.

Agradezco con gran cariño a mi profesor Dr. Francisco Pérez por la excelente enseñanza académica, pero también por la paciencia, tolerancia y dedicación, mucho más de lo que en un inicio pensé que podía llegar a ser.

A mis amigos amados, hermanos de la vida, por el buen humor, por la fuerza y apoyo constante, la ayuda en el arme y desarme de proyectos y sueños, un oasis en tiempos difíciles y de celebraciones, compañeros de lagrimas de tristeza y de alegrías.

A mis compañeros Biotec generación del '99, por años de complicidad académica que aunque a unos se nos hizo más difícil que a otros, tenemos una parte de nuestras historias que es común llena de dificultades pero con saldo positivo.

Agradezco también porque están en mi corazón y por el regalo de seguir compartiendo en la vida

INDICE DE CONTENIDO

	pág
INDICE.	
INDICE DE TABLAS O CUADROS.....	v
INDICE DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3-11
Yemas de frutales caducifolios.....	3
Receso invernal de yemas en frutales caducifolios.....	4
Dormancia de yemas.....	5
Aclimatación al frío de yemas.....	6
Vías de señalización de dormancia y aclimatación al frío.	7
Posible rol de las Prx en los mecanismos involucrados en el receso invernal.....	9
de yemas de <i>V. vinífera</i> cv Thompson Seedless	
Hipótesis.....	12
Objetivo General.....	12
Objetivos Específicos.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
Material Vegetal.....	13
Extracción y purificación de RNA.....	13
Diseño de partidores y RT- PCR.....	14
Análisis de secuenciación.....	16
Isoelectroenfoque de peroxidasas.....	16
RESULTADOS:.....	17
Extracción y Purificación de RNA de yemas de <i>Vitis</i> cv. Thompson Seedless.....	17
Diseño de partidores específicos de Prx clase III de <i>V. vinífera</i> L.....	18
Amplificación por RT-PCR de los transcritos de Prx.....	21
Análisis de secuencia del fragmento de yemas amplificado por PCR.....	22
Actividad de isoenzimas de Prx en tejidos de yema y raíz de <i>V. vinífera</i>	23
cv Thompson seedless	
DISCUSIÓN.....	25
Extracción de RNA de tejido de yemas.....	25
Análisis de la base de datos EST "genomic facility".....	26
Expresión de transcritos de Prx en tejidos de yema y raíz.....	27
Isoformas de Prx en tejidos de yema y raíz.....	28
Comparación de zimograma y transcritos de Prx en yemas de <i>V. vinífera</i>	28
cv Thompson Seedless	
Perspectivas de análisis de Prx CB-yema.....	29
CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32



INDICE DE TABLAS O CUADROS

	Nº Página
Tabla 1.....	18
Tabla 2.....	19



INDICE DE FIGURAS

	Nº Página
Figura 1.....	17
Figura 2.....	20
Figura 3.....	21
Figura 4.....	22-23
Figura 5.....	24



LISTA DE ABREVIATURAS

ABA Acido Abscícico

bp Pares de base

cv. cultivar

°C grados Celsius

DEPC dietil pirocarbonato

ECD Ecodormancia

ED Endodormancia

EST Marcador de secuencia expresada (Expressed Sequences Tags)

EtOH Etanol

GA Giberelinas

IEF isoelectro enfoque

INIA Instituto de Investigaciones Agropecuarias

KDa Kilo Dalton

mM milimolar

NCBI Centro Nacional para la Información Biotecnológica (The National Center for Biotechnology Information)

PD Paradormancia

PM Peso molecular

Prx Peroxidasa

QTL Loci de efecto cuantitativo (Quantitative trait loci)

RNA Acido Ribonucleico

RT-PCR Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa

RESUMEN

En *V. vinífera* cambios en el polimorfismo de peroxidasas clase III (Prx) han sido relacionados con las transiciones que sufre la yema al pasar del estado de endo al de ecodormancia (Pérez y Burgos 2004). En este trabajo se analizó la expresión de transcritos de Prx en tejidos de yema y raíz de *Vitis* cv Thompson seedless y se comparó con el perfil de isoenzimas de Prx en ambos tejidos. De la base de datos generada por la Universidad de California, en la cual se han agrupado todos los EST de *Vitis*, es posible extraer secuencias EST asignadas a genes específicos de *Vitis vinífera*. En la base de datos se encontraron seis EST asignados a Peroxidasa clase III (Prx) de los cuales solo tres correspondían a *Vitis vinífera* (CTG1035712, AY348574 y CB923206). Estas secuencias de EST de Prx de *Vitis vinífera* fueron utilizadas para el diseño de partidores y el posterior estudio de la expresión de los respectivos transcritos mediante RT-PCR en tejidos de yema y raíz. En yema sólo se observó la expresión de un solo transcrito correspondiente al EST CB923206 mientras que en raíz se observó la expresión de los tres transcritos de Prx. Sin embargo, el análisis del patrón de isoformas de Prx en un IEF reveló la presencia de tres isoformas en ambos tejidos, dos básicas presente en ambos tejidos, una isoforma ácida en yema y una isoforma neutra en raíz. El transcrito expresado en yemas se secuenció y la secuencia mostró un 99,7% de homología con la secuencia reportada en la base de datos (CB923206). El análisis Blastx mostró un 80% de homología con una Prx clase III de *G. hirsutum* CAE 4309 indicando que el transcrito corresponde efectivamente a una Prx clase III. En yemas los resultados mostraron una falta de correspondencia entre el número de transcritos de Prx y el número de isoformas de Prx expresados, mientras que en raíz, el número de transcritos expresados correspondió con el número de isoformas detectadas.

ABSTRACT

In *V. vinifera* changes in the polymorphism of class III peroxidase (Prx) have been related with endo/ecodormancy phase transition in buds of grapevines (Pérez y Burgos 2004). In this work was analyzed the expression of transcripts of Prx in root and bud tissues of *Vitis* cv Thompson seedless and was compared with the profile of isoenzymes of Prx in both tissues

From *Vitis* EST database generated by the University of California we extract select EST sequences assigned to Class III peroxidase (Prx) genes. Six EST assigned to Class III peroxidase (Prx) were found in the database, but only three of these ESTs corresponded to *Vitis vinifera* (CTG1035712, AY348574 and CB923206). The Prx EST sequences of *Vitis vinifera* were used to design specific primers to study subsequently the expression of the respective transcripts by means of RT-PCR in bud and root tissues. In bud, the expression of a single transcript corresponding to EST CB923206 was found, while in root, the three Prx ESTs transcripts expressed. However, the analysis of Prx isoforms by IEF revealed the presence of three isoforms in both tissues. Two basic isoforms present in both tissues and acid isoform present in bud and a neutral isoform present in root. The transcript expressed in buds was sequenced and the sequence showed a 99.7% homology with the (CB923206) sequence reported in the database. Blastx analysis of the same transcript showed 80% of homology with a Class III Prx of *G. hirsutum* CAE 4309 indicating that the transcript correspond to a Class III Prx. In buds, a lack of correspondence between the number of Prx transcripts expressed and the number of Prx isoforms detected was found, whereas in root, the number of expressed transcripts corresponded with the number of detected isoforms.

INTRODUCCION

Yemas de frutales caducifolios

La continuidad del ciclo de crecimiento en frutales caducifolios se ve interrumpida frente a la llegada de condiciones ambientales adversas durante las estaciones de otoño e invierno dando paso a un periodo de receso invernal donde la única estructura foliar que prevalece es la yema. La yema de plantas leñosas caducifolias corresponde a una estructura que concentra y resguarda un importante grupo de células meristemáticas que tienen la capacidad potencial de reanudar y continuar el desarrollo de la planta durante el ciclo de crecimiento.

En plantas de *V. vinifera* L al igual que en la mayoría de las plantas leñosas caducifolias el ciclo de vida anual incluye un ciclo de crecimiento y desarrollo y un ciclo de receso o ausencia de crecimiento. En el hemisferio sur el ciclo de crecimiento tanto vegetativo como reproductivo transcurre desde comienzos de la primavera (Septiembre) hasta inicios del otoño del siguiente año (mediados de Abril) cuando es interrumpido por las condiciones ambientales dando paso al período de receso invernal. En *Vitis* el inicio del ciclo de crecimiento está marcado por la brotación de las yemas latentes. Las yemas pueden ser consideradas como puntos de crecimiento que se desarrollan en la axila de la hoja, en *Vitis* se encuentran dos tipos de yemas asociadas a la hoja, la yema lateral y la yema latente o dormante. La yema lateral crece durante la misma estación en que surge, pero su crecimiento se detiene con el surgimiento de la bractea basal que dará origen a la yema latente. La yema latente es una yema compuesta situada en la axila de una hoja modificada, y está conformada por una yema principal o primaria (la más desarrollada y brote principal) y dos yemas más pequeñas o secundarias (menos desarrolladas y que solo brotan en caso de daño

de la yema principal), todo el conjunto está recubierto externamente por una serie de capas protectoras o escamas (Morrison J.C, 1991). Internamente cada yema se compone de tejido meristemático y primordios indiferenciados, avanzado el verano y en respuesta a señales internas y/o factores ambientales ocurren una serie de transformaciones que incluyen diferenciación de los primordios en hojas, zarcillos, o inflorescencias (especialmente en la yema primaria) (Srinivasan y Mullins, 1980, 1981), también ocurren cambios bioquímicos en particular movilización y almacenamiento de productos de reserva (Williams, 1996) y cambios en la composición de la pared celular con un aumento en el contenido de lignina. Visualmente la yema pasa de ser un tejido blando y verdoso en la temporada estival a una estructura endurecida recubierta de una corteza o cutícula hacia fines del verano y durante toda la temporada invernal. En esa nueva condición se adapta a las condiciones invernales protegiendo y asegurando el desarrollo de las nuevas estructuras en la siguiente primavera.

Receso invernal de yemas en frutales caducifolios

El estado de receso invernal desencadenado hacia la entrada del otoño en yemas de frutales caducifolios es un proceso adaptativo que les permite a las yemas sobrevivir durante las duras condiciones del invierno. La adaptación incluye tanto el desarrollo de la (a) Dormancia y el de (b) Aclimatación al frío. La función adaptativa de estos mecanismos parece ser diferente ya que mientras la dormancia previene la brotación temprana y prematura de la yema frente a un evento climático favorable al crecimiento durante el invierno, lo cual podría ser catastrófico para su sobrevivencia; la aclimatación al frío impedirá el congelamiento del meristema de la yema y su subsecuente muerte.

(a) Dormancia de yemas

Se define como un estado en el que el crecimiento visible es temporalmente suspendido (Samish 1954) o más precisamente como un estado en el que la actividad meristemática se detiene (Rohde A y Bhalerao R.P, 2007). La dormancia de yemas desde un punto de vista fisiológico ha sido dividida en tres etapas bien características (Lang y col. 1987): Estado de Paradormancia PD (inhibición correlativa o dormancia de verano) en que la inhibición del crecimiento estaría controlado por factores hormonales externos a la yema como la dominancia apical (Rohde y col, 1997); el estado de Endodormancia, ED (receso o dormancia invernal) en que la inhibición del crecimiento estaría controlado por factores endógeno de la yema, se ha postulado que para salir de este estado sería esencial la acumulación de cierta cantidad de horas de frío (Saure, 1985), y finalmente, el estado de Ecodormancia, ECD (quiescencia o dormancia impuesta) donde nuevamente la yema es sensible a las condiciones ambientales, un estado de transición a la espera de condiciones favorables para la brotación.

Durante el período invernal las yemas se encuentran en el estado de endodormancia, en algunas especies de *Vitis* el estado de endodormancia (ED) es inducido por fotoperíodo corto y en otras especies por fotoperíodo corto y bajas temperaturas (Wake y Fennell, 2000; Schnabel y Wample, 1987). En el estado de ED la división celular se encuentra detenida, la tasa respiratoria y el metabolismo es bajo, sin embargo, existe una actividad bioquímica importante en el tejido de la yema.

Rinne y Van der Schoot (1998) propusieron un modelo que explica la entrada y salida de la ED en Abedules (*Betula pubescens Ehrh*). El modelo se basa en la inducción por efecto de fotoperíodo de día corto de verdaderos tapones de 1,3-β-D-glucanos que bloquearían los plasmodesmos (vía de comunicación simplástica entre las células). Este bloqueo produciría una desconexión entre las células y cese del crecimiento. El

tejido meristemático de la yema se liberaría de esta situación una vez que se acumula una cierta cantidad de frío que activaría la enzima 1,3-β -D-glucanasa, reestableciendo de este modo la comunicación simplástica

(b) Aclimatación al frío de yemas

El aumento de la tolerancia al congelamiento en plantas leñosas caducifolias que se da tras la exposición a temperaturas bajas no congelantes es conocido como "aclimatación al frío" (Thomashow, 1999). En plantas leñosas se ha descrito que la aclimatación al frío, tal como ocurre en el caso de la dormancia, es un proceso en varias etapas, la primera de ellas es de "aclimatación al Frío" donde fotoperíodos de días cortos y leve descenso de la temperatura son las señales inductoras, luego cuando las temperaturas mínimas alcanzan entre 4 y 7 ° C se entra al estado de "resistencia al frío", y cuando las temperaturas descienden de los 0 ° C se alcanza el estado de "máxima resistencia" en el cual las yemas de algunas plantas pueden soportar temperaturas hasta de -40 °C. (Thomashow, 1999). A diferencia de la Dormancia la aclimatación al frío es un fenómeno dinámico que está en directa relación con las condiciones de temperatura imperantes, es así como se pueden encontrar diferencias en el desarrollo temporal dentro de una misma especie o variedad.

Ambos mecanismos de aclimatación se desarrollan en zonas de clima templado donde las condiciones de fotoperíodo de día corto y baja temperatura, señales que inducen y controlan el receso invernal, coinciden estacionalmente. En consecuencia, dada la simultaneidad de las señales ambientales en la mayor parte de las zonas templadas, los procesos de dormancia y aclimatación al frío se superponen. Esto plantea una dificultad para diferenciarlos fisiológicamente, en especial desde el punto de vista de

los procesos celulares y moleculares, de la expresión y regulación de genes, y de los mecanismos de señalización implicados. Sin embargo, recientemente se ha demostrado en *Populus tremula* L que tratamientos de días largos con bajas temperaturas nocturnas y adición de paclobutrazol, un inhibidor de la biosíntesis de giberelinas (GAs), provocan inducción de la resistencia al frío sin provocar inducción de dormancia, sugiriendo que el desarrollo de la aclimatación al frío y la ED podrían tener vías de señalización distintas (Molmann y col, 2005).

En el caso de *V. vinifera* tanto la dormancia como la aclimatación al frío son procesos graduales que se activan por fotoperíodo de día corto y bajas temperaturas. La inducción diferencial de la dormancia y la aclimatación al frío fue probada por primera vez de manera exitosa por Fennell y Hoover (1991) en *Vitis labruscana*, donde se comprobó que la señal de fotoperíodo de día corto solo induce el estado de ED y no de aclimatación al frío, sin embargo, esta inducción diferencial de la ED y la aclimatación al frío no ha sido demostrada en otras especies de *Vitis* (Salzman y col, 1996).

Vías de señalización de dormancia y aclimatación al frío

En el inicio, mantención y liberación del receso invernal intervienen señales ambientales como luz y temperatura. Se sabe que la luz es percibida por los fitocromos (Howe y col 1996), mientras que para la percepción de la temperatura, aunque no se ha reconocido un sensor específico, se ha descrito una cierta relación entre la percepción del frío y los canales de Ca^{+2} (Sung y col, 2003). Estos estímulos luz y temperatura, desencadenan en la yema una serie de cambios como por ejemplo a nivel hormonal, a nivel de expresión de genes y de proteínas.

Las hormonas ejercerían su acción como intermediarios entre la percepción de la señal ambiental y la respuesta fisiológica del tejido. Las hormonas involucradas en la ED y la

aclimatación al frío serían las giberelinas (GA) y el ácido abscísico (ABA). Se ha informado que la biosíntesis de GA es sensible al fotoperíodo, incrementando bajo condiciones de día largo (Jackson y Thomas, 1997). Se ha postulado además que la señal de fotoperíodo de día corto bloquearía algún paso en la síntesis de GA1 (Olsen y col 1997) promoviendo el cese del crecimiento (Hansen y col, 1999). Por su parte ABA sería un potente promotor del cese del crecimiento y dormancia, se ha observado que el contenido de ABA aumenta durante la dormancia y que su incremento en la yema potenciaría la aclimatación al frío en plantas leñosas (Li y col, 2002; 2003). ABA es muy sensible a las condiciones de estrés abiótico como baja temperatura y deshidratación (Zeevaart y Creelman, 1988), y regula la expresión de una importante cantidad de genes que codifican proteínas relacionadas con estrés: canales de agua, dehidrinas, chaperoninas, enzimas que participan en la biosíntesis de componentes de pared celular, enzimas detoxificantes, etc (Rock, 2000). Estos genes tendrían en la región del promotor secuencias conservadas de respuesta para ABA (Leung y Giraudat, 1998, Finkelstein y col, 2002) y/o también un elemento de secuencia de respuesta a deshidratación (DRE) y/o elemento de secuencia en respuesta a baja temperatura (LTRE) (Narusaka y col, 1993).

Entre las proteínas que se expresan durante el receso invernal de las yemas de frutales caducifolios se encuentran las dehidrinas (DHN), familia de proteínas que protegen de la deshidratación (Arora y col. 1996; Sarnighausen E y col, 2002), proteínas de almacenamiento BSP (participan del reciclaje de Nitrógeno) (Arora, 1992) y enzimas como catalasa, superóxido dismutasa (SOD), peroxidasas. Sin embargo, no ha sido posible establecer qué proteínas se relacionan con cada uno de los procesos de aclimatación, como por ejemplo proteínas que se expresen solo por efecto de la aclimatación al frío o solo por efecto de la ED.

En cuanto al análisis genético se ha estudiado la expresión de genes relacionados con cambios en la membrana plasmática (Gévaudant y col, 2001), expresión de genes del ciclo celular particularmente en el proceso de dormancia (Rohde, 1997), y expresión de genes del metabolismo (vía de la Pentosas Fosfato y vía glicolítica) por efecto de la salida de la Dormancia, bajas temperaturas, calor, y tratamientos químicos (Rowland y Arora, 1997). También se han utilizado estrategias basadas en la genética molecular para estudiar los genes involucrados en las vías de señalización de ambos fenómenos de aclimatación. La búsqueda de marcadores moleculares a través del análisis de QTLs (Quantitative trait loci), relacionados con la tolerancia al frío y con la dormancia ha sido iniciada por diversos autores pero aún sin llegar a resultados positivos. (Rowland y col, 2003; Svendsen 2003), principalmente debido al carácter multigenético de ambos fenómenos (Thomashow, 1990), además de dificultades en el manejo experimental en relación a la ploídía de la especie y al tiempo que toma el obtener una nueva generación de plantas

Posible rol de las Prx en los mecanismos involucrados en el receso invernal de yemas de *V. vinifera* cv Thompson Seedless

Las Prx de vid son miembros del grupo de Prx clase III, su peso PM está entre los 35-45 KDa dependiendo de su grado de glicosilación y grupo prostético (Jackson et al, 2001). La particularidad de estas Prx clase III es que son de naturaleza glicoproteica y se localizan en la vacuola y la pared celular, tienen alta estabilidad térmica y un rango de sustratos muy amplio (Robinson et al. 1989). Además de esta diversidad de sustratos, las Prx de vid han revelado tener una alta diversificación en cuanto al tipo de tejido en el que se localizan (rayos vasculares periféricos, exterior a la capas celular) en cuanto a los órganos en que se distribuyen (hojas, tallos bayas, yemas, raíces, etc)

y en cuanto a su localización subcelular (vacuola o pared). Las Prx han sido relacionadas con una diversidad de funciones como la construcción de la pared celular, el recambio de metabolitos fenólicos de la vacuola, oxidación de reductantes tóxicos, catabolismo de auxina y en la respuesta de defensa a daño mecánico o provocado por ataque de insectos o patógenos. Además se ha informado que participan en la lignificación del pedicelo y que su expresión en este tejido esta regulada por ácido giberelico (Pérez y Gómez 1998; Pérez y Morales, 1999).

En un estudio realizado en yemas de vid se observó un aumento en la actividad Prx con el progreso de la dormancia, con un máximo de actividad justo antes de la brotación. Por otra parte, al analizar el perfil de expresión de Prx en un isoelectroenfoco (IEF), se obtuvo un patrón de expresión de polimorfismo, específicamente se observaron tres isoformas las que se expresaron durante todo el ciclo de dormancia. Sin embargo, las isoformas básicas disminuyeron su nivel de expresión de manera gradual, desapareciendo totalmente del extracto de yemas dos semanas antes del inicio de la brotación de las yemas (Pérez y Burgos, 2004). Estos resultados sugieren que el cambio en el patrón de expresión de las isoformas de Prx durante el período de ED podría ser indicativo del término de la ED y el inicio de la ecodormancia

De la base de datos de EST de *Vitis* generada por la Universidad de California "genomic facilities" (<http://cgf.ucdavis.edu>) (Goes da Silva y col, 2005), es posible obtener a lo menos tres secuencias de EST correspondientes a Prx clase III de *V. vinifera*. Utilizando estas secuencias se diseñaron partidores específicos, con dichos partidores y mediante técnicas de RT-PCR se estudió la expresión de transcritos de Prx en tejidos de yema y raíz de vid y se comparó con la expresión de isoformas de Prx

y finalmente se secuenció el fragmento amplificado en tejido de yema para confirmar su identidad.

HIPOTESIS

Cambios en el patrón de isoformas de Prx y presencia de transcritos de Prx en yemas de *V. vinífera* cv Thompson seedless estarían relacionados con el término de la endodormancia (ED)

OBJETIVOS

Objetivo General:

Relacionar la expresión de transcritos de Prx con el patrón de expresión de isoformas de Prx en yemas de *Vitis vinífera* L cv Thompson seedless durante el periodo de ED.

Objetivos Específicos:

- 1) Obtención de RNA de tejido de yema óptimo para análisis transcripcionales.
- 2) Evaluación y obtención de transcritos de Prx clase III de *Vitis vinífera* L. en yemas en estado ED.
- 3) Determinación de isoformas de Prx a partir de yemas en estado ED en plantas de *Vitis* cv Thompson seedles.
- 4) Comparación (o correlación) de los tipos de transcritos de Prx con el número y tipo de isoformas de Prx durante ED.

MATERIALES Y METODOS

Material Vegetal

Se tomaron muestras de yemas de *Vitis vinifera* cv. Thompson seedless de 8 años de edad, desde el centro regional de investigación del Instituto Nacional de Investigación Agropecuarias (INIA, La Platina) ubicado en la ciudad de Santiago. Las raíces y hojas se extrajeron de aquellas yemas que fueron puestas a crecer bajo condiciones forzadas en cámara de crecimiento (16 hr de luz; 8 hr en oscuridad) a 23 °C colectadas después de 15 y 30 días.

Extracción y Purificación de RNA

El RNA total fue aislado de yemas, raíces y hojas de *V. vinifera* cv. Thompson Seedless (0,5-0,7g de peso fresco) utilizando para ello un protocolo que incluye ciertas modificaciones al método descrito por Chang y col (1993).

Las muestras fueron molidas con N₂ líquido y luego se homogeneizaron en buffer CTAB (CTAB 2%, Tris-HCl 25mM, EDTA 25 mM, NaCl 2 mM, y PVP 5%), agregando además 2% de β - mercaptoetanol, la mezcla fue agitada para luego incubar a 65 °C en baño termostático durante 30 min y luego se filtró pasando la muestra por lana de vidrio centrifugando a 400g x 10 min a 4 °C. La muestra se sometió a dos extracciones con 1 volumen de CHCl₃: alcohol isoamílico (24:1 v/v) centrifugado a 3000g x 20 min a 4 °C entre cada extracción. El RNA contenido en la fase acuosa fue precipitado durante toda la noche a -20 °C con 2.5 volúmenes de EtOH absoluto. Al día siguiente el RNA fue recuperado por centrifugación a 3000g x 20 min a 4 °C, El precipitado fue lavado con 500 μL de EtOH al 70% y centrifugado nuevamente a

3000g por 5 min a 4 °C para asegurar que no quedaran restos de etanol, la muestra de RNA fue mantenida durante 5 min a temperatura ambiente y luego se resuspendió el precipitado en H₂O DEPC. Una vez que el precipitado esta completamente resuspendido, la muestra es tratada con DNAsa (5 U de DNAsa cada 10 µg de RNA) incubando en baño termorregulado a 36 °C durante 30 min.

La purificación de RNA fue realizada agregando a la muestra 15 µl Silica y 1 volumen de NaI 6 M. esta mezcla se incubo durante 10 min a temperatura ambiente mezclando por inversión cada 2 min, tras esto el sobrenadante fue eliminado por centrifugación (1min a 14000rpm). La silica fue lavada tres veces con 500 µl de buffer de lavado (Tris-HCl 10mM, NaCl 50 mM, EDTA 2.5 mM, y EtOH 50% v/v, pH 7,5) eliminando el sobrenadante luego de cada centrifugación a 14000 rpm por 1 min. La muestra se mantuvo a temperatura ambiente para eliminar los restos de etanol y el precipitado fue resuspendido en H₂O DEPC. Mediante centrifugación durante 5 min a 14000 rpm, se recuperó la solución acuosa donde estaba resuspendido el RNA. (Boyle y col, 1995)

El RNA extraído y purificado fue revisado en una electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer MOPS 1X con tinción con bromuro de Etidio y corrido a 50Volt. La cantidad mínima requerida de RNA para visualizar en el gel es de 1.5µg.

Diseño de partidores y RT- PCR

Se diseñaron partidores específicos para genes de Prx clase III de *V. vinifera* a partir de secuencias extraídas de la base de datos de EST de la Universidad de California: "genomic facilities" (<http://cgf.ucdavis.edu>). En esta base de datos hay registradas a la fecha 6 secuencias EST que corresponden a Prx del género *Vitis*, pero solo tres de estos ESTs corresponden a *Vitis vinifera*. De los tres ESTs de Prx de *V. vinifera* uno de

ellos corresponde a un contig (CTG 1035712) mientras que los otros dos son singletons (AY 348574) y (CB923206), en base a cada una de estas secuencias se realizó el diseño de partidores específicos usando para ello el programa primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (Rozen y Skaletsky, 2000). Los partidores generados se detallan en la tabla 2.

La reacción de RT- PCR se realizó empleando el kit SuperScript™ One-Step RT-PCR System con Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA), en un termociclador MJ research (PTC-150). Las síntesis de cDNA se realizó a 50° C durante 30 min y un paso de 2 min a 94° C. La reacción de PCR se realizó por 35 ciclos de amplificación que consistieron en los siguientes pasos: denaturación 94 °C por 30 seg, apareamiento 55 °C por 30 seg, extensión 72 °C por 45 seg y la extensión final fue de 10 min a 72 °C. La mezcla de la reacción contiene 1 µg de RNA total como templado 0, 2 µM de cada primer, 25 µl de Mix 2X (0.4 mM de cada dNTP, y 2.4 mM MgSO₄) y 1µl de RT Platinum Taq mix, el volumen total de la reacción fue completada con H₂O DEPC hasta un volumen final de 50 µl.

Los fragmentos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, en buffer TAE 1% (0.038 M Tris, 1 mM EDTA, 1.1% (v/v) glacial AcOH) a 50 Volt, y visualizados por tinción con bromuro de Etidio.

Como control positivo de la actividad transcriptasa y polimerasa, en cada ensayo de RT- PCR se chequeó la amplificación de un fragmento de actina de *V. vinifera* (# accesión NCBI AY680701), el que se expresa constitutivamente en todos los tejidos de *Vitis*, los partidores para el control actina son los siguientes:

pACTf 5'- ATG TGC CTG CCA TGT ATG TTG CC – 3'

pACTr 5' – AGC TGC TCT TTG CAG TTT CCA GC – 3'

Para los partidores sentido y antisentido respectivamente. Los que amplifican un fragmento de unos 300 bp en yema.

Análisis de secuenciación

El fragmento de PCR obtenido a partir de los partidores correspondientes al EST de Prx CB923206 fue secuenciado directamente después de la purificación del fragmento de un gel de agarosa 1.5% en buffer TAE 1X, con el mismo procedimiento utilizado en la purificación del RNA de yema. La reacción de secuenciación fue realizada con 2µl de DYENAMIC ET Terminator cycle kit (Amersham Bioscience) y 5 pmol de partidor para un volumen total de 10 µl.

El fragmento secuenciado fue separado y analizado en un secuenciador de cuatro capilares ABIPRISM 3100-Avant genetic analyzer (Applied Biosystems).

Isoelectroenfoque de peroxidasas

Isoelectroenfoque (IEF) fue realizado usando un gel con 5% polyacrilamida y 2% de anfolitos (Bio-Lyte 3/10; Bio-Rad, USA). Las muestras fueron corridas en una cámara Bio-Rad 111 mini-IEF de acuerdo a las especificaciones de manufactura. La misma cantidad (4 mg) de peso fresco, equivalentes a 10 µl de extracto de muestra, fue eluída en el gel. La actividad peroxidasa fue desarrollada incubando el gel en 10 mM de buffer citrato pH 4.5 compuesto de 5 mM 4-methoxy-1-naftol y 1 mM H₂O₂ (Pérez y Burgos, 2004).

RESULTADOS

Extracción y Purificación de RNA de yemas de *V. vinífera* cv Thompson Seedless

El RNA de tejidos de yema de vid se extrajo mediante una modificación del método de Chang (1993). Sin embargo, para la obtención de RNA de buena calidad fue necesaria una posterior purificación con silica (Boyle y col, 1995). La Figura 1a muestra la extracción de RNA de yemas no purificado (Carril 2) y purificado (carril 3). La extracción de RNA desde otros tejidos de vid como hojas y raíz no presentó problemas y no fue necesaria la etapa de purificación (Fig. 1b y 1c), en general el RNA obtenido de estos tejidos de hoja y raíz alcanzaron mayor pureza y rendimiento lo que se registra de los datos de Absorbancia a 230, 260 y 280 nm, y de la razón $A_{260/230}$, y $A_{260/280}$ (Tabla1)

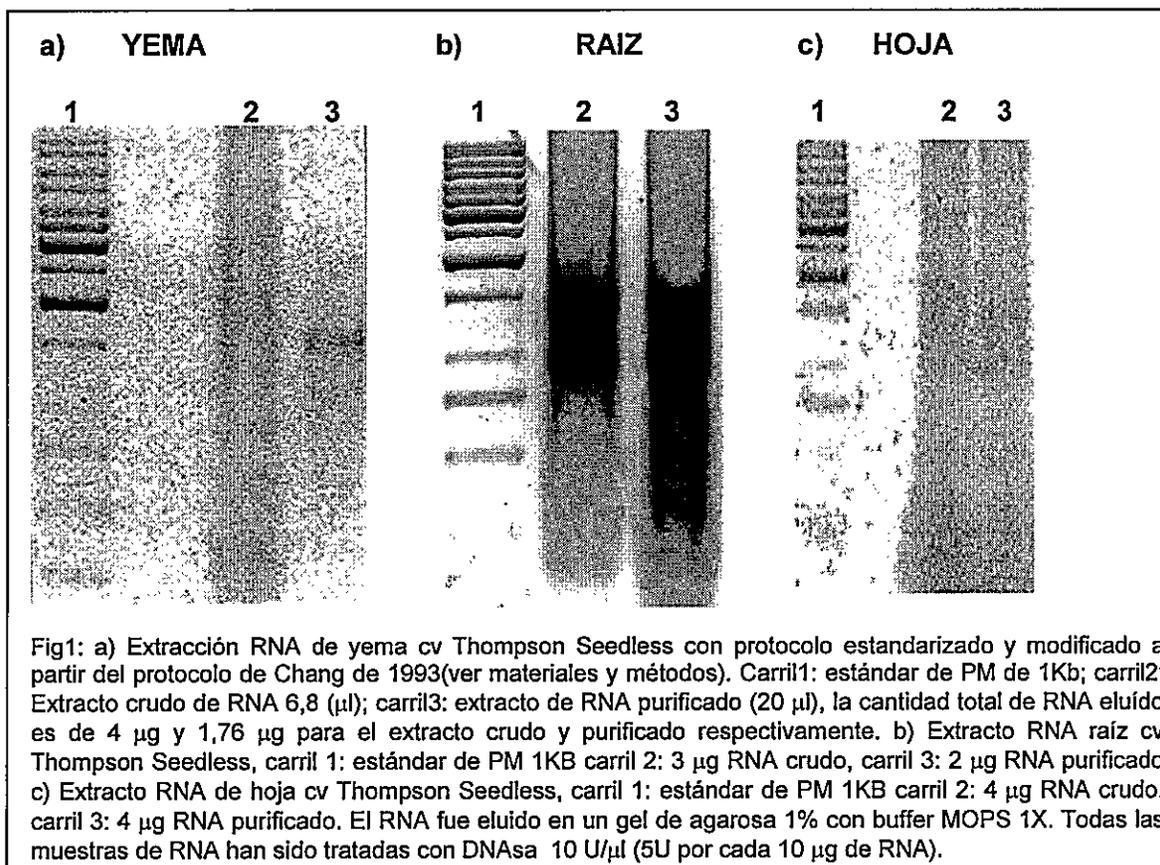


Tabla 1: Rendimiento y calidad del extracto crudo de RNA total de yema, raíz y hoja de *V. vinifera* cv Thompson Seedless (cantidad inicial de tejido es de 1g en yema y Raíz, y 0,5 g en hoja)

Parámetros que definen calidad del RNA			
Tejido (<i>V. vinifera</i> cv Thompson seedless)	A _{260/280}	A _{260/230}	Rendimiento (µg / g PF)
Yema	1.94	1.48	64.19
Raíz	1.69	1.97	281.91
Hoja	2.3	1.89	145.6

Diseño de partidores específicos de Prx clase III de *V. vinifera* L.

En la base de datos de EST de vitis, del genomic facilities de la Universidad de California (<http://cgf.ucdavis.edu/home/>), se realizó la búsqueda de "class III peroxidase" lo que dio como resultado 6 secuencias EST del género *Vitis* pero solo tres de ellas corresponden a la especie *Vitis vinifera*, que son en este caso las de interés. Los tres EST son nombradas como: CTG1035712, AY348574 y CB923206, donde CTG1035712 es una secuencia contig de 689 bp, mientras que AY348574 y CB923206 son secuencias singleton de 932 y 592 bp respectivamente. Para cada una de estas secuencias se diseño un par de partidores específicos, utilizando para ello el programa primer3, los que amplificarían fragmentos de: 495 bp para CTG1035712, 639 bp para AY348574, y 414 bp para CB923206 (ver tabla 2 fig.2). Entre las secuencias correspondientes a los ESTs de CTG1035712 y CB923206 existen zonas de homología, mientras que al comparar con la secuencia AY348574; que corresponde a una Prx del tipo básica encontrada en raíz y caracterizada por Vatulescu et al (2004), no se encuentran zonas de homología con los otros EST(fig. 2). Los partidores

diseñados para cada uno de los EST de Prx de vid se muestran en la Figura 2.

Tabla 2: partidores específicos de Prx generados con el programa primer3 para las secuencias CTG1035712, CB923206, AY348574. Donde left y right primer corresponden a los partidores forward y al reverse respectivamente. Se indican la base en la que inicia el partidor (start), el largo del partidor (len), la temperatura de melting (tm), el porcentaje de bases C+G (gc%), auto complementariedad de los partidores (any), complementariedad entre partidores (3') y la secuencia del partidor (seq), el tamaño original de cada secuencia (sequence size) y el tamaño del producto de amplificación de cada secuencia (product size).

secuencia AY348574							
OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
LEFT PRIMER	46	20	59.55	45.00	5.00	3.00	TATTGGATGGCACTGCAAC
RIGHT PRIMER	684	20	59.57	50.00	4.00	1.00	GCCACATCCGTAAAGAAAG
SEQUENCE SIZE: 941							
PRODUCT SIZE: 639,							
secuencia CB923206							
OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
LEFT PRIMER	71	20	59.85	50.00	5.00	1.00	CAGGCAAAGGGTCTTTTCAG
RIGHT PRIMER	484	20	59.97	50.00	3.00	2.00	CCCGTCTTCACTCCAATGTT
SEQUENCE SIZE: 592							
PRODUCT SIZE: 414							
secuencia CTG1035712							
OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
LEFT PRIMER	30	20	59.98	50.00	7.00	3.00	TTCACTGGCAGCTGATATGC
RIGHT PRIMER	524	20	60.05	55.00	3.00	2.00	TCCCCATCAGAACCTGTCTC
SEQUENCE SIZE: 689							
PRODUCT SIZE: 495							

CB923206	-----	
CTG1035712	-----	
AY348574	TTGCATTTTCACGACTGCTTTGTATTGGGATGTGATGCTTCTATA TTATTGGATGGCACTGCAACC TTTACTGGA	75
CB923206	-----	
CTG1035712	-----	
AY348574	GAGAAGACAGCAGGACCAAAATAACAACCTCTGTGAGAGGATATGAGGTGATCGACACCATTAATCTCAAGTGGGA	150
CB923206	-----	
CTG1035712	-----	
AY348574	AGTTTGTGCCCTGGAGTTGTCTCTTGTGCGAGATATTGTAGCAGTGGCAGCTCGTGACTCGGTGTCATTTTGGGT	225
CB923206	-----GCTCAGATATATCCCATGCTGCCAACATCCCAGAAGTCGCTGACTC	46
CTG1035712	-----GGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGCAACAT TCACCTGGCAGCTGATATGC CTGATGTGAGT GACTC	65
AY348574	GGCCCAACATGGACTGTGCGATTAGGCA-GAAGAGATTCAACCACGGCGAGTTTCAGTGTCTGGCACCACCT	299
CB923206	TATCCAAC --TTCT CAATCAAAGTT CAGGCAAAA ----- ATAGAGACCTTGT TCTTCT CAGTGTGCTGG	119
CTG1035712	AATCCAAC --AGCT GAAATCTAAGTT TTTAGACAGGGGTCTCT CAGAAAAAGACCTTGT GCTCCT CAGTGTGCTGCA	138
AY348574	CCCTGGCCCGAACTTAAGTCTCAGTCAACTTATATCTGCCTTCTCCAAGAAGGGCTTGACTACTAAGGAAATGGT	374
CB923206	CAT ACCATTGGGACAAC TGCAT GCTTCTT CATAGAGACGAGACT TACAAC TT CACCCGAG -GCGGTGGCTCGGA	193
CTG1035712	CAC ACCATTGGCAACCAC AGCAT GCTTCTT CATGACAGACCGGCT TACAAC TTTTTCCGG-GTGGGGATCCGA	212
AY348574	GGTTCTCTCAGGA--ACT-CATACC---ATAGGCAAGCAAGATGCACAAGTTTTCGAAATCATATTTACAACGA	443
CB923206	TCCTGCAATCAACCCTGACTTCCTCCCAAACTAAAGGCCAAGTGCCCG TTTCGGGGAGATAT CAATGTCCGACT	268
CTG1035712	TCCATCTATCAGCCCTGATTCCTCCCAAGAGCTAAAAGCAAGTGCCCGCC AGGATGGT GATGTTAATGTTCCGGTT	287
AY348574	CACCGACATCGATCCAGCATTTGCAGCATCAAAACAGAAAATCTGCCCAAGATCGGGTGGAGATGATAATCTATC	518
CB923206	ACCAC TT GATCCGGT GACTGAAGAAACG TTTGATGTT CAGATATTGAGGAATAT CAGGATGGATTAGCAGTGAT	343
CTG1035712	ACC AT GAC CAGGGAAAGTGGGGAGACAT TTTGACAAAAGAT TCTGAAAAACAT TAGGGTGGATTGCTGTGCT	362
AY348574	TCCTCTGGATGGAACAACACTACTG---TTTTGATAATGTTATTTTAGGGTTTGGAAAGAAAGAGGGTCTGTT	590
CB923206	AGAGAGT GATGCTAGGCTTT TACGATGACAG AGCAACC AA AGCGGGT GGTGGACT CCTAC ATTGGGC-----AGCGC	413
CTG1035712	GCGGTCA GATGCTAGTCTT TAGGAGGATGA AGCAACTAAGAGCGT AATAGACT CCTACT TCGGCCCCCTAAACTC	437
AY348574	GCACCTCAGACCAGGTACTCTACAACGGTGGTCCACAGATTCCTAGTTAAAACCTAC-----AGCAT	648
CB923206	GGGAGTT---CTGCAT TTGGCAGGACTTTG CAGAGG CAATGGTGAA GATGGGT ACAT TTGGAGTGAAGACGGG	484
CTG1035712	ACAATTTGGACCATCT TTTGAGGAGATTTT GTAACT CAATGGTGA AAATGGGCCAGATCGGTGTA GAGACAGG	512
AY348574	CGACACTG---CCA TTTCTTACGGATGTGGCC AACGCCATGGTTAGGATGGAGATATCAGTCCTTTAAACCGG	692
CB923206	TTCA CAAGGA GAGATCAG ACGTAT TTGCACAGCTGTTAAT GGAGTCC---CTTTGTA-GTTTTATTTCCCGTTGC	555
CTG1035712	GATGGG GATCAG GCGAG TTTGC GGAG CTTTAAT TGAATTT---CTATGTTAATGTACCATTCTCCCT	584
AY348574	AAC TAATGG CAGATTAGGACCAACTGCAGGAAAGTCAACTGATCCTAGTCAGTTATGGCTATATTTCTTTCT	767
CB923206	TTCTTAAT ACCAT AGAAAT--AATAGTCTCTGTGTGAGGCTGCGCATACCAT-----	606
CTG1035712	AGCTAGTTCAT CAT ATATAT--ACTCATAGAAATCCGAATTTCAATTCATGGAATGTTGAAATATACAGAAATA	657
AY348574	GGTTAAGTGTCTTTAATGTTAATCTACTACAATAAATAATCGGAAGTTGCTTATCGCAAAGCAGTTTGGGAAAT	842
CB923206	-----	
CTG1035712	GTTATTCCTATTC CACTGTTT CACTCCACGT-----	689
AY348574	TTGTGGAGTTTATGGTATTTGATTTGTTCGTCTACTTAAAAAATATCTTTAAAAATTTTAGTCAAGAACAAA	917
CB923206	-----	
CTG1035712	-----	
AY348574	AAAAAAAAAAAAAAAAA 932	

Fig2: Alineamiento de los EST seleccionados de la base de datos de la Universidad de California genomic facilities. CB923206, CTG1035712 y AY348574 EST de Prx de *V. vinifera* encontradas, secuencias de 592, 689, y 932 bp respectivamente. El color amarillo destaca los partidores específicos para la secuencia AY348574, en color verde se destacan los partidores específicos para la secuencia CTG1035712, y en color calipso se destaca los partidores específicos para la secuencia CB923206. Las letras remarcadas en color rojo destacan la similitud entre las secuencias CB923206 y CTG1035712

Amplificación por RT-PCR de los transcritos de Prx

La expresión de transcritos de Prx de vid se analizó en tejidos de yema y raíz mediante RT-PCR. En el análisis se utilizaron los partidores específicos de Prx clase III de *Vitis vinifera* diseñados a partir de la base de datos de EST de la Universidad de California. En tejidos de raíz se detectó la presencia de los tres transcritos CTG1035712, AY348574 y CB923206 (Fig. 3), mientras que en tejidos de yema sólo se detectó el transcrito CB923206 (Fig. 3).

En los ensayos de RT-PCR se incluyó como control interno el gen de actina (N° accesión AY680701) (fig. 3, carril 5)

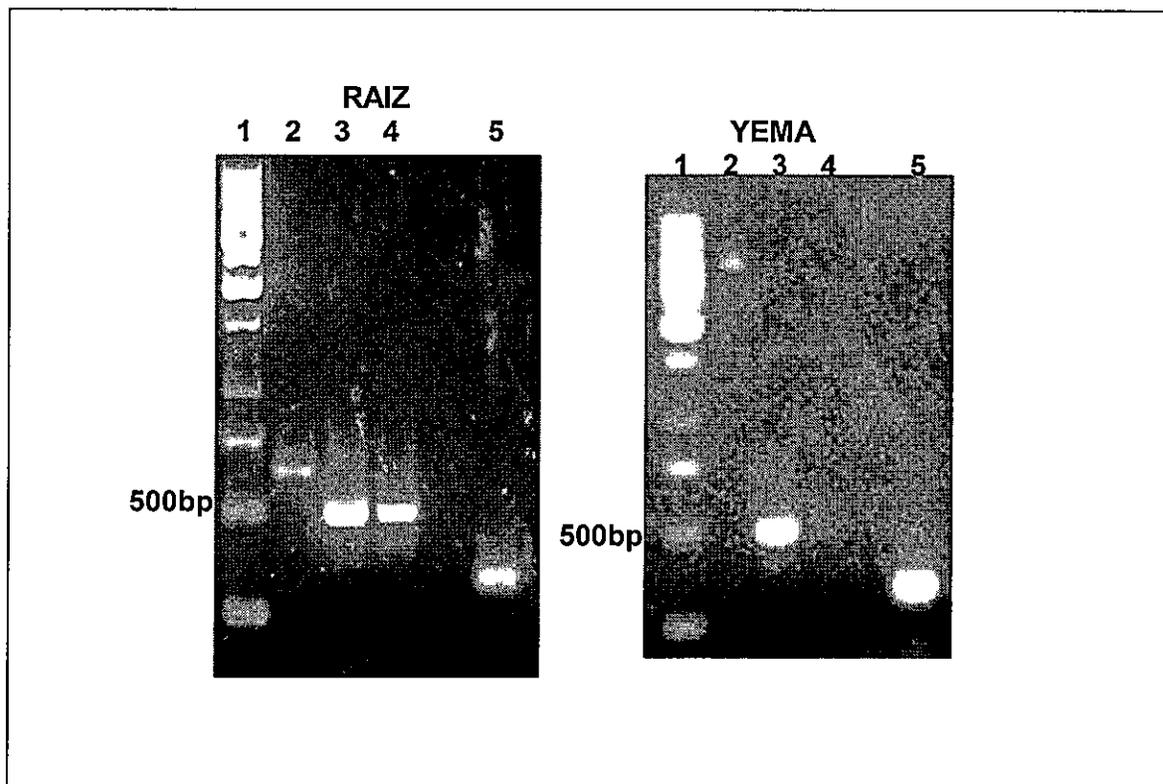


Fig 3: RT-PCR de Prx de clase III de *V. vinifera* con RNA total extraído de tejido de yema y raíz de cv. Thompson seedless. Carril 1 corresponde al marcador de PM 1Kb, carril 2 transcrito de EST de (AY348574), carril 3 transcrito de EST de Prx (CB923206), carril 4 transcrito de EST (CTG1035712) y carril 5 transcrito de actina (control interno). En cada caso se utilizó como templado 1 µg de RNA total. El gel fue eluído con 5 µl de cada muestra de PCR.

Análisis de secuencia del fragmento de yemas amplificado por PCR

La identidad del fragmento de yemas (denominado CB-yema) amplificado por PCR con los partidores diseñados para CB923206, fue determinada tras secuenciar el fragmento y compararlo con los EST de Prx de *V. vinifera* disponibles en la base de datos de la Universidad de California (<http://cgf.ucdavis.edu>) (Fig. 4a) el nivel de identidad de CB-yema respecto de los EST de Prx clase III fueron de 99.7 % de identidad con Prx EST CB923206; 62.8 % con CTG 1035712 y 39.6 % de identidad con AY 348574.

El análisis de homología: Blastx, para la secuencia de amino ácidos del fragmento CB-yema (según la base de datos de la NCBI) da como resultado que entre el fragmento amplificado CB-yema hay una homología del 80 % con *G. hirsutum* CAE 4309, 72.5 % con *A. thaliana* NP 194328, 72.5% con *A. thaliana* Q 95ZH2, 71.8 % con *Glycine max* AAD37375 y 63.4 % contra *Oryza sativa* CAH69375. (Fig. 4b)

a)

CB923206	CATACCATTGGGACAACCTGCATGCTTCTTCATAGAGACGAGACTCTACAACCTCACCAGAG-GCGGTGGCTCGGA	193
CB-yema	-----TGGGACAACCTGCATGCTTCTTCATAGAGACGAGACTCTACAACCTCACCAGAG-GCGGTGGCTCGGA	66
CTG1035712	CACACCATTGGAACCACAGCATGCTTCTTCATGACAGACCGGCTGTACAACCTTTTCCGGG-GTGGGGGATCCGA	212
AY348574	GTTCTCTCAGGA--ACT-CATACC---ATAGGCCAAAGCAAGATGCACAAGTTTTTCGAAATCATATTTACAACGA	443
CB923206	TCCCTGCAATCAACCCTGACTTCCCTCCCAAAACTAAAGGCCAAGTGCCCGTTTTCCGGGGAGATATCAATGTCCGACT	268
CB-yema	TCCCTGCAATCAACCCTGACTTCCCTCCCAAAANTAAAGGCCAAGTGCCCGTTTTCCGGGGAGATATCAATGTCCGACT	141
CTG1035712	TCCATCTATCAGCCCTGAATTCCTCCAGAGCTAAAAGCAAAGTGCCCCAGGATGGTGATGTTAATGTTCCGGTT	287
AY348574	CACCCGACATCGATCCAGCATTTGCAGCATCAAAACAGAAAATCTGCCCAAGATCCGGGTGGAGATGATAATCTATC	518
CB923206	ACCACCTGATCCGGTGACTGAAGAAACGTTTGATGTTTCAGATATTGAGGAATATCAGGGATGGATTAGCAGTGAT	343
CB-yema	ACCACCTGATCCGGTGACTGAAGAAACGTTTGATGTTTCAGATATTGAGGAATATCAGGGATGGATTAGCAGTGAT	216
CTG1035712	ACCAATGGACCAGGAAGTGGGGAGACATTTGACAAAAAGATTCTGGAAAACATTAGGGGTGGATTGCTGTGCT	362
AY348574	TCCTCTGGATGGAACAACACTACTG---TTTTTCGATAATGTTTATTTTAGGGGTTTGGAAAGAAAAGAAGGGTCTGT	590
CB923206	AGAGAGTGATGCTAGGCTTTACGATGACAGAGCAACCAAGCGGGTGGTGGACTCCTACATTGGGC-----AGCGC	413
CB-yema	AGAGAGTGATGCTAGGCTTTACGATGACAGAGCAACCAAGCGGGTGGTGGACTCCTACATTGGGC-----AGCGC	286
CTG1035712	GCGGTGAGATGCTAGTCTTATGGAGGATGAAGCAACTAAGAGCGTAATAGACTCCTACTTCGGCCCCCTAAACTC	437
AY348574	GCACCTCAGACCAGGTACTCTACAACGGTGCTCCACAGATTCCCTAGTTAAAACCTAC-----AGCAT	648
CB923206	GGGAGTT----CTGCATTTGGGCAGGACTTTGCAGAGGCAATGGTGAAGATGGGTAAACATTGGAGTGAAGACGGG	484
CB-yema	GGGAGTT----CTGCA-----	298
CTG1035712	ACAATTTGGACCATCTTTTGAGGAAGATTTTGTTAACTCAATGGTGAAAATGGGCCAGATCGGTGTAGAGACAGG	512
AY348574	CGACACTG---CCACTTCTTTACGGATGTGGCCACGCCATGGTTAGGATGGGAGATATCAGTCTTTAAACCGG	

b)

G.hirsutum CAE54309	GPFYDVPTGRRDGRVSKMSLAKNLPDVEDSINVLSKSFKEKGLSDKDLVLLSGSHTIGA	198
CB-yema	-----SAAHTIGT	8
A. thaliana NP194328	GPAYEVPTGRRDGRVSNMSLAKDMPEVSDSIEILKAKFMQKGLNAKDLVLLS-AAHTIGT	238
A. thaliana Q95ZH2	GPAYEVPTGRRDGRVSNMSLAKDMPEVSDSIEILKAKFMQKGLNAKDLVLLS-AAHTIGT	193
Glycine max AAD37375	GPAYQVPTGRRDGLVSNLSLADMPDVSDSIEELKTKFLNKGLTVKDLVLLS-GAHTIGT	207
Oryza sativa CAH69375	GPSFDVPTGRRDGRVSSLRDADVLPVKDSIDVLRSKFAANGLDDKDLVLLS-AAHTVGT	199
	..**:**	
G.hirsutum CAE54309	TACFFMQKRLYNFTPGGG---SDPAINPGFLPQLKDKCPFNGDVNVRIPLDWSTQNVFDV	255
CB-yema	TACFFIETRLYNFTRGGG---SDPAINPDFLPKXKACPFKRGDINVRLPLDPVTEETFDV	65
A. thaliana NP_194328	TACFFMSKRLYDFLPGGQ---PDPTINPTFLPELTTQCPQNGDINVRLPIDRFSERLFDK	295
A. thaliana Q95ZH2	TACFFMSKRLYDFLPGGQ---PDPTINPTFLPELTTQCPQNGDINVRLPIDRFSERLFDK	250
Glycine max AAD37375	TACFFMTRRLYNFFPSGEG---SDPAIRQNFPLPKARCPQNGDVNIRLAIDEGSEQKEDI	265
Oryza sativa CAH69375	TACFFLQDRLYNFPLAGGGRGADPSIPEAFISELQSRCAP-GDFNTRLPLDRGSEAEFDT	258
	*****: **:* . * .**:* **.. :*. **.* *:::* **	
G.hirsutum CAE54309	KILRNIREGNAVIASDARLYDDRMTRQIVDSYITSS---AASFNQDFAEAMVKMGNIGA	311
CB-yema	QILRNIRDGLAVIESDARLYDDRATKRVVDSYIQQR---GSSA-----	105
A. thaliana NP_194328	QILQNIKDGFAVLQTDAGLYEDVTTTRQVVDSYLGMLNPFPGPTFESDFVKAIVKMGKIGV	355
A. thaliana Q95ZH2	QILQNIKDGFAVLQTDAGLYEDVTTTRQVVDSYLGMLNPFPGPTFESDFVKAIVKMGKIGV	310
Glycine max AAD37375	NILKNIREGFAVLESARLNDDIATKNVIDSYVSPFSPMFGPSFEADFVESVVKMGQIGV	325
Oryza sativa CAH69375	SILRNIRNGFAVIASDAALYNATATVGVVDYSSMLSAFFGPYFRQDFADAMVKMGSGVG	318
	..**:**: **:* ** * : * **:**	

Fig. 4: (a) Identidad de la secuencia del fragmento de cDNA obtenido del RT-PCR con los partidores específicos para el EST de Prx (CB923206). La secuencia obtenida fue comparada las tres secuencias de Prx de *V. vinifera* reportadas en la base de datos EST de genomic facility de la Universidad de California (<http://cgf.ucdavis.edu>), CTG1035712, AY348574 y CB923206. (b) Resultado del Blastx (de la base de datos de la NCBI) para el análisis de homología de la secuencia aminoacídica entre el fragmento de PCR amplificado CB-yema contra las Prx de clase III. *G.hirsutum* CAE54309, *A. thaliana* NP194328, *A. thaliana* Q95ZH2, *Glycine max* AAD37375, y *Oryza sativa* CAH69375

Actividad de isoenzimas de Prx en tejidos de yema y raíz de *V. vinifera* cv Thompson seedless

A través de IEF se analizó el perfil de isoenzimas de Prx presente en raíz y yemas de *V. vinifera* cv Thompson Seedless. En raíz se observó la presencia de dos isoenzimas básicas: PrxB1 y PrxB2; y una isoenzima neutra: PrxN1. En yema se observó igualmente las dos isoenzimas básicas (PrxB1 y PrxB2) pero además y a diferencia del tejido de raíz se observó una isoenzima ácida: PrxA1 (fig.5).

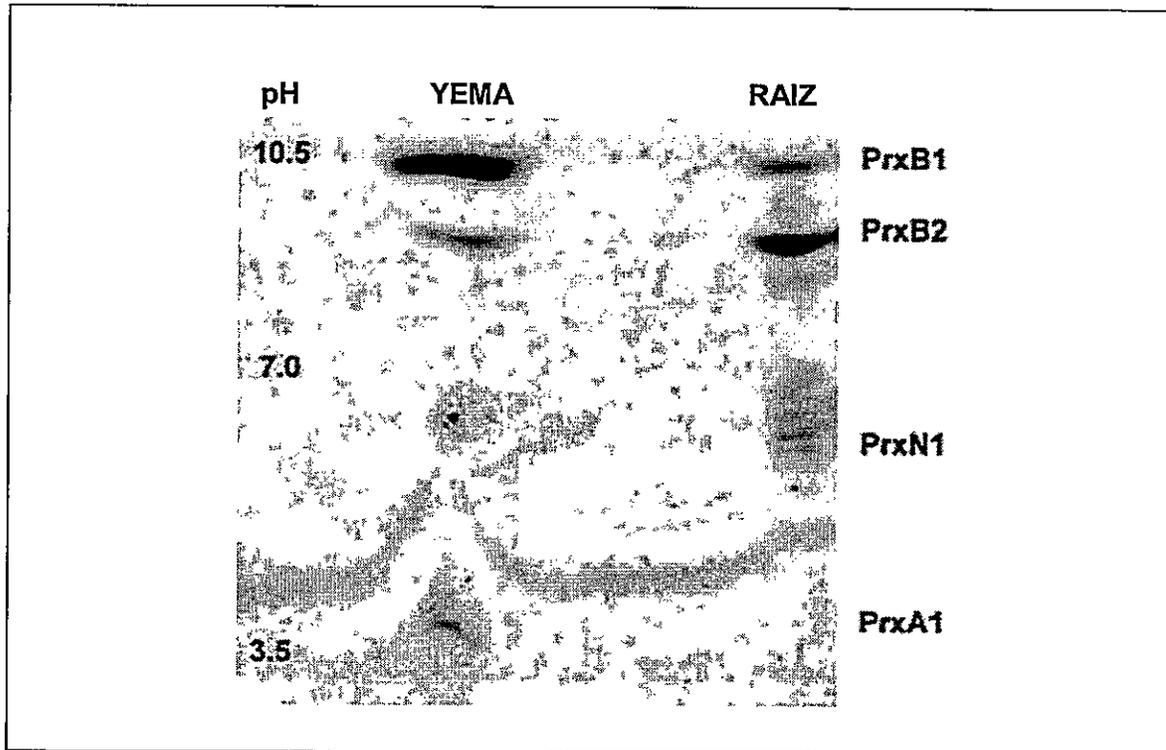


Fig. 5. Perfil de isoenzimas de Prx en cv. Thompson seedless de tejido de raíz y yema. PrxB1 Corresponde a la isoforma básica N° 1, PrxB2 isoforma básica N° 2, PrxN1 isoforma neutra y Prx A1 isoforma ácida. El isoelectroenfoco es teñido con 4-methoxy α -naphthol en presencia de H_2O_2 . El gel fue eluido con 35 U de cada muestra de Prx

DISCUSIÓN

Extracción de RNA de tejido de yemas.

La composición característica de la yema, tejido altamente lignificado con alto contenido de polisacáridos y polifenoles son condiciones que dificultan la extracción de RNA. Los polifenoles puede formar complejos con los ácidos nucleicos (Newbury y Possingham, 1977), y los polisacáridos pueden por otra parte co-precipitar con el RNA (Lodhi y col, 1994), el alto contenido de estos además de dificultar la extracción son factores de contaminación para efectos de una reacción de RT-PCR la que puede ser inhibida por efecto de dichos componentes.

Si bien existen varios protocolos probados para la extracción de RNA en *V. vinífera*, en general son procedimientos que no incluyen un tejido como el de yema y aun cuando no hay diferencias significativas entre los distintos protocolos descritos, los resultados finales son muy variables dependiendo del tejido tratado, así de las diversa pruebas realizadas se llegó a un protocolo basado en la metodología propuesta por Chang (1993), en el cual modificaciones tales como: la alta concentración de PVP y la alta cantidad de NaCl en el buffer de extracción contribuyen a disminuir la formación de complejos con ácidos nucleicos y proteínas, e incrementar la solubilidad de los polisacáridos evitando que co-precipiten con RNA, respectivamente, esto sumado a un procedimiento de purificación adicional permite obtener un buen rendimiento (variable según el tejido) y calidad en la extracción del RNA de yemas de *V. vinífera* cv Thompson seedless. La comprobación empírica de estos resultados queda registrada a partir de lo que se observa al obtener una alta resolución de las bandas ribosomales (Fig. 1) y de las mediciones espectrofotométricas donde la pureza del RNA se mide a partir de la razón entre las absorción del RNA ($A_{\text{máx}} = 260\text{nm}$), la absorción de proteínas

($A_{m\acute{a}x} = 280\text{nm}$) y la absorción de polisacáridos ($A_{m\acute{a}x} = 230\text{nm}$), donde idealmente se debe obtener una relación de 1:2:1 para $A_{230:260:280}$ (Tabla. 1).

Análisis de la base de datos EST "genomic facility"

De las múltiples investigaciones en torno a temas relacionados con las especies de *V. vinífera* se ha generado gran cantidad de EST (expressed sequence tag) disponibles desde el año 2003 en la base de datos de la NCBI (the National Center for Biotechnology Information). Estas secuencias que han sido generadas principalmente de la especie *V. vinífera* y provienen de análisis de secuencias de DNA genómico y de transcritos de RNA y EST de librerías de cDNA.

Todas estas secuencias de *V. vinífera* (más de 146.075) fueron reunidas en la base de datos de la Universidad de California (<http://cgf.ucdavis.edu/>). Las secuencias de EST y transcritos se organizaron en contigs (CTG) (o secuencia consenso tentativa) y singletons, que para el caso de *V. vinífera* corresponden a 14681 contigs y 14943 singletons. Pero además mediante Blastx se anotó y agrupo las secuencias en torno a la proteína para la que codifican (unigene). (Goes da Silva y col, 2005)

Toda esta información es parte de una base de datos pública donde hay además otros antecedentes respecto de la expresión de estas secuencias y el tejido y el estado de desarrollo en el que se encuentra la planta, lo que en conjunto contribuye de forma importante en el avance de los análisis para el seguimiento de las rutas de señalización, o en los análisis genómicos como expresión y anotación de genes, además de facilitar la identificación de genes marcadores.

Expresión de transcritos de Prx en tejidos de yema y raíz

Los EST seleccionados de la base de datos genomic facilities (<http://cgf.ucdavis.edu/home/>) a partir de la búsqueda de class III peroxidase dio como resultado tres secuencias EST: CTG1035712, AY348574 y CB923206.

El EST CTG1035712, corresponde a un contig, es decir, una secuencia que resulta del ensamble de varias secuencias EST, todas las secuencias ensambladas en este caso provienen de una librería de cDNA de bayas de *V. vinífera* sometidas a estrés abiótico. La secuencia EST AY348574 corresponde en realidad a un cDNA completo de una Prx básica que se expresa en raíz de *V. vinífera* al momento de la protrusión (Vatulescu y col, 2004), esto fue determinante para la utilización del tejido de raíz como control en la expresión de los transcritos. Finalmente la secuencia EST CB923206 corresponde a una secuencia singleton de *V. vinífera* derivada de los múltiples programas de secuenciación sin mayor reporte del tejido del cual procede.

Al ensayar por RT-PCR la expresión de los transcritos con los partidores específicos para cada EST (CTG1035712, AY348574 y CB923206) se observó la amplificación de los tres pares de partidores en tejido de raíz, mientras que en tejido de yema hubo solo amplificación para el partidador específico diseñado según el EST CB923206. Sin embargo, este ensayo fue realizado con muestras de yema colectadas en el mes de Mayo cuando la yema se encuentra en estado ED, por lo tanto, es posible que los otros transcritos no se observen en este periodo porque se expresan en otros estados de desarrollo de la yema o bien porque tienen una tasa de recambio mayor que el transcrito CB923206. Sería interesante entonces analizar lo que ocurre durante todo el curso del receso invernal para conocer si cada transcrito presenta un patrón de expresión particular o bien si el transcrito CB923206, el que se posteriormente fue

denominado como "CB-yema" es efectivamente el único presente en yema durante el ciclo de dormancia.

Isoformas de Prx en tejidos de yema y raíz

Las dos actividades de Prx básica encontradas en los extractos de yema, también fueron encontradas en los extractos de raíz. PrxA1, la isoforma de Prx ácida detectada en yemas, no estaba presente en raíz. Sin embargo, la presencia de una isoforma ácida de Prx que aparece 32 hr después de la protrusión durante el proceso de enraizamiento ha sido reportada en raíces de *Vitis cv Touriga Nacional* (Vatulescu y col, 2004). Así la falta de actividad de PrxA1 en extractos de raíces de Thompson Seedless puede deberse al estado de desarrollo del tejido de la raíz usado durante la preparación del extracto.

Entonces para establecer alguna correspondencia entre la expresión de las isoenzimas de Prx con la síntesis de transcritos de RNA, sería necesario obtener más datos respecto del control de la expresión de proteínas y transcritos y conocer la secuencia a lo menos parcial de la proteína para obtener una resultado más concluyente.

Comparación de zimograma y transcritos de Prx en yemas de *V. vinifera cv Thompson*

Seedless

La falta de correspondencia entre el número de transcritos de Prx y el número de isoformas de Prx expresadas en tejidos de yema se podrían deber (1) A que los EST de Prx reportados en la base de datos no están relacionados con las isoformas de Prx encontradas en el tejido de yema (2) a que a pesar de que las proteínas permanecen catalíticamente activas en el tejido de yema, los transcritos de RNA son rápidamente degradados después de la traducción (3) a que un transcrito de Prx puede dar origen a

más de una proteína producto de modificaciones post-transcripcionales (4) o bien que la técnica de IEF aplicada no alcanza una buena resolución y no se revela la cantidad real de isoenzimas de Prx, lo que refuerza la imposibilidad de relacionar un transcrito con una isoenzima del IEF. Aún así estos resultados sugieren que en las yemas la actividad transcripcional es alta mientras que el recambio de proteínas es bajo. Resultados similares fueron observados por Pacey-Miller (2003) en *V. vinifera* L cv. Purple Cornichon.

Perspectivas de análisis de Prx CB-yema

El transcrito detectado en tejido de yema CB-yema asignado del análisis de Blastx como Prx clase III, se detectó en yemas colectadas a principio de Mayo cuando las yemas se encuentran en el estado de ED. Considerando lo anterior sería interesante hacer el seguimiento de esta Prx CB-yema y caracterizar el patrón de expresión del transcrito a lo largo de todo el ciclo de dormancia. Determinar si su expresión está relacionado con algún estado específico de la dormancia de yemas o con la transición de un estado a otro (Lang y col, 1987) ya que de ser así, la expresión de este transcrito podría ser utilizada como un marcador molecular para indicar el estado específico de dormancia en que se encuentra la yema. Prx CB-yema podría también ser usado como referencia para la aplicación de cianamida hidrogenada, un inductor de la brotación de yemas en vid cuya aplicación actualmente se realiza en forma empírica, sin saber el estado de dormancia en que se encuentra la yema al momento de su aplicación, ya que los distintos estados de dormancia por los que atraviesa la yema no son distinguibles a ojo del observador. La definición de cada fase de dormancia es importante para que la aplicación de la cianamida hidrogenada u otros químicos se realice en el momento preciso puesto que aplicaciones cuando la yema a salido del

estado de ED son muy dañinas para la planta, mientras aplicar cianamida hidrogenada a inicios de la ED se minimizan los efectos negativos en la brotación. (Erez, A. 1995; Henzell, y col. 1991, Shulman, y col. 1983)

CONCLUSIONES

- (1) El procedimiento desarrollado para la extracción de RNA en tejido de yema, permite extraer RNA de buena calidad y con un buen rendimiento y además funciona eficientemente para otros tejidos de *Vid cv. Thompson Seedless* como hoja y raíz.
- (2) Se diseñaron partidores específicos para tres secuencias EST asignadas como Prx clase III de *V. vinífera* descritas en la base de datos de la Universidad de California (<http://cgf.ucdavis.edu>), las tres secuencias EST corresponden a un contig CTG1035712, y dos singleton AY348574 y CB923206, y los partidores específicos fueron probados en tejido de yema y raíz.
- (3) El análisis de los transcritos correspondientes a los EST CTG1035712, AY348574 y CB923206 en tejido de raíz y yema, revela que hay una expresión diferencial de los transcritos, puesto que en tejido de yema solo se observa CB923206 mientras que en raíz se observan los tres transcritos CTG1035712, AY348574 y CB923206.
- (4) Al analizar la secuencia del transcrito expresado en yema se comprueba por medio de un Blastx, que este transcrito, denominado CB-yema, corresponde a una Prx clase III.
- (5) Al analizar los tejido de raíz y yema en cuanto a la expresión de proteínas Prx, se observó que dicha enzima presenta polimorfismos, con al menos tres isoenzimas en cada uno de los tejidos: yema y raíz. El patrón de isoformas entre los tejidos de raíz y yema, es coincidente en la expresión de dos isoformas básicas (PrxB1, PrxB2) y difiere en la presencia de una isoenzima acida (PrxA1) en yema, y una isoenzima neutra (PrxN1) en raíz.

(6) Las técnicas aplicadas en este trabajo: el zimograma y RT-PCR para el análisis de expresión de Prx, en tejido de yema y raíz, no son suficientes para vincular un determinado transcrito a una isoenzima expresada en el IEF.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arora R, Wisniewski ME, Scorza R (1992) Cold acclimation in genetically related (sibling) deciduous and evergreen peach (*Prunus persica* [L.] Batsch) 1. Seasonal changes in cold hardiness and polypeptides of bark and xylem tissues. *Plant Physiol.* **99**: 1562-1568
2. Arora R, Wisniewski M (1996) Accumulation of a 60-kD dehydrin protein in peach xylem tissues and its relationship to cold acclimation. *HortScience.* **31**: 923-925
3. Boyle, J.S and Lew. A.M. (1995). *Trends in Genetics* **11**, 8.
4. Chang, S., Puryear, J., Cairney, J., (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* **11**: 113-116.
5. Erez, A. (1995). Means to compensate for insufficient chilling to improve bloom and leafing. *Acta Hort.* **395**: 81-95.
6. Fennell, A., Hoover, E., (1991). Photoperiod influences growth, bud dormancy and cold acclimation in *Vitis labruscana* and *V. riparia*. *J.Am. Soc. Hort. Sci.* **116**: 270- 273.
7. Finkelstein RR, Gampala SSL, Rock CD. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell. Supplement*: S15-S45
8. Gévaudant F, Pétel G, Guillot A. (2001). Differential expression of four members of the H⁺-ATPase gene family during dormancy and vegetative buds of peach trees. *Planta.* **212**: 619-626
9. Goes da Silva F, Iandolo A., Al-Kayal, F., Bohlmann, M.C., Cushman M.A., Lim H., Ergul A., Figueroa R., Kabuloglu E.K., Osborne C., Rowe J., Tattersall E., Leslie A., Xu J., Baek, J., Cramer G.R., Cushman J.C. y Cook D.R.; 2005. Characterizing the grape transcriptome. Analysis of expressed sequence tags from multiple vitis species and development of a compendium of gene expression during berry development. *Plant Physiol.*, Vol **139**, No 2, pp. 574-597.
10. Hansen E, Olsen JE, Junttila O. (1999). Gibberellins and subapical cell divisions in relation to bud set and bud break in *Salix pentandra*. *J Plant Growth Regul.* **18**: 167-170
11. Henzell, R. F., Briscoe, M.R., Gravett, I. (1991). Improving kiwifruit vine productivity with plant growth regulators. *Acta Horticult.* **297**: 345-350.
12. Howe GT, Gardner G, Hackett WP, Furnier GR. (1996). Phytochrome control of short-day induced bud set in black currant. *Physiol Plant.* **97**: 95-103

13. Jackson S, Thomas B. (1997). Photoreceptors and signals in the photoperiodic control of development. *Plant Cell Environ.* **20**: 790-795
14. Jackson PAP, Galinha CIR, Perira CS, Fortunato A, Soares NC, Amácio SBQ, Pinto-Ricardo CP. (2001). Rapid deposition of extension during the elicitation of grapevines callus cultures is specifically catalyzed by a 40-kilodalton peroxidase. *Plant Physiology.* **127**: 1065-1076
15. Lang, G.A. Early, J.D. Martin, G.C. Darnell, R.L. (1987). Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research, *Hortscience* **22**: 371-377.
16. Leung J, Giraudat J. (1998). Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **49**: 199-222
17. Li C, Puhakainen T, Welling A, Viherä-Aarnio A, Ernstsén A, Junttila O, Heino P, Palva ET. (2002). Cold acclimation in silver birch (*Betula pendula*). Development of freezing tolerance in different tissues and climatic ecotypes. *Physiol Plant.* **116**: 478-488
18. Li C, Junttila O, Heino P, Palva ET (2003) Different responses of northern and southern ecotypes of *Betula pendula* to exogenous ABA application. *Tree Physiol.* **23**: 481-487
19. Lodhi, M. A, Ye G-N, Weeden, N. F, and Reisch, B. I. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Mol Biol Rep.* **12**: 6- 13.
20. Molmann, J.A. Asante, D.K. Jensen, J.B. Krane, M.N. Ernstsén, A. Junttila, O. Olsen, J. (2005). Low night temperature and inhibition of gibberellin biosynthesis override phytochrome action and induce bud set and cold acclimation, but not dormancy in PHYA overexpressors and wild-type of hybrid aspen. *Plant Cell and Environment.* 1-10.
21. Morrisson J C. (1991) bud development in *Vitis vinifera* L. *Botanical Gazette.* **152.3**: 304 – 315.
22. Narusaka Y, Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Furihata T, Abe H, Narusaka M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Interaction between two *cis*-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J.* **34**: 137-148
23. Newbury, H. J and Possingham J. V. (1977). Factors affecting the extraction of intact ribonucleic acid from plant tissues containing interfering phenolic compounds. *Plant Physiol.* **60**: 543 - 547.
24. Olsen JE, Junttila O, Nilsen J, Eriksson ME, 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. *Plant J.* **12**: 1339-1350
25. Pacey-Miller, T., Scott, K., Ablett, E., Tingey, S., Ching, A., Henry, R., (2003). Genes associated with the end of dormancy in grapes. *Functional Integrat. Genom.* **3**: 144-152
 26. Pérez F, Gomez, M. (1998). Gibberellic acid stimulation of isoperoxidase from pedicel of grape. *Phytochemistry.* **48**(3) 411-414
 27. Pérez, F.J., Morales, V., (1999). A basic peroxidase from the grape pedicel is induced by gibberellic acid. *Aus. J. Plant Physiol.* **26**: 387-390.
 28. Pérez, F.J. Burgos B. (2004). Alterations in pattern of peroxidase isoenzymes and transient increases in its activity and in H₂O₂ levels take place during the dormancy cycle of grapevine buds: the effect of hydrogen cyanamide. *Plant Growth Regulation* **43**: 213-220.
 29. Rinne PLH, Van der Schoot C. (1998). Symplasmic fields in the tunica of the shoot apical meristem coordinate morphogenetic events. *Development* **125**: 1477-1485
 30. Robinson DS, Bretherick MR, Donnelly JK. (1989). Heat stability and isoenzyme composition of peroxidases in Ohane grapes - *International Journal of Food Science and Technology.* **24**: 613-18
 31. Rock CD. (2000). Pathways to abscisic-acid regulated gene expression. *New Phytol.* **148**: 357-396
 32. Rohde A, Van Montagu M, Inzé D, Boerjan W. (1997). Factors regulating the expression of cell cycle genes in individual buds of *Populus*. *Planta.* **201**: 43-52
 33. Rohde A. Bhalerao R. P. (2007). Plant dormancy in the perennial context. *Trends in plant Science.* **12**: 217-223
 34. Rowland LJ, Arora R (1997) Proteins related to endodormancy (rest) in woody perennials. *Plant Sci.* **126**: 119-144
 35. Rowland, L. J, S. Mehera. A. Dhanaraj, E. L. Ogden, and R. Arora. (2003). Identification of molecular markers associated with cold tolerance in blueberry. *Acta Hort.* (in press).
 36. Rozen S., Skaletsky H.; 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), Vol 132, pp. 365-386

37. Salzman, R A., Bressan. P. M. Hasegawa, E. N. Ashworth, and B. P. Bordelon. (1996). Programmed accumulation of Lea-like proteins during desiccation and cold acclimation of overwintering grape buds. *Plant Cell Environ.* **19**: 713- 720
38. Samish, R.M. (1954). Dormancy in woody plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **5**: 183 204
39. Sarnighausen E, Karlson D, Ashworth E (2002) Seasonal regulation of a 24-kDa protein from red-osier dogwood (*Cornus sericea*) xylem. *Tree Physiol.* **22**: 423-430
40. Saure. M. (1985). Dormancy release in deciduous fruit trees. *Hort. Rev.* **7**: 239 - 300
41. Schnabel, B.J. and R.L. Wample. (1987). Dormancy and cold hardiness in *Vitis vinifera* L. cv. White Riesling as influenced by photoperiod and temperature. *Amer. J. of Enol. and Vitic.* **38**:265-272.
42. Shulman, Y., Nir, G., Fanberstein, L., Lavee, S. 1983. The effect of cyanamide on the release from dormancy of grapevine buds. *Sci. Hort.* **19**: 97-104.
43. Srinivasan, C. Mullins M. G. (1980). Effects of temperature and growth regulators on formation of anlagen, tendrils and inflorescences in *Vitis vinifera* L. *Ann. Bot.* **45**: 430- 446.
44. Srinivasan, C. Mullins M. G. (1981). Physiology of flowering in the grapevine: a Review. *Am. J. Enol. Vitic.* **32**: 47-63
45. Sung D-Y, Kaplan F, Lee K-J, Guy CL. (2003). Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends Plant Sci.* **8**: 179-187
46. Svendsen, E. L. (2003). A molecular approach for studying vegetative maturity in red-osier dogwood (*Cornus sericea*) MS thesis. Univ. o Saskatchewan, Saskatoon, SK.
47. Thomashow MF. (1990) Plant Cold Acclimation in higher plants. *Adv. Genet.* **28**: 99-131
48. Thomashow, Michael F. (1999). PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu. Rev Plant Physiol. Plant Mol, Biol.* **50**: 571-599.
49. Vatulescu, A., Fortunato, A.S., Sa', M.C., Amancio, S., Candido, R., Jackson, P.A., 2004. Cloning and characterisation of a basic IAA oxidase associated with root induction in *Vitis vinifera*. *Plant Physiol. Biochem.* **42**, 609–615.
50. Wake CMF, Fennell A. (2000.) Morphological, Physiological and dormancy responses of three *Vitis* genotypes to short photoperiod. *Physiologia Plantarum.* **109**: 203 -210. doi: 1034/j. 1399 – 3054. 2000. 100213.x

51. Williams, L. E. (1996). Grape. In E . Zamski and A. A. Schaffer (eds). Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source- Sink Relationships. Marcel Dekker, New York.
52. Zeevaart JAD, Creelman RA. (1988). Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **39**: 439-473