

UCH-FC
Biotecnología
C292
C-1



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**IDENTIFICACION DE PpCBF EN *Prunus persica*: UN GEN
ORTOLOGO FUNCIONAL DE LA FAMILIA DREB1/CBF DE
*Arabidopsis thaliana***

Seminario de Título

Entregado a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por:

RODRIGO SEBASTIAN CAROCA CACERES

Enero, 2007
Santiago-Chile

Director de Memoria de Título: Dra. Lee A. Meisel





“Identificación de PpCBF en *Prunus persica*: Un gen ortólogo funcional de la familia DREB1/CBF de *Arabidopsis thaliana*”

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

RODRIGO SEBASTIAN CAROCA CACERES

Dra. Lee Meisel
Directora Seminario de Título

Firma manuscrita en tinta azul de Lee Meisel sobre una línea horizontal.



Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Michael Handford
Presidente Comisión

Firma manuscrita en tinta azul de Michael Handford sobre una línea horizontal.

Dra. Claudia Stange
Correctora

Firma manuscrita en tinta azul de Claudia Stange sobre una línea horizontal.

Dra. Liliana Cardemil Oliva
Patrocinante

Firma manuscrita en tinta azul de Liliana Cardemil Oliva sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, Enero 2007





Hijo de Javier Caroca y María Cáceres, soy el menor de 5 hermanos. La mayor parte de mi vida se ha desarrollado en un pequeño pueblo llamado Guacarhue, ubicado a 33 Km. al suroeste de Rancagua. Fue en la única escuela de esta localidad, en la que aprendí a leer y escribir mis primeras palabras. En el par de años que me eduqué en este lugar, conocí amistades que aún perduran y espero que lo sigan haciendo. Más tarde, mis padres decidieron enviarme al Centro Educacional Asunción ubicado en la ciudad de Rengo. En este colegio estuve gran parte de la educación básica y la enseñanza media completa. Debido a que se trataba de un colegio bastante chico, tuve compañeros que se repitieron durante los 10 años que duró mi estadía en ese lugar. Eso explica por que con algunos de ellos mantengo contacto a pesar del tiempo y la distancia. Un buen rendimiento durante la enseñanza media y un alto puntaje en la PAA, me permitieron ingresar a la carrera que precisamente ahora estoy culminando. Acostumbrado a la tranquilidad de mi pequeño y hermoso pueblo, no me fue fácil ni agradable adaptarme a la nueva realidad que me planteaba el vivir en la capital. Sin embargo, con el tiempo aprendí cosas, conocí gente y recorrí lugares que justifican plenamente el haber pasado estos últimos 7 años en medio del ajetreo típico de la ciudad.

Al leer esta pequeña referencia de mi persona, soy consciente de que he quemado varias etapas a lo largo de mi existencia. Cada una de ellas me ha enseñado como afrontar los nuevos desafíos que la vida me plantea. Hoy termino una etapa que creo ha sido muy enriquecedora para mí, tanto del punto de vista académico como personal. En este momento no sé que habrá más adelante, sin embargo, siento que con optimismo y esfuerzo (y a veces un poco de suerte) es posible obtener nuevas satisfacciones personales y para nuestros seres queridos...



**A mis Padres, Hermanos
y Amigos**



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis padres, quienes confiaron en mí y me entregaron el apoyo anímico y económico para poder estudiar. En aquellos momentos en que daban ganas de mandar todo “lejos”, ellos fueron mi inspiración para seguir adelante y demostrarles que el esfuerzo que realizaron para tener un hijo profesional no fue en vano.

No puedo dejar de mencionar a los otros hijos de la Sra. Carmen y Don Javier (así es como la mayoría se refiere a mis amados padres), me refiero a Nano, Gundo, Ana María y Juan Pablo quienes se preocuparon de que “el conchito” saliera adelante. Este logro también es para ustedes. Ricardo, Felipón, Nacho, Negro, Cato, Tuti, Fabiola, Pilar, Naty son algunos de los compañeros de generación con los cuales compartí muchas noches de estudio y con los cuales establecí lazos de amistad que espero el tiempo no desgaste. Gracias por hacer tan grato mi paso por la Universidad.

Agradezco a la gente del Centro de Biotecnología Vegetal, especialmente a Andrea y Daniela quienes me entregaron consejo, apoyo y amistad.

A mi tutora, la Dra. Lee Meisel, por su disposición para ayudarme, aconsejarme y ser mi guía en mis primeros pasos en la ciencia. También agradezco al Dr. Herman Silva por sus comentarios y críticas durante el desarrollo del presente trabajo.

Quiero agradecer a la Dra. Liliana Cardemil por aceptar ser mi patrocinante de tesis y a la Dra. Claudia Stange y al Dr. Michael Handford quienes, como miembros de mi comisión evaluadora, realizaron importantes comentarios al escrito de este trabajo.

Finalmente, agradezco al Proyecto de Genómica Funcional en Nectarines (FDI G02 P1001) y al Núcleo Milenio de Biología Celular de Plantas (ICM P02-009-F), desde donde salió el financiamiento para desarrollar el trabajo que acá les presento.

INDICE DE MATERIAS



	Página
Título _____	i
Acta de aprobación _____	ii
Autobiografía _____	iii
Dedicatoria _____	iv
Agradecimientos _____	v
Índice de materias _____	vi
Índice de figuras _____	x
Índice de tablas _____	xi
Lista de abreviaturas _____	xii
Resumen _____	1
Abstract _____	3
1.- Introducción _____	5
2.- Hipótesis _____	12
3.- Objetivos _____	12
3.1.- Objetivo general _____	12
3.2.- Objetivos específicos _____	12
4.- Materiales y Métodos _____	13
4.1.- Generación de la base de datos de unigenes de frutos de <i>Prunus persica</i> utilizada en la presente tesis _____	13
4.2.- Identificación y análisis de secuencia de PpCBF _____	14
4.3.- Clonamiento de PpCBF en vector para expresión en plantas _____	15

4.3.1.- Clonamiento de PpCBF en el vector pENTR TM /D-TOPO	15
4.3.2.- Transformación de <i>E. coli</i> de alta competencia con el constructo pENTR-PpCBF	16
4.3.3.- Recombinación entre los vectores pENTR-PpCBF y pGWB2: sistema Gateway	16
4.3.4.- Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con el vector pGWB2-PpCBF	17
4.4.- Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> por el método de floral dip	18
4.5.- Selección de <i>Arabidopsis</i> transgénicas	18
4.6.- Análisis de expresión de genes del regulón CBF en plantas de <i>Arabidopsis</i> que expresan PpCBF, con la técnica de RT-PCR	19
4.6.1.- Extracción de RNA total desde hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que expresan PpCBF y silvestres	19
4.6.2.- Reacciones de transcripción reversa para los RNAs de <i>Arabidopsis</i>	19
4.6.3.- Análisis de expresión de genes del regulón CBF en plantas de <i>Arabidopsis</i> que expresan ectópicamente PpCBF mediante PCR	20
4.7.- Identificación de posibles genes ortólogos del regulón CBF en <i>Prunus persica</i>	21
4.8.- Análisis de expresión de posibles genes ortólogos del regulón CBF, con el método de transcripción reversa acoplado con PCR en Tiempo Real (RT-qPCR)	22

4.8.1.- Extracción de RNA total de frutos de durazno	22
4.8.2.- Cuantificación y análisis de calidad de RNA total de frutos de durazno y <i>Arabidopsis</i>	23
4.8.3.- Reacciones de transcripción reversa (RT) para los RNAs de durazno	24
4.8.4.- Análisis cuantitativo de expresión génica mediante reacción de PCR en Tiempo Real	24
4.9.- Ensayos de transformación transiente en distintas variedades de frutos de durazno	26
4.10.- Tinción histoquímica de GUS para frutos infiltrados de durazno	27
4.11.-Material Biológico	27
4.11.1.- Crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
4.11.2.- Crecimiento de bacterias <i>Escherichia coli</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28
4.12.- Minipreparaciones de DNA plasmidial para chequeo de bacterias transformantes	28
4.13.- Midipreps de DNA plasmidial	29
4.14.- Electroforesis en geles de agarosa para análisis de DNA	29
5.- Resultados	30
5.1.- Identificación de posibles ortólogos de la familia DREB1/CBF en secuencias de <i>Prunus persica</i>	30
5.2.- Clonamiento de PpCBF en vector de expresión para plantas	34
5.3.- Evaluación de la funcionalidad de PpCBF en plantas de <i>Arabidopsis</i>	

que expresan ectópicamente este gen	36
5.4.- Búsqueda de posibles ortólogos de genes del regulón CBF de <i>Arabidopsis</i> en <i>Prunus persica</i>	38
5.5.- Análisis de expresión de miembros del posible regulón CBF de frutos de durazno mediante RT-qPCR	42
5.6.- Evaluación de la actividad de PpCBF en frutos de durazno	46
6.- Discusión	49
6.1.- Análisis de secuencia y expresión de PpCBF	49
6.2.- Funcionalidad de PpCBF en <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
6.3.- Búsqueda de ortólogos del regulón CBF en unigenes provenientes de frutos de durazno	52
6.4.- Confirmación del perfil de expresión diferencial determinado digitalmente, con RT-qPCR	54
6.5.- Actividad de PpCBF en frutos de durazno	56
7.- Conclusiones	59
8.- Proyecciones	60
9.- Referencias	61
10.- Anexos	66



INDICE DE FIGURAS



Página

Figura 1: Representación esquemática de la regulación transcripcional ejercida por CBF	9
Figura 2: El posible ortólogo de CBF en <i>Prunus persica</i> , codifica una proteína de 230 aminoácidos	31
Figura 3: PpCBF presenta motivos que están conservados en ortólogos de otras especies vegetales	32
Figura 4: <i>PpCbf</i> se expresa preferentemente en frutos que han sido expuestos a bajas temperaturas	34
Figura 5: Clonamiento de <i>PpCbf</i> en vector binario para expresión en plantas	35
Figura 6: PpCBF induce la expresión de genes de respuesta a DREB1/CBF en Arabidopsis	37
Figura 7: Genes del regulón CBF de Arabidopsis y sus posibles genes ortólogos en durazno, graficados según su función biológica	42
Figura 8: Tres posibles genes blanco de PpCBF se expresan preferentemente luego de tratamientos con frío	45
Figura 9: PpCBF activa al promotor del posible ortólogo de deshidrina Xero2 en frutos de durazno	47
Figura 10: Análisis cualitativo de RNA usado para RT-qPCR	71

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Identidad entre PpCBF y genes ortólogos de otras especies vegetales	33
Tabla 2: Ortólogos del regulón CBF de Arabidopsis presentes en la base de datos de Unigenes de frutos de durazno	40
Tabla 3: Unigenes expresados preferentemente en E1	66
Tabla 4: Unigenes expresados preferentemente en E3	67
Tabla 5: Unigenes que disminuyen su expresión en E3	68
Tabla 6: Unigenes expresados preferentemente E1 y E3 con respecto a E2 y E4	69
Tabla 7: Resultados de RT-qPCR para Wcor413	70
Tabla 8: Obtención de los valores a graficar para resultado de qPCR de Wcor413	71



LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST: "Basic Local Alignment Search Tool" (herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales)

cDNA: DNA complementario

CBF: CRT Binding Factor

CRT: C-RepeaT

CTAB: Bromuro de Cetil Trimetil Amonio

DRE: Dehydration Responsive Element

DREB: DRE Binding Factor

dNTPs: Deoxi Nucleotidos Trifosfatos

E1: Estadio 1, frutos de duraznos no maduros

E2: Estadio 2, frutos de duraznos maduros jugosos

E3: Estadio 3, frutos de duraznos no maduros almacenados a 4 °C

E4: Estadio 4, frutos de duraznos maduros harinosos

EDTA: Ácido Etilen-Diaminotetra-Acético

EST: "Expressed Sequence Tags" (Secuencias parciales de cDNA)

kb: Kilobases

mRNA: RNA mensajero

ODEPA: Oficina De Estudios y Políticas Agrarias

pb: Pares de bases

pg: Picogramos

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

PpCBF: *Prunus persica* CBF

qPCR: "Quantitative PCR" (PCR cuantitativo)

RNA: Ácido ribonucleico

RNAsa: Ribonucleasa

rpm: Revoluciones por minuto

RT: "Reverse Transcription" (Transcripción reversa)

SDS: "Sodium Dodecyl Sulphate" (Dodecil sulfato de sodio)

TAIR: "The Arabidopsis Information Resource" (Fuente de información de Arabidopsis)

RESUMEN

Chile es un importante exportador de duraznos y nectarines hacia el hemisferio norte. Las frutas exportadas desarrollan desordenes fisiológicos al momento de la maduración los cuales están asociados al “daño por frío”. Estos problemas tienen relación con el tratamiento a 4 °C al que son sometidos los frutos durante todo el proceso de transporte que se realiza por vía marítima. Dentro del proyecto de “Genómica Funcional en Nectarines” se generó una cantidad considerable de información relacionada con cambios en la expresión génica en frutos de durazno, cuando son sometidos a bajas temperaturas. Con el objetivo de indagar en la regulación de la expresión génica frente al frío, en el presente trabajo se realizaron análisis enfocados a identificar si en frutos de durazno se conserva la vía regulada por factores de transcripción DREB1/CBF. Este tipo de vía está presente en varias especies vegetales y resulta ser clave en la generación de una respuesta al frío.

En la base de datos de unigenes de frutos de durazno, se identificó un ortólogo para genes de la familia DREB1/CBF al cual se le denominó PpCBF. La expresión de este gen se detectó principalmente en frutos expuestos al frío. PpCBF presentó una alta identidad de secuencia con ortólogos de Arabidopsis y otras especies de plantas, especialmente en la región que define el dominio de unión a DNA, AP2. La expresión ectópica de PpCBF en Arabidopsis provocó activación en la expresión de genes del regulón CBF (es el nombre que recibe el grupo de genes que responde a DREB1/CBF) de esta planta, indicando la conservación funcional del ortólogo identificado en frutos de durazno.

Se identificaron 38 posibles ortólogos para genes del regulón CBF de Arabidopsis en la base de datos de unigenes de frutos de durazno. Algunos de ellos aumentan su expresión frente al tratamiento con frío, como se demostró por medio de análisis de expresión digital y RT-qPCR. El promotor de uno de estos posibles ortólogos del regulón CBF identificados en durazno, se utilizó para evaluar la funcionalidad de PpCBF en frutos de durazno. PpCBF fue capaz de activar el promotor recién mencionado en ensayos de transformación transiente.

En la presente tesis se identificó un gen que participa en la regulación de la expresión génica en frutos de durazno expuestos a frío. Este gen representa un candidato para el cual estudiar su participación en la ocurrencia del daño por frío o bien planear otra estrategia biotecnológica para dar solución a este problema.

ABSTRACT

Chile is an important exporter of peaches and nectarines toward the northern hemisphere. These exported fruits often develop physiological disorders during the ripening which are associated with "chilling injury". These problems are related with the storage of the fruits at 4 °C during transport. The "Genómica Funcional en Nectarines" project has generated a considerable quantity of information related with changes in gene expression in peaches fruits subjected to low temperatures. With the aim of investigating cold regulated gene expression in peaches, this thesis, is focused on identifying the conserved pathway regulated by the transcription factor DREB1/CBF in peaches. This pathway is present in several plant species and is important in the generation of the cold response.

In the peach unigenes database, an ortholog of DREB1/CBF gene family was identified and named PpCBF. The expression of this gene was detected mainly in cold-treated fruits. PpCBF presents a high sequence identity with DREB1/CBF orthologs of Arabidopsis and other plants species, especially in the DNA binding domain, AP2. The ectopic expression of PpCBF in Arabidopsis plants causes the activation of expression of genes in the CBF regulon (the name of the group of genes that respond to DREB1/CBF), indicating the functional conservation of the ortholog identified in peach.

In the peach unigenes database, 38 putative orthologs for members of the Arabidopsis CBF regulon were identified. Some of these genes increased their expression in response to cold, as was demonstrated with digital expression analysis and RT-qPCR. The promoter of one putative ortholog of a member of the CBF regulon identified in peach

was used to evaluate PpCBF functionality in peach fruits. PpCBF showed the capacity to activate this promoter in transient transformation assays.

In the present thesis, a gene that participates in cold regulated gene expression in peach was identified. This gene represents a candidate gene to study its participation in chilling injury or to plan other biotechnological strategies to solve this problem.

1.- INTRODUCCIÓN

Chile es uno de los principales proveedores de carozos a nivel mundial, de manera que es el mayor oferente en el hemisferio sur de duraznos y nectarines (*Prunus persica*; según la ODEPA, www.odepa.gob.cl). Lo que favorece esta gran oferta desde nuestro país son las buenas condiciones agronómicas y de clima, junto con el hecho que las plantas de duraznos y nectarines son pericarpiales, de manera que existe la posibilidad de generar exportaciones a mercados en contra-estación. Es por eso que desde nuestro país se exportan grandes volúmenes de frutas a mercados tales como Estados Unidos, Asia y algunos países europeos. El transporte de las frutas se lleva a cabo por vía marítima y demora por lo menos 15 días en llegar a su destino en el hemisferio norte. Para evitar la sobremaduración y senescencia de la fruta, el transporte se realiza en contenedores refrigerados, de manera que la fruta se mantiene a 4 °C durante todo el trayecto. Esto trae problemas en la posterior maduración del fruto ya que experimenta un desorden fisiológico que se conoce genéricamente como “daño por frío”. La principal característica de este desorden fisiológico es la textura harinosa del fruto (Lill y col, 1989), la cual disminuye notablemente la calidad de la fruta y por ende existe un rechazo de parte del consumidor.

Con el objetivo de acumular información que permita explicar el proceso de la harinosidad, se ha desarrollado el proyecto de “Genómica funcional en Nectarines”. En este proyecto se generó información referente a los cambios en la expresión génica y acumulación de proteínas en 4 estadios de post-cosecha de frutos de *Prunus persica*: **E1**, frutos de “packing” o empaque (frutos de cosecha recién procesados. Estos frutos han sido expuestos al frío por un periodo corto de tiempo); **E2**, frutos salidos de empaque

más 4 días a 20 °C (frutos maduros y jugosos); E3, frutos salidos de empaque y almacenados por 21 días a 4 °C (empaque + 4 °C) y E4, frutos salidos de empaque, almacenados por 21 días a 4 °C más cuatro días a 20 °C (frutos maduros y harinosos). Este modelo experimental está diseñado de tal manera que permite identificar las diferencias en expresión génica y acumulación de proteínas en frutos de durazno expuestos o no a la cadena de frío de 21 días.

Desde el punto de vista de los cambios de expresión génica, se logró generar grandes cantidades de información por medio de macroarreglos de DNA y secuenciación de ESTs (Expressed Sequence Tags ó secuencias parciales de cDNA). Se observó que varios genes cambian sus niveles de expresión frente al tratamiento con frío, sin embargo, cabe preguntarse ¿Estarán algunos de estos genes respondiendo a un factor de transcripción en común? En el trabajo realizado en esta tesis se pretende indagar sobre esta pregunta.

El estrés por frío ha sido bastante estudiado en las plantas, ya que este causa pérdidas a nivel agronómico, así como también limita la distribución geográfica de ciertas especies vegetales. Se ha logrado dilucidar que existiría más de una vía por la que las plantas podrían responder ante un tratamiento de bajas temperaturas. Ejemplo de ello son mutantes de *Arabidopsis* como *esk1* y *sfr4* que son más y menos tolerantes al frío con respecto a plantas silvestres, respectivamente (McKown y col, 1996; Warren y col, 1996; Xin y Browse, 1998). En *Arabidopsis* también se han identificado factores de transcripción como HOS9 y ZAT12 que participan de manera independiente en la regulación de la expresión génica en respuesta al frío (Fowler y Thomashow, 2002; Zhu y col, 2004). De las vías identificadas, una que ha demostrado ser clave es aquella en la

que participa la familia de factores de transcripción DREB1/CBF (**DRE Binding Factor 1/CRT Binding Factor**). En *Arabidopsis thaliana* esta familia está compuesta de tres genes (CBF1/DREB1b, CBF2/DREB1c y CBF3/DREB1a), que se encuentran organizados en tándem en el cromosoma 4 (Gilmour y col, 1998; Medina y col, 1999). Estos tres genes aumentan rápidamente su expresión frente a las bajas temperaturas y sus transcritos se han observado en varios órganos, tales como hojas, tallos y raíces (Medina y col, 1999) Los tres miembros de la familia DREB1/CBF presentan una alta homología y codifican proteínas que poseen un dominio de unión a DNA tipo AP2 (Stockinger y col, 1997; Gilmour y col, 1998). Probablemente es por esta alta homología que la función de CBF1 CBF2 y CBF3 muestra ser redundante en plantas de *Arabidopsis* que los sobreexpresan (Gilmour y col, 2004).

Los factores de transcripción DREB1/CBF reconocen motivos **DRE/CRT** (**D**ehydration **R**esponsive **E**lement/**C**-Repeat) en el promotor de sus genes blanco. Estos se caracterizan por tener la secuencia CCGAC (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994; Baker y col, 1994; Stockinger y col, 1997; Figura 1). Ejemplos de genes blanco de DREB1/CBF son los genes **Cor** (**C**old regulated), que corresponden a un grupo de genes constituido principalmente por deshidrinas. Las deshidrinas son polipéptidos cuya función está asociada con la protección de membranas y proteínas frente al estrés hídrico (Thomashow, 1998; Thomashow, 1999)

Experimentos de sobreexpresión de CBF1 en *Arabidopsis* realizados por Jaglo-Ottosen y col (1998), demostraron que CBF1 inducía la expresión de algunos genes **Cor**, estos son: *Cor6.6*, *Cor15a*, *Cor47* y *Cor78*. Posteriormente con el advenimiento de técnicas que permiten analizar la expresión génica a gran escala como lo son los microarreglos de

DNA y AFLP, se logró determinar que el número de genes blanco de los CBFs es bastante amplio (Fowler y Thomashow, 2002; Gilmour y col, 2004; Maruyama y col, 2004; Vogel y col, 2005). En términos numéricos, se ha observado que el grupo de genes que responden al frío y a la sobreexpresión de alguno de los CBF corresponde a 131 genes (123 aumentan su expresión y 8 la disminuyen). A este grupo de genes se le conoce como el "regulón CBF".

Los genes del regulón CBF están involucrados en variadas funciones celulares tales como: el metabolismo de azúcares, lípidos y aminoácidos, así como también en procesamiento de proteínas, transcripción, metabolismo de pared celular, respuesta a estrés etc. (Fowler y Thomashow, 2002; Gilmour y col, 2004; Maruyama y col, 2004; Vogel y col, 2005;). En conjunto estos genes confieren la tolerancia a las bajas temperaturas en *Arabidopsis*. Sin embargo existen varios genes para los cuales se desconoce su contribución para lograr este objetivo.

La vía regulada por la familia DREB1/CBF resulta clave para la generación de una respuesta frente a las bajas temperaturas. En el caso de *Arabidopsis*, se ha observado que plantas que sobreexpresan alguno de los tres miembros de la familia, logran sobrevivir al tratamiento a temperaturas menores a 0 °C sin una aclimatación previa (la aclimatación es el proceso por el cual las plantas pueden tolerar temperaturas congelantes, luego de haber sido expuestas a temperaturas bajas pero no congelantes (Thomashow, 1999). Estas plantas transgénicas muestran un metaboloma que es similar al de plantas silvestres aclimatadas al frío, de manera que esto reafirma la importancia de estos factores de transcripción en la generación de una respuesta frente a este estrés abiótico (Gilmour y col, 2000).

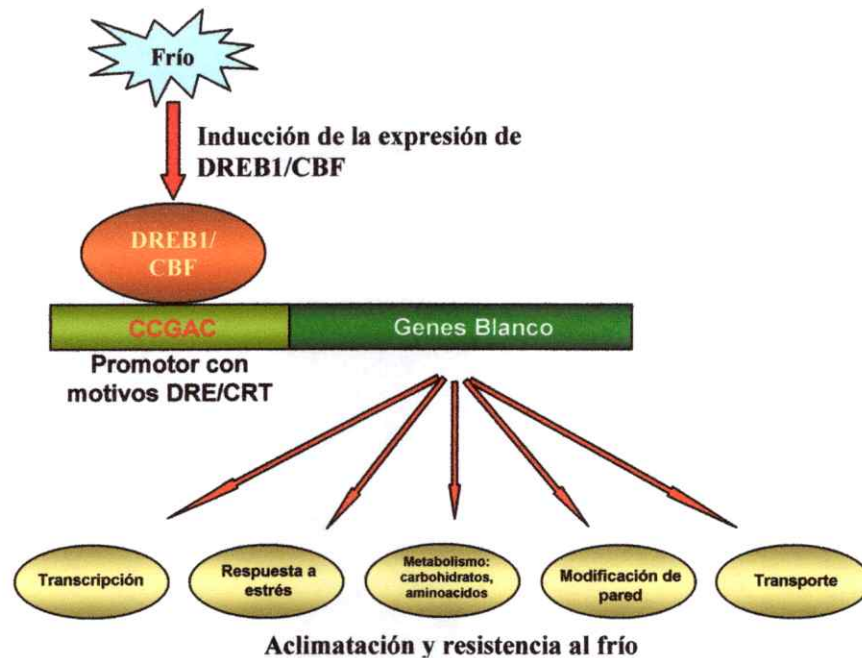


Figura 1: Representación esquemática de la regulación transcripcional ejercida por CBF. El factor de transcripción CBF aumenta rápidamente su nivel de transcrito en respuesta al frío. Una vez que se acumula CBF, es capaz de reconocer un motivo en *cis* en los promotores de sus genes blanco. Este motivo en *cis* es el que se denomina DRE/CRT y está constituido por una secuencia consenso de 5 bases (CCGAC). Los genes río abajo de CBF están involucrados en múltiples procesos celulares (algunos de ellos están indicados en óvalos amarillos) que en conjunto confieren a la planta la capacidad de responder al frío (Jaglo y col, 1998; Maruyama y col, 2004; Vogel y col, 2005).

La vía regulada por los CBFs ha sido descrita principalmente en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, se han encontrado ortólogos para este factor de transcripción en otras especies vegetales. Ejemplos de ellos son rábano, trigo, centeno (Jaglo y col, 2001), avena (Bräutigam y col, 2005), tomate (Zhang y col, 2004), arroz (Dubouzet y col, 2003) y eucalipto (Kayal y col, 2006). En todos estos casos se han observado ortólogos de la familia DREB1/CBF cuya expresión se induce con el frío. En el caso del Arroz se ha observado que la expresión de OsDREB1a (*Oryza sativa* DREB1a) en *Arabidopsis*, induce la expresión de genes del regulón CBF en plantas no

expuestas al frío y aumenta la tolerancia al frío (Dubouzet y col, 2003). De esta forma se logró determinar que el factor de transcripción de arroz es funcional en *Arabidopsis*. Además, existen evidencias de que plantas de arroz que sobreexpresan OsDREB1a, pueden tolerar las bajas temperaturas sin previa aclimatación (Ito y col, 2006). Resultados similares se han obtenido en plantas de rábano que sobreexpresan sus propios genes ortólogos de DREB1/CBF (Savitch y col, 2005).

Prunus persica (nectarin) es una planta que se puede aclimatar a las bajas temperaturas, y esta aclimatación se ha relacionado con la expresión de genes que presentan homología con proteínas de la familia de las deshidrinas (Arora y Wisniewski, 1994). En el regulón CBF que se ha descrito para *Arabidopsis*, existen genes que codifican para deshidrinas, como lo son *Cor15a*, *Cor78*, *Xero2* entre otros. Por otra parte, en un miembro de la familia de las Rosáceas como lo es el cerezo (*Prunus avium*), se ha descrito la existencia de un ortólogo de DREB1/CBF, que confiere resistencia al frío en plantas de *Arabidopsis* que lo expresan (Kitashiba y col, 2004). Surge entonces la pregunta. ¿Existirán en *Prunus persica* ortólogos de DREB1/CBF que regulen la expresión de genes que responden al frío? En este trabajo se pretende responder a esta interrogante, enfocándose principalmente en los cambios de expresión génica observada en frutos de *Prunus persica* expuestos a bajas temperaturas.

Búsquedas en las secuencias generadas dentro de nuestro proyecto, indican la existencia de posibles factores de transcripción DREB1/CBF. Además, el aislamiento y secuenciación del promotor de una posible deshidrina de durazno que aumenta su expresión en respuesta a frío (de acuerdo a los análisis de expresión digital), muestran la existencia de motivos de tipo DRE/CRT (Tittarelli y cols, no publicado). Estas

evidencias sugieren que una vía como la regulada por CBF podría estar conservada también en el fruto de durazno. Para evaluar esta hipótesis, en esta tesis se clonó un posible gen ortólogo de DREB1/CBF (*PpCbf*: *Prunus persica* CBF) y se expresó en *Arabidopsis*. Las plantas de *Arabidopsis* transformadas para expresar ectópicamente *PpCbf* mostraron una alta expresión de genes pertenecientes al regulón CBF comparadas con plantas silvestres. Por otra parte, se realizaron análisis de tipo bioinformático que permitieron identificar posibles genes ortólogos del regulón CBF de *Arabidopsis* en las secuencias de durazno generadas dentro del proyecto. Por medio de RT-qPCR se logró determinar que algunos de ellos responden al tratamiento con frío. Finalmente, se determinó que *PpCBF* es capaz de trans-activar a un promotor que posee motivos DRE/CRT, en ensayos de co-infiltración en frutos de durazno.

2.-HIPOTESIS

En frutos de *Prunus persica* existe un gen ortólogo de DREB1/CBF de *Arabidopsis thaliana*, que regula la expresión de genes que responden al frío.

3.-OBJETIVOS

3.1.- Objetivo General

Identificar un gen ortólogo de DREB1/CBF de *Arabidopsis thaliana* en frutos *Prunus persica* y analizar su funcionalidad en ambas especies.

3.2.- Objetivos específicos

- 1.- Identificación y análisis bioinformático de un posible gen que codifica un factor de transcripción DREB1/CBF en *Prunus persica* (PpCBF).
- 2.- Analizar la funcionalidad de PpCBF usando *Arabidopsis thaliana* como sistema heterólogo.
- 3.- Búsqueda de posibles genes ortólogos del regulón CBF en secuencias de unigenes de frutos de *Prunus persica*.
- 4.- Análisis de expresión de posibles genes ortólogos del regulón CBF mediante RT-qPCR.
- 5.- Determinar la funcionalidad del posible PpCBF sobre un promotor de *Prunus persica* con motivos DRE/CRT, mediante ensayos de trans-activación realizados en frutos de esta especie.

4.-MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- Generación de la base de datos de unigenes de frutos de *Prunus persica* utilizada en la presente tesis

En esta tesis se trabajó con secuencias de ESTs provenientes de 4 genotecas de cDNA, generados a partir de RNA proveniente de mesocarpo de frutos de *Prunus persica* de la variedad O'Henry. Estas genotecas corresponden a frutos de 4 estadios de postcosecha: E1, frutos de "packing" o empaque (frutos de cosecha recién procesados); E2, frutos salidos de empaque más 4 días a 20 °C (frutos maduros y jugosos); E3, frutos salidos de empaque y almacenados por 21 días a 4 °C (empaque + 4 °C) y E4, frutos salidos de empaque, almacenados por 21 días a 4 °C más cuatro días a 20 °C (frutos maduros y harinosos).

Para construir estas genotecas, en nuestro laboratorio se extrajo RNA de 10 frutos de cada estadio (Meisel y col., 2005) y se generó pooles de RNA para cada uno de ellos, mezclando cantidades equivalentes de RNA de cada fruto. El aislamiento del mRNA, la construcción de las genotecas y la secuenciación de los ESTs, fueron realizados por la empresa Agencourt Bioscience Corporation (www.agencourt.com; USA).

Las secuencias obtenidas fueron procesadas de manera que se eliminó aquellas de mala calidad y se enmascaró y eliminó secuencias provenientes del vector donde están clonadas. Con esto se obtuvo un total de 45.519 ESTs de buena calidad de al menos 100 pb (valor Phred Q > 20; Ewing y Green, 1998). Para determinar si algunas de estas secuencias pertenecen a un mismo gen, se llevó a cabo un agrupamiento de estas usando el programa de ensamble de secuencias CAP3 con los parámetros 95/60, es decir, 95 % de identidad y un mínimo de 60 pb de alineamiento. Como resultado se obtuvo un total

de 4.169 contigs los cuales están constituidos por 38.858 ESTs. El resto de ESTs que no ensamblaron con ninguna otra secuencia se denominan singletons y corresponden a 6.661 ESTs. Sumando el número de contigs y singletons tenemos un total de 10.830 unigenes (ó genes únicos). El procesamiento de secuencias fue trabajo realizado por la unidad de bioinformática existente dentro del proyecto de Genómica Funcional en Nectarines.

Los análisis de expresión digital basados en la abundancia de ESTs que componen a cada contig, se realizó con el método descrito por Audic y Claverie (1997). Este trabajo fue realizado por Andrés Tittarelli en el desarrollo de su tesis de pregrado (Tittarelli y col, no publicado). En el presente trabajo se utilizó esta información para observar el perfil de expresión de los unigenes que resultaron de interés.

4.2 Identificación y análisis de secuencia de PpCBF

Usando la base de datos de unigenes disponible dentro del proyecto de Genómica Funcional en Nectarines, se hizo una búsqueda de posibles ortólogos de CBF1, CBF2 y CBF3 mediante tBlastN. La predicción del marco de lectura abierto (ORF) dentro del unigen que representa el posible gen ortólogo de CBF en *Prunus persica*, se realizó con herramientas disponibles en el servidor de proteómica EXPASY (www.expasy.org). La predicción de secuencia aminoácidica y estructuras secundarias dentro de ella se realizó con herramientas disponibles en el servidor ya mencionado. El posible ortólogo identificado, fue alineado con la familia DREB1/CBF de Arabidopsis y con ortólogos de otras especies vegetales usando ClustalX.

4.3.-Clonamiento de PpCBF en vector para expresión en plantas

4.3.1.-Clonamiento de PpCBF en el vector pENTR™/D-TOPO

El PpCBF se clonó usando el sistema “pENTR™ Directional TOPO Cloning” (Invitrogen, N° de cat. 45-0219). Los partidores usados para amplificar el marco de lectura abierto de PpCBF fueron F-LM228 (5' CACCATggACATgTTCTCCgCTCAGCT 3') y R-LM229 (5' TCAGATAgAgAAACTCCATAATTTggCATC 3'). La secuencia CACC destacada en el partidor F-LM228 es requerida por el sistema de clonamiento utilizado. El amplificado que tiene un tamaño de 693 pb fue obtenido en una reacción con los siguientes componentes: Tampón de reacción, MgSO₄ 2 mM, dNTPs 0,2 mM, 0,25 mM de cada partidor, 0,75 U de *PfuTurbo*® y como templado se usó una dilución 1:500 de un vector pDNR-1r que tiene clonado el cDNA de PpCBF (El vector fue obtenido de una genoteca de cDNA generada en el Proyecto de Genómica Funcional en Nectarines). Las condiciones de la reacción de PCR fueron una denaturación inicial de 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 58 °C por 30 s y 72 °C por 2 min, con una extensión final de 10 min a 72 °C.

El producto de PCR se mezcló con el vector pENTR en proporción aproximada de 3:1, esto se dejó incubar durante 30 min a temperatura ambiente y luego se transformó *E. coli* como se describe en la sección 4.3.2.

4.3.2.-Transformación de *E. coli* de alta competencia con el constructo pENTR-PpCBF

Para transformar se usaron "One Shot[®] Competent *E. coli*" (Invitrogen) que corresponden a cepas DH5 α que presentan una alta competencia. Se tomó 2 μ l de la mezcla de amplicón PpCBF con vector pENTR descrita en la sección 4.3.1, y se depositó en un tubo con 100 μ l de células competentes. La transformación se llevó cabo como se describe en el manual de usuario del kit "pENTR[™] Directional TOPO Cloning". La selección fue realizada en placas con medio LB sólido suplementado con kanamicina. Aquellas colonias que lograron crecer fueron inoculadas en medio LB líquido con kanamicina y se les aisló el vector por medio de una minipreparación de DNA plasmidial (sección 4.12). Los vectores aislados fueron chequeados por digestión con las enzimas EcoRV y HindIII de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los clones positivos fueron denominados pENTR-PpCBF y uno de ellos fue confirmado por secuenciación.

4.3.3.- Recombinación entre los vectores pENTR-PpCBF y pGWB2: sistema Gateway.

La recombinación entre el vector de entrada pENTR-PpCBF y el vector de destinación pGWB2 se realizó con la enzima LR clonasa de Invitrogen (Gateway @LR clonase[™] enzyme mix. N° de catalogo 11791-019). El vector de destinación pGWB2 corresponde a un vector binario que permite la expresión ectópica del gen clonado, debido a que este queda fusionado río abajo del promotor CaMV35S (Este vector fue donado por el Dr. T.

Nakagawa de la Universidad de Shimane, Japón). La recombinación y posterior transformación de *E.coli* se llevó a cabo siguiendo el procedimiento sugerido por el fabricante. La selección de bacterias transformantes se realizó en placas de medio LB con higromicina (50 µg/ml) y kanamicina (100 µg/ml). Para buscar las transformantes que tienen el vector pGWB2-PpCBF se realizaron minipreparaciones de DNA (sección 4.12) y digestiones con la enzima HindIII.

4.3.4.- Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con el vector pGWB2-PpCBF

Se mezclaron 10 µl DNA plasmidial obtenido por medio de una Midiprep (sección 4.13) con 100 µl de células competentes de la cepa GV3101 previamente descongeladas en hielo. La mezcla se congeló en nitrógeno líquido durante 5 minutos, luego de lo cual fue incubada durante 25 min a 37 °C. Pasado este tiempo se agregó medio LB suplementado con gentamicina (100 µg/ml) y rifampicina (10 µg/ml) (para la selección de la cepa bacteriana) y se dejó crecer la bacteria durante 3 h a 28 °C. Luego se sedimentó las bacterias por centrifugación y se plaquearon en medio LB sólido suplementado con los antibióticos para selección de cepa además de kanamicina (100 µg/ml) para selección del vector. Las bacterias se dejaron crecer durante 2 días a 28 °C, que corresponde al tiempo suficiente para que las colonias se hicieran visibles a simple vista.

4.4.- Transformación de *Arabidopsis thaliana* por el método de floral dip

El método de floral dip descrito por Clogh y Bent (1998), se aplicó de la manera siguiente: Se crecieron bacterias de *A. tumefaciens* de la cepa GV3101 transformadas con el vector pGWB2-PpCBF hasta una densidad óptica entre 0,6 y 0,8. Estas bacterias fueron sedimentadas por centrifugación durante 10 min a 4.000 g y luego resuspendidas en el medio de infiltración (sacarosa 5 %, Silwett L-77 0,05 %) en un volumen equivalente al que fueron crecidas. El tejido aéreo de plantas de *Arabidopsis* crecidas durante 6 semanas (presentaban un número bajo de silicuas) fue sumergido en esta resuspensión durante 6-10 s, luego de lo cual estas plantas fueron depositadas de manera horizontal en bandejas, las cuales se mantuvieron en oscuridad por toda la noche. Pasado este periodo, las plantas se pusieron en orientación vertical y se dejaron en una cámara de cultivo hasta la obtención de silicuas maduras y secas.

4.5.- Selección de *Arabidopsis* transgénicas

Las semillas de las plantas transformadas se esterilizaron y fueron sembradas en placas de medio MS suplementado con kanamicina (100 µg/mL; sección 4.11.2). Al cabo de una semana se analizó aquellas plantas que son capaces de crecer en el medio de selección, que se evidencian por la coloración verde de sus hojas. Se hizo un conteo de las plantas resistentes a kanamicina y con eso se determinó la eficiencia de transformación de la siguiente manera:

$$\text{Eficiencia de transformación} = (\text{Plantas resistentes}/\text{total de semillas sembradas}) * 100$$

(ecuación 1)

Luego de tres semanas de crecimiento en las placas, las plantas se traspasaron a tierra y se dejaron crecer hasta la obtención de silicuas maduras y secas.

4.6.- Análisis de expresión de genes del regulón CBF en plantas de *Arabidopsis* que expresan PpCBF, con la técnica de RT-PCR

4.6.1.- Extracción de RNA total desde hojas de *Arabidopsis thaliana* que expresan PpCBF y silvestres

Se homogenizó aproximadamente 70 mg de hojas de roseta de *Arabidopsis* silvestres y *Arabidopsis* que expresan ectópicamente PpCBF en nitrógeno líquido para asegurar que el tejido se encuentre congelado.

Al tejido completamente pulverizado se le agregó 1 ml de reactivo Trizol^{MR}, y esta mezcla se agitó usando Pellet Pestle^{MR} con un motor. Luego de incubar durante 5 min a temperatura ambiente (TA) se agregó 200 µl de cloroformo, se agitó e incubó por otros 3 minutos a TA. La mezcla se centrifugó a 11.500 g por 15 min a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se mezcló con 500 µl de isopropanol. Posterior a una incubación por 5 min a TA se centrifugó tal como en el paso anterior. El pellet fue lavado con etanol 75 % (preparado con agua-DEPC) secado y finalmente resuspendido en agua libre de nucleasas. Se guardó a -80 °C hasta el momento de su uso (Protocolo adaptado de Gibco BRL).

4.6.2.- Reacciones de transcripción reversa para los RNAs de *Arabidopsis*

Las reacciones de transcripción reversa se llevaron a cabo usando el sistema "ImProm-IITM Reverse Transcription System" de Promega (N° cat. A3802). Para cada reacción se

usó 1,5 µg de RNA total en un volumen de reacción de 20 µl. Esta mezcla de reacción está constituida de la manera siguiente: 1,5 µg de RNA total; 0,5 pg de mRNA control de kanamicina; Oligo (dT) 25 ng/µl; tampón ImProm-II™ 1X; MgCl₂ 5 mM; dNTPs 0,5 mM; 20 U de Inhibidor de ribonucleasa recombinante RNasin® y 1,0 µl de Transcriptasa Reversa ImPromII™. Paralelamente se realizaron reacciones donde están todos los componentes de la mezcla a excepción de la Transcriptasa Reversa. Se hicieron triplicados biológicos para las plantas silvestres y transgénicas. La reacción se llevó a cabo en un termociclador, usando un programa en el cual se incubaba a 25 °C durante 5 min para permitir el alineamiento de los partidores Oligo-dT, seguido de una incubación a 42 °C por 4 horas para permitir la extensión de la hebra de cDNA, para finalmente incubarse a 70 °C durante 15 minutos para inactivar la enzima.

La calidad de la reacción se confirmó con un PCR en que se amplificó el control de kanamicina con los partidores Kan-F (5' gCCATTCTCACCggATTCAGTCgT 3') y Kan-R (5' AgCCgCCgTCCCgTCAAgTCAG 3').

4.6.3.- Análisis de expresión de genes del regulón CBF en plantas de Arabidopsis que expresan ectópicamente PpCBF mediante RT-PCR

Como templado para la reacción de PCR se usó una dilución 1:100 de los cDNA obtenidos en la sección anterior. Para amplificar un segmento de *PpCbf* se usaron los partidores F-LM228 (5' CACCATggACATgTTCTCCgCTCAGCT 3') y R-LM229 (5' TCAGATAgAgAAACTCCATAATTTggCATC 3') los que dan un amplificado esperado de 693 pb. Para *Wcor414* los partidores son F-LM241 (5'

TCTgTTATgCTgCTCCgATTTC 3') y R-LM242 (5' CCCCTTCTTgCTTCCCTCTTAT 3') que amplifican un fragmento esperado de 309 pb. *Cor78* se amplificó con F-LM243 (5' CTggCgAAgggAAgACCTggAT 3') y R-LM244 (5' ggTAACTTCgTCgTCACggCAG 3') obteniendo un amplificado esperado de 380 pb. Para el caso de galactinol sintasa se usaron los partidores F-LM245 (5' CCAAgCCTCCCCACTTATTAC 3') y R-LM246 (5' AAgAgACTCgTCgTTGTAAATg 3') que amplifican un fragmento esperado de 312 pb. *Xero2* se analizó con los partidores F-LM329 (5' TCACCAGaATCAAACCggAgTg 3') y R-LM330 (5' CCATAAgCCgTgTTAgTCCCAG 3') que amplifican un fragmento esperado de 384 pb. Los partidores para actina fueron Actin-F (5' CACACTTTCTACAATgAgCT 3') y Actin-R (5' gCAGTgATCTCTTTgCTCAT 3') los cuales dan un amplificado esperado de 693 pb.

La mezcla de reacción está constituida de la manera siguiente: 1X de tampón de reacción, MgCl₂ 1 mM, dNTPs 0,2 mM, 0,25 mM de cada partidador, Taq DNA polimerasa y 2 µl de templado. Las condiciones para la reacción incluyeron una denaturación inicial de 5 min 94 °C, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 1 min. Se hizo una extensión final de 10 min a 72 °C.

4.7.- Identificación de posibles genes ortólogos del regulón CBF en *Prunus persica*

La secuencia aminoácídica de genes del regulón CBF de *Arabidopsis* se obtuvo a partir de la base de datos TAIR (www.arabidopsis.org). Esta secuencia se utilizó para llevar a cabo una búsqueda de posibles genes ortólogos en las bases de datos de secuencias de *Prunus persica* generadas dentro del proyecto en que se enmarca esta tesis. La búsqueda

se realizó utilizando el programa tBlastN, teniendo en consideración que un nivel significativo de similitud esta determinado por un E-value de 10^{-7} . La secuencia de los posibles ortólogos obtenidos fue utilizada para correr un BlastX contra las bases de datos de proteínas (AGI proteins) de Arabidopsis usando la página de TAIR. Esta metodología que considera un "blast bidireccional", tiene como objetivo determinar que el mejor hit en una dirección, se corresponde con el mejor hit en la dirección opuesta. Para los posibles ortólogos obtenidos, se analizó el perfil de expresión digital con el objetivo de observar su expresión frente al tratamiento con bajas temperaturas (genotecas E1 y E3).

4.8.- Análisis de expresión de posibles genes ortólogos del regulón CBF, con el método de transcripción reversa acoplado PCR en Tiempo Real (RT-qPCR)

4.8.1.- Extracción de RNA total de frutos de durazno

La extracción de RNA total a partir de frutos de durazno se llevó a cabo utilizando el método descrito por Meisel y col (2005). Distintas muestras congeladas de frutos provenientes de los 4 estadios de postcosecha fueron molidas en presencia de nitrógeno líquido, usando un mortero previamente esterilizado (en horno durante 3 horas a 180 °C) y enfriado. El polvo generado a partir de las muestras fue depositado en un tubo que contenía **tampón de extracción** (CTAB 2 % (p/v), PVP (PM 40.000) 2 % (p/v), Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM, EDTA 25 mM, NaCl 2 M, espermidina trihidrocloruro 0,05 %, β -mercaptoetanol 2 % (se agregó justo antes de depositar el polvo)) previamente calentado a 65 °C. La mezcla generada se mantuvo durante 15 min a 65 °C, luego de lo cual se hizo una extracción con igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). La fase acuosa fue recuperada luego de que se hiciera una centrifugación a 12.000 g

durante 30 min de la mezcla de extracción. Sobre esta fase acuosa se llevó a cabo una nueva extracción tal como la anteriormente descrita, y la nueva fase acuosa recuperada fue mezclada con 0,25 volúmenes de LiCl, mantenida a 4 °C durante toda la noche y posteriormente centrifugada a 12.000 g durante 20 min para lograr la precipitación del RNA. Luego de eliminado el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 500 µl de SSTE (NaCl 1 M, SDS 0,5 %, Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM (pH 8,0)) y fue transferido a un tubo de microcentrifuga. La muestra fue sometida a una extracción con igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico, en la cual la fase acuosa se recuperó luego de centrifugar a 14.000 g por 10 min a 4 °C. Para precipitar el RNA, éste se mezcló con 2 volúmenes de etanol 100 % y se incubó durante 3 horas a -80 °C, luego de lo cual se centrifugó a 14.000 g por 20 min a 4 °C. El pellet fue lavado con etanol 75 % y secado a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió en agua libre de nucleasas y se guardó a -80 °C hasta el momento de su uso. Todas las soluciones utilizadas se prepararon con agua tratada con DEPC.

4.8.2.- Cuantificación y análisis de calidad de RNA total de frutos de durazno y Arabidopsis

La concentración de RNA total se midió en base a la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer, MBA 2000). Las muestras de RNA fueron diluidas 100 veces en agua libre de nucleasas y la concentración se calculó de acuerdo a la siguiente expresión.

$$\text{ssRNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times 4 \text{ (ecuación 2)}$$

La pureza del RNA se determinó haciendo una relación A_{260}/A_{280} que debe estar entre 1,8-2,0, para asegurar que no existe contaminación con DNA. La integridad del RNA total se analizó con un gel 1,5 % de agarosa, el cual fue preparado con MOPS 1X, y formaldehído 1,1 %. La muestra de RNA se mezcló con formamida, formaldehído y MOPS y se denaturó a 70 °C durante 10 min. Previo a cargar la muestra en el gel se agregó el colorante (azul de bromofenol (1 %): Bromuro de etidio (1 mg/ml) 1:1). El gel se corrió en una cámara con MOPS 1X, con una diferencia de potencial de 150 V durante 30 min. La visualización se llevó a cabo con luz UV. En el caso del durazno la integridad del RNA se determinó por la presencia de las bandas de rRNA de 28S y 18S. Para Arabidopsis se visualizó las bandas de rRNA 26S, 18S y 7S.

4.8.3.- Reacciones de transcripción reversa (RT) para los RNAs de durazno

Las reacciones de transcripción reversa se llevaron a cabo usando el sistema "ImProm-IITM Reverse Transcription System" de Promega (N° cat. A3802). Para cada reacción se usó 2,5 µg de RNA total provenientes de los estadios E1, E2, E3 y E4 en un volumen de reacción de 20 µl. Las condiciones para la reacción fueron las mismas que en la sección 4.6.2. Se hizo triplicado biológico para cada uno de los estadios analizados.

4.8.4.-Análisis cuantitativo de expresión génica mediante reacción de PCR en Tiempo Real

Las reacciones se llevaron a cabo usando el sistema "LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I" de Roche (N° cat. 12 239 264 001). Se usó un volumen total de

reacción de 15 µl que contiene 50 a 200 ng de templado de cDNA (dependiendo del gen a amplificar) de los estadios E1, E2, E3 y E4, MgCl₂ 3 mM, 0,3 mM de cada partidor, dNTPs, tampón de reacción, SYBR Green I y FastStart Taq DNA polimerasa (los cuatro últimos componentes están incluidos en una mezcla, que se usó de acuerdo a lo indicado por el fabricante). Los partidores usados para amplificar un segmento del gen *PpCbf* fueron F-LM231 (5' AAgTgggTATgTgAgTTgAgAg 3') y R-LM232 (5' gCTgAgCATTgAggTggAgA 3') que dan un amplificado esperado de 416 pb. Para *PmeI* los partidores fueron F-LM233 (5' CTACgCCACTTCAATCCAgCA 3') y R-LM234 (5' CAgTgAAAgCagCACTAACCC 3') que amplifican un fragmento esperado de 290 pb. Para *Wcor413* se usó el par de partidores F-LM237 (5' TTCAACATCTTCaggggACA 3') y R-LM238 (5' CACCAATgCCCAAACAgg 3') que amplifican un fragmento esperado de 327 pb. Para la deshidrina *Xero2* se usó F-DX2 (5' CCAAACCAAAGCCAgTTTgATTCA 3') y R-DX2 (5' CCaggTTTTgTATgAgTgCCgTA 3') que generan un fragmento esperado de 259 pb. Para la kanamicina los partidores fueron Kan-F (5' gCCATTCTCACCggATTcAgTCgT 3') y Kan-R (5' AgCCgCCgTCCCgTCAAgtCAg 3') los que dan un amplificado esperado de 323 pb. La condiciones para la reacción fueron: 95 °C durante 10 min para activar la enzima, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 2 s, 62 °C (para el caso de *PpCbf*, *Wcor413*, *Xero2* y kanamicina) ó 64 °C (para *PmeI*) por 10 s y 72 °C por 20 s. Al final de cada ciclo se midió la señal de fluorescencia que emite el SYBR Green cuando se intercala en una doble hebra de DNA amplificado, utilizando el canal F1 (530 nm) para realizar dicha medición. Una vez terminado los 35 ciclos se procedió a un paso adicional que denatura los amplificados subiendo paulatinamente la temperatura desde 62 °C (*PpCbf*, *Wcor413*,

Xero2 y Kanamicina) ó 64 °C (*PmeI*) hasta 98 °C. En este paso adicional se midió de manera continua la fluorescencia del SYBR Green, para construir una curva de melting que permitió determinar si el producto amplificado corresponde al esperado.

Para cada gen en cuestión se construyó una curva estándar, usando como templado diluciones seriadas de 100 pg a 10 fg de un amplicón purificado para cada gen analizado. Las condiciones de reacción son las mismas que para las reacciones con cDNA. Con esta curva estándar fue posible determinar la concentración de templado de cada gen en los distintos estadios de postcosecha, usando el "Light Cycler Software" versión 3.5. Las concentraciones obtenidas fueron normalizadas con la concentración obtenida para el cDNA de kanamicina y luego graficados.

4.9.- Ensayos de transformación transiente en distintas variedades de frutos de durazno

Se hicieron cultivos de *A. tumefaciens* transformados con los vectores de pGWB2-PpCBF, pBI101.3-DX2=GUS, pBI101.3 y pBI121, en medio LB suplementado con kanamicina (100 µg/ml), rifampicina (10 µg/ml) y gentamicina (100 µg/ml). Los cultivos crecieron durante aproximadamente 2 días a 28 °C hasta alcanzar un densidad óptica entre 0,6 y 0,8. Las bacterias se sedimentaron y fueron resuspendidas en medio MMA (MS, MES 10 mM (pH 5,6), sacarosa 20 g/l, acetosiringona 200 µM) de tal manera de obtener una densidad óptica de 2,4 aproximadamente. Esta suspensión bacteriana se usó para inyectar frutos frescos de duraznos de las variedades Autumn Red, O' Henry y Rian Sun, haciendo uso de una jeringa de 1 ml con aguja. Para co-infiltración de cultivos bacterianos transformados con distintos vectores, se mezclaron volúmenes iguales de

cada uno y 1 mL de esta suspensión se utilizó para inyectar los frutos. La actividad de GUS se observó luego de 3 días, durante los cuales los frutos fueron mantenidos a 25 °C.

4.10.- Tinción histoquímica de GUS para frutos infiltrados de durazno

Se obtuvieron trozos infiltrados de durazno, haciendo uso de un sacabocados de aproximadamente 1 cm. de diámetro. Los trozos fueron completamente sumergidos en la solución que permite observar la actividad de GUS (K_2HPO_4 0,72 M, KH_2PO_4 0,17 M, $K_3Fe(CN)_6$ 0,5 mM, $K_4Fe(CN)_6$ 0,5 mM, 1X Triton X-100, EDTA 12,7 mM, metanol 20 % (v/v), X-Gluc 0,5 mM (este se agrega al momento de usar)). La preparación fue sometida a vacío durante 30 min, luego de lo cual se incubó a 37 °C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo de incubación se observaron los tejidos y se hizo registro fotográfico de ellos.

4.11.- Material Biológico

4.11.1.- Crecimiento de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo columbia (Col-0) y líneas transgénicas fueron esterilizadas (Un lavado con etanol 70 %, seguido de un lavado con cloro y finalmente 3 lavados con agua estéril) y posteriormente incubadas a 4 °C en oscuridad por un periodo de 2-4 días. Las semillas fueron germinadas y crecidas por aproximadamente 2 semanas en placas con medio MS sólido 0,5X (2,16 g MS/l de medio) suplementado con kanamicina (100 µg/ml) en el caso de las transgénicas. Pasado

este periodo, las plantas fueron trasplantadas a una mezcla de tierra:vermiculita 3:2 y fueron crecidas a una temperatura de 22-23 °C con un fotoperiodo 16:8 (luz: oscuridad).

4.11.2.- Crecimiento de bacterias *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*

Las bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α fueron crecidas en medio LB líquido (peptona 1 %, NaCl 1 % y extracto de levadura 0,5 %) y sólido (a la mezcla anterior se le agrega 1,5 % de agar) durante 14-16 h a una temperatura de 37 °C, con una agitación de 250 rpm en el caso del cultivo líquido. *A. tumefaciens*, de la cepa GV3101, fue crecida en los mismos medios antes mencionados, durante 36 h a una temperatura de 28 °C. En el caso de *E. coli* los antibióticos de selección fueron kanamicina (100 μ g/ml) e higromicina (50 μ g/ml) (El primero para bacterias transformadas con pENTR-PpCFB y ambos para bacterias transformadas con pGWB2-PpCBF). Para *A. tumefaciens* se usó gentamicina (100 μ g/ml) además de los antibióticos antes señalados, para seleccionar bacterias transformadas con pGWB2-PpCBF.

4.12.- Minipreparaciones de DNA plasmidial para el chequeo de bacterias transformantes.

Cultivos de 1 ml de *E. coli* fueron crecidos en medio LB con kanamicina durante toda la noche en tubos de microcentrifuga estériles en las condiciones que se indica en la sección 4.11.2. El cultivo se centrifugó 20 s a 14.000 rpm en microcentrifuga, luego de lo cual se vació el sobrenadante y las bacterias fueron resuspendidas en el volumen de medio remanente (aproximadamente 50 μ l). Se agregó 300 μ l de TENS (Tris 10 mM

(pH 7,5), EDTA 1 mM (pH 8,0), NaOH 0,1 N y SDS 0,5 % (p/v)) para efectuar una lisis alcalina de las células bacterianas. Esta mezcla se agitó y se agregó 150 µl de KAc 3 M (pH 5,2) para precipitar los desechos celulares y el DNA cromosómico. Luego de una fuerte agitación se precipita los desechos por una centrifugación de 2 min a 14.000 rpm. El sobrenadante se traspasó a un tubo limpio y se mezcló con 800 µl de etanol 100 %, luego de lo cual se centrifugó 2 min a 14.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y fue lavado con 1 ml de etanol 80 % frío. El DNA fue resuspendido en agua con RNAsa (1 µg/ml) y guardado a -20 °C hasta ser usado (Modificado de Zhou y col, 1990).

4.13.- Midipreps de DNA plasmidial

Cultivos de 100-150 ml de *E. coli* transformadas con el vector pGWB2-PpCBF fueron crecidos en medio LB suplementado con higromicina (50 µg/ml) y kanamicina (100 µg/ml). La extracción de DNA plasmidial se llevó a cabo de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Wizard® Plus Midipreps, N° de catálogo A7640. Promega)

4.14.- Electroforesis en geles de agarosa para análisis de DNA

Se prepararon geles de agarosa 1 % (p/v) con tampón de corrida TAE 1X (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1mM (pH 8,0)) con bromuro de etidio (0,1 mg/ml). El marcador de peso molecular utilizado corresponde a "1kb DNA Ruler" (Fermentas). Para ser cargadas, las muestras de DNA se mezclaron con la cantidad adecuada de tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0,25 %, xilen cianol 0,25 % y glicerol 30 %). La corrida se realizó con tampón TAE 1X, aplicando una diferencia de potencial de 100 V durante 30 a 40 min.

5.- RESULTADOS

5.1.- Identificación de posibles ortólogos de la familia DREB1/CBF en *Prunus persica*

Dentro de los 10.830 unigenes generados a partir del proyecto de Genómica Funcional en Nectarines en el cual se desarrolló esta tesis, se encontró un contig (contig851) constituido por 7 ESTs que codifica para un posible factor de transcripción CBF. A este posible gen ortólogo se le denominó *PpCbf* (*Prunus persica* CBF). El largo del contig851 es de 860 pb de las cuales 693 pb corresponden al marco de lectura abierto completo para la posible proteína (Figura 2).

La secuencia predicha tiene un largo de 230 aminoácidos, un peso molecular de 21.6 kDa y un punto isoelectrico de 6,18 (www.expasy.org). El análisis bioinformático de estructuras secundarias, muestra que hay tres posibles sábanas β (aminoácidos 65-67, 73-75, 84-87) y una hélice α (aminoácidos 94-109) (Figura 2).

La comparación de esta secuencia con las de la familia DREB1/CBF de *Arabidopsis* y ortólogos de otras plantas (*Prunus avium*, *Malus domestica*, *Oryza sativa* y *Brassica napus*), evidencia la conservación de algunos motivos que son característicos de este tipo de factores de transcripción (Figura 3; Tabla1). Estos motivos corresponden a las secuencias **ETRHP** y **DSAWRL** que flanquean a un dominio de unión a DNA AP2 por el amino y carboxilo terminal respectivamente (Stockinger y col, 1997; Dobuzet y col, 2003; Kitashiba y col, 2004; Zhang y col, 2004). La extensión del dominio AP2 de *PpCBF* es desde el aminoácido 60 hasta el 117, de manera que las putativas estructuras secundarias antes enunciadas se encuentran dentro de dicho dominio.


```

1 atggacatggtctcctcagcttctgactccccgaccagcct
  M D M F S A Q L S D S P D Q P
46 gaggcaggtcttctcgcagcgcagcgtcacccacctgcggca
  E S S S F S D A S V T T L P A
91 tctctcctcgcagcgaacgtcatatggcgtcagccggcgaag
  S S S D E N V I L A S S R P K
136 aagcgcctgggaggagggtttcaaggagacgagcaccgggt
  K R A G R R V F K E T R H P V
181 tacaggcgtgaggagaaagaacaacacagtggtatgtgag
  Y R G V R R R N N N K W V C R
226 ttgagagaacccaacaacaagaagtcaaggatggccttggacg
  L S E P N N K K S R I W L G T
271 tacccgacggctgagatggctgctcctcccacagcgtggcgca
  Y P T A E N A A R A H D V A A
316 ttggcctcagagggagcttgctgcataaaccttggcagctcc
  L A F R G K L A C I N F A D S
361 gcatggcggctgccttggcggctccatggacacatggatatt
  A W R L P L P A S M D T M D I
406 cgaaggcagcggctgagcgcggaaagggtcaggcctggcggag
  R R A A A E A A E G F R P A E
451 ttcggtggatcagcggcagcagtgatgagaaggagatgat
  F G C L S S G S S D E K E M N
496 ttaagcgtggatggaaaaaacagcagcttgctctgtttat
  L S V D M E K N S S L C L F Y
541 ttggatgaggagaaatggtgatgccaagggtgattgataac
  L D E E E M F D M P R L I D N
586 atggctcaagggtcttctctctccacctcaatgctcagctggc
  H A Q G L L L S P P Q C S A G
631 tacttgaattggatgacgtggaactgagcgtgatgccaatta
  Y L N W D D V E T R A D A K L
676 tggagtttctctatctga 693
  W S F S I *

```

Figura 2: El posible ortólogo de CBF en *Prunus persica*, codifica una proteína de 230 aminoácidos. Dentro de la base de datos de unigenes generados en el proyecto que en que se enmarca esta tesis, se encontró un Contig constituido por 7 ESTs que codifica una secuencia de 230 aminoácidos. La predicción bioinformática para esta secuencia indica que se trata de una proteína con una masa molecular de 21.6 kDa (www.expasy.org). Los aminoácidos que se encuentran enmarcados dentro de una flecha indica que podrían formar una sábana β , mientras que para los aminoácidos dentro de la cinta se predice una estructura de hélice α (www.expasy.org).

El análisis de expresión de *PpCbf* usando RT-qPCR indica que este gen se expresa preferentemente en frutos no maduros que están saliendo de tratamientos de frío (estadios E1 y E3; Figura 4). La mayor expresión se observa en muestras expuestas a frío por periodos cortos de tiempo (E1), siendo significativamente menor (t-student; $p < 0.05$), cuando el tratamiento de frío es de mayor duración (E3) y prácticamente indetectable en frutos maduros que han sido expuestos a 20 °C durante 4 días (E2 y E4).

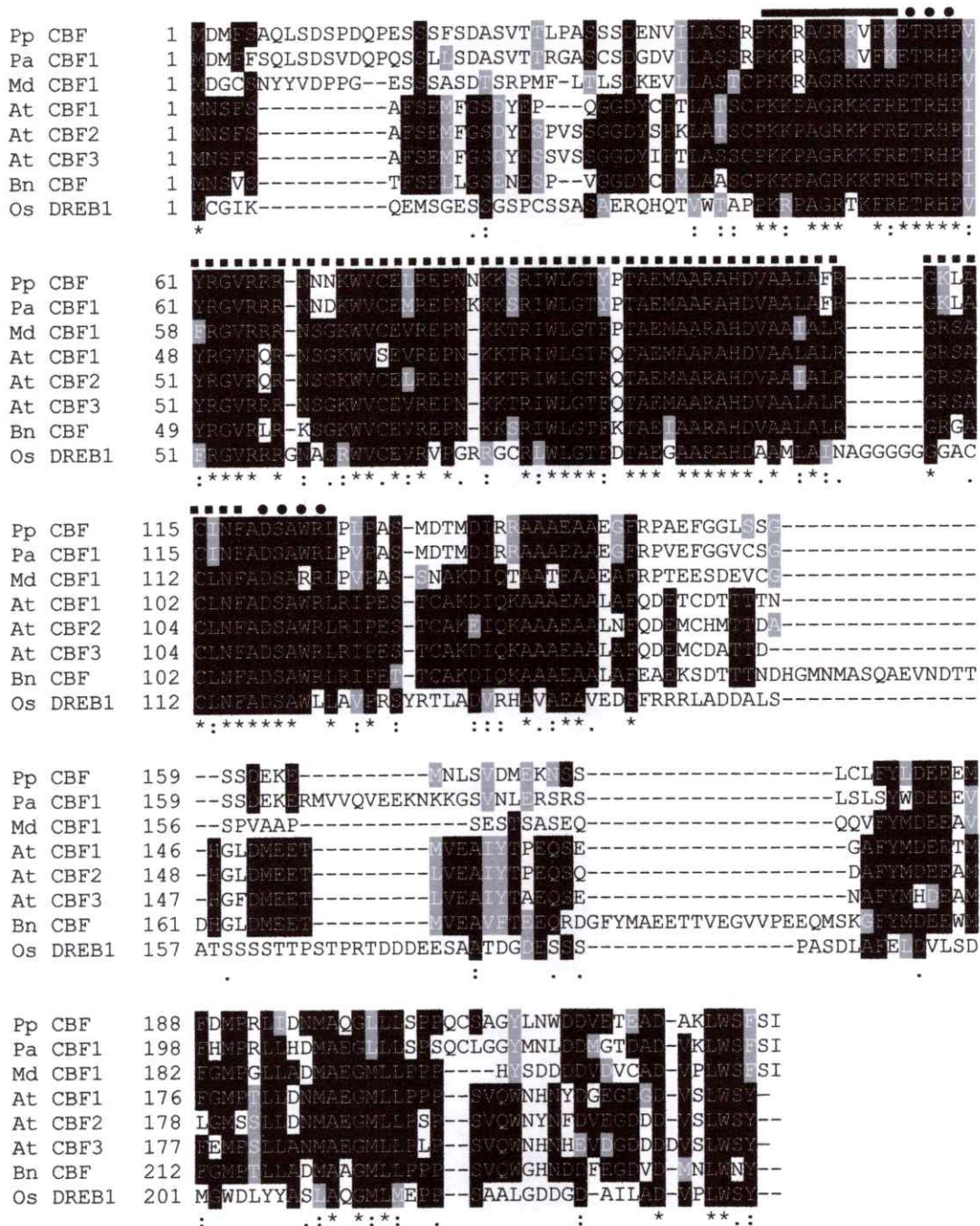


Figura 3: PpCBF presenta motivos que están conservados en ortólogos de otras especies vegetales. El alineamiento de CBF de *Prunus persica* (Pp) con la familia CBF de *Arabidopsis thaliana* (At) (CBF1, 2 y 3), CBF1 de *Malus domestica* (Md), CBF1 de *Prunus avium* (Pa), OsDREB1 de *Oryza Sativa* y CBF1 de *Brassica napus* (Bn), muestra 3 regiones altamente conservadas entre estas secuencias: Una putativa señal de destinación al núcleo (línea continua), el dominio AP2 de unión a DNA (puntos cuadrados) y el “CBF signature” característico de este tipo de factores de transcripción (puntos circulares). El alineamiento se realizó con el algoritmo ClustalX y la visualización de este con http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html.

Tabla1: Identidad entre PpCBF y genes ortólogos de otras especies vegetales. A nivel de proteína completa PpCBF presenta porcentajes de identidad que en casi todos los casos supera el 50%. El porcentaje más bajo es en la comparación con Arroz (OsDREB1), lo que probablemente se explique por la mayor distancia filogenética que existe entre estas especies. La comparación de secuencias en el dominio AP2 muestra altos porcentajes de identidad, lo que refleja la importancia de este dominio en la función de la proteína. La señal de destinación nuclear y el “CBF signature” se encuentran muy conservados entre todas las especies, existiendo solo algunas diferencias puntuales indicadas en letras de color azul. La notación de los genes ortólogos de CBF es la misma que se utilizó en la Figura 3.

Gen ortólogo de CBF (acceso NCBI)	% Identidad con <i>P. persica</i>		Señal de destinación nuclear	CBF “signature”
	Proteína completa	Dominio AP-2		
PpCBF	100	100	PKK R AGR RV	ETRHP-DSA W RL
AtCBF1 (NP567721)	51	76	PKKPAGRKK	ETRHP-DSA W RL
AtCBF2 (NP567719)	53	77	PKKPAGRKK	ETRHP-DSA W RL
AtCBF3 (NP567720)	52	79	PKKPAGRKK	ETRHP-DSA W RL
MdCBF1 (AAZ20446)	56	79	PKK R AGR KK	ETRHP-DSA R LL
PaCBF1 (BAD27123)	77	94	PKK R AGR RV	ETRHP-DSA W RL
BnCBF (AAL38242)	45	76	PKKPAGRKK	ETRHP-DSA W RL
OsDREB1 (AAQ06658)	39	53	PKRPAGR TK	ETRHP-DSA W LL

Junto con los resultados de RT-qPCR se graficó el perfil de expresión de PpCBF dado por la abundancia de ESTs para cada estadio (seis ESTs provienen de E1 y un EST proviene de E3). Esto permitió observar la buena correlación que hay entre ambas estrategias para determinar la expresión génica.

La conservación de motivos en la secuencia de PpCBF y el patrón de expresión observado, motivaron el clonamiento de este gen para estudiar su funcionalidad. La actividad será evaluada en *Arabidopsis thaliana* y en *Prunus persica* como se mostrará en las siguientes secciones.

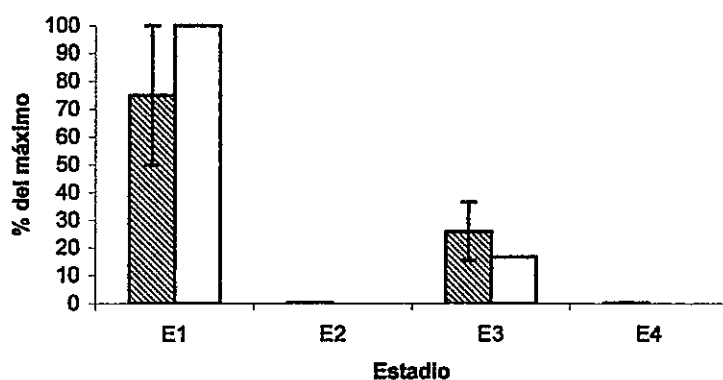


Figura 4: *PpCbf* se expresa preferentemente en frutos que han sido expuestos a bajas temperaturas. Los resultados de RT-qPCR (barras achuradas) se han comprado con la abundancia de ESTs (barras vacías) para cada uno de los cuatro estadios de postcosecha. Se observa que en ambos casos existe una mayor expresión de *PpCbf* en el estadio E1, que corresponde a frutos que han sido expuestos a frío por un periodo corto de tiempo. La expresión es menor luego de tratamientos de frío de mayor duración, como se muestra en E3 y es prácticamente no detectable en muestras expuestas a 21 °C (E2 y E4). Cabe destacar que existe correlación entre los resultados de expresión digital y lo obtenido por RT-qPCR.

5.2. Clonamiento de PpCBF en vector de expresión para plantas

El marco de lectura completo para PpCBF fue amplificado con los partidores F-LM228 y R-LM229, obteniéndose un fragmento esperado de 693 pb. Uno de los vectores pENTR que insertó el amplificado de PCR (pENTR-PpCBF), se secuenció para determinar que no hay errores en la secuencia del clon y fue seleccionado para realizar una recombinación usando el sistema Gateway. El plasmidio de destino fue el vector binario pGWB2 que es compatible con este sistema de clonamiento. Dentro del T-DNA, el vector pGWB2 contiene los marcadores de selección *NptII* y *HptI* que confieren resistencia a kanamicina e higromicina respectivamente (Figura 5A).

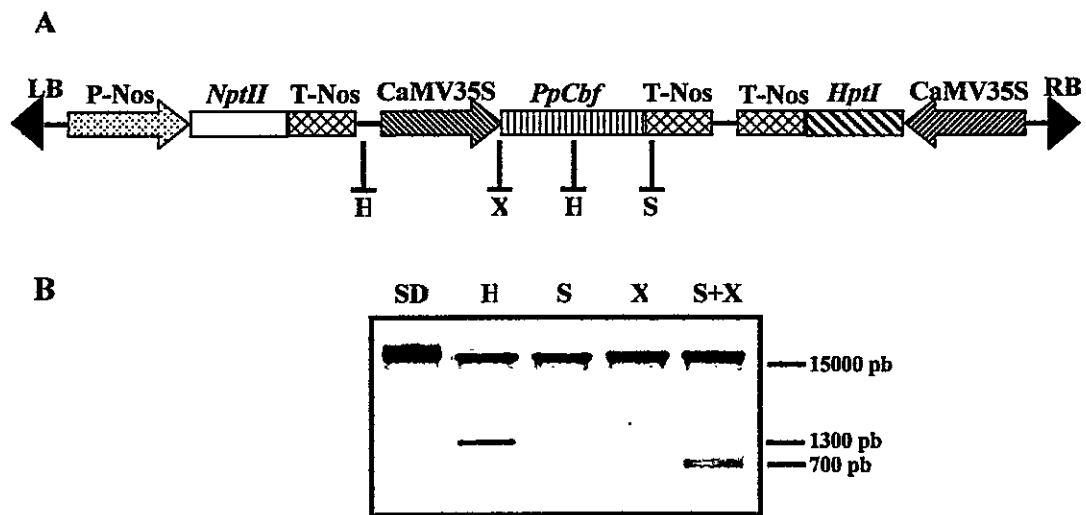


Figura 5: Clonamiento de *PpCbf* en vector binario para expresión en plantas. A) Se muestra el T-DNA del vector binario pGWB2-PpCBF que fue integrado al genoma de *Arabidopsis*. *PpCbf* se encuentra río abajo del promotor fuerte CaMV35S. Los genes *NptII* y *HptI* permiten la selección de plantas transformadas con este constructo, usando kanamicina e higromicina respectivamente. B) Gel 1% de agarosa para visualizar las digestiones con que se confirmó el constructo. Los fragmentos liberados corresponden a cortes con las endonucleasa de restricción, cuyo sitio de reconocimiento en el T-DNA esta indicado en A. H: HindIII; S: SacI; X: XbaI; SD: sin digerir. LB: left border; RB: right border; P-Nos: promotor de nopalina sintasa; T-Nos: Terminador de nopalina sintasa; *NptII*: neomicina fosfotransferasa II; *HptI*: higromicina fosfotransferasa.

Luego de la recombinación entre pENTR-PpCBF y pGWB2, la secuencia codificante de PpCBF quedó río abajo del promotor constitutivo CaMV35S (Figura 5A). El chequeo de la inserción en el vector pGWB2 se realizó por medio de cortes con enzimas de restricción, obteniendo en todas las digestiones los fragmentos predichos para una correcta inserción (figura 5B). A este nuevo vector se le denominó pGWB2-PpCBF y es el que se utilizó para evaluar la funcionalidad del gen en *Arabidopsis* y frutos de durazno.

5.3-Evaluación de la funcionalidad de PpCBF en plantas de Arabidopsis que expresan ectópicamente este gen

El vector pGWB2-PpCFB se utilizó para transformar cepas GV3101 de *A. tumefaciens* con las que posteriormente se transformó plantas silvestres de Arabidopsis. Las plantas de la generación T1 capaces de resistir la selección con el antibiótico kanamicina, se utilizaron para evaluar la funcionalidad de PpCBF. La eficiencia de transformación obtenida fue de aproximadamente 0.1 %. Un total de tres líneas transgénicas fueron utilizadas para los análisis, estas son: PpCBF-7F, PpCBF-7G y PpCBF-10A. Cada una de ellas corresponde a eventos independientes de transformación y de acuerdo a la segregación de su progenie (~3 resistentes: 1 sensible), corresponden a plantas que poseen solo una inserción de T-DNA.

Para analizar la funcionalidad de PpCBF en *Arabidopsis thaliana*, se observó la expresión de los genes *Cor78*, *Wcor414-TM1*, galactinol sintasa y *Xero2* mediante RT-PCR. Todos ellos son genes del regulón CBF de Arabidopsis, por lo que aumentan notablemente su expresión en plantas que sobreexpresan alguno de los CBFs ó que han sido expuestas a bajas temperaturas (Fowler y Thomashow, 2002; Gilmour y col, 2004; Vogel y col, 2005). Además los promotores de los 4 genes analizados poseen motivos DRE/CRT, lo que aumenta la evidencia de que se trata de genes blanco de los CBFs.

Como control de carga se usó actina y como control de la transcripción reversa se utilizó kanamicina, que corresponde a un mRNA heterólogo proporcionado por el kit utilizado para dicha reacción (Ver sección 4.6.2 en materiales y métodos).

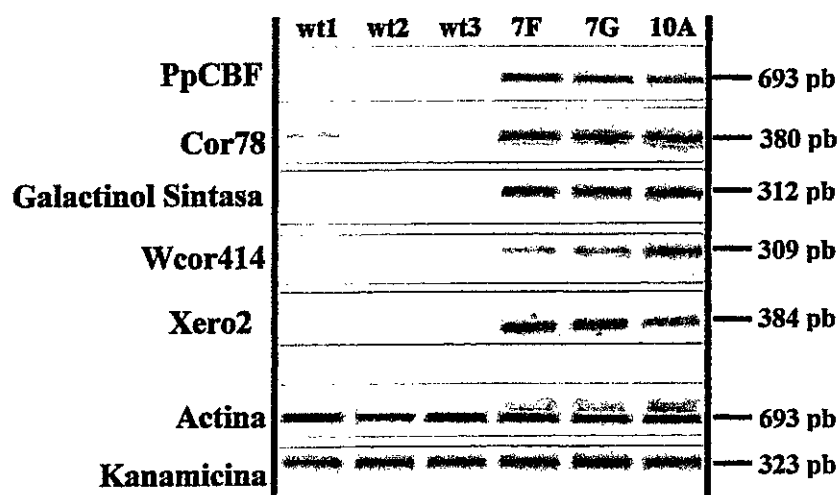


Figura 6: PpCBF induce la expresión de genes de respuesta a DREB1/CBF en Arabidopsis. El regulón CBF en Arabidopsis está constituido por ≈ 130 genes. Cuatro genes pertenecientes a este regulón que son altamente expresados con el frío, se seleccionaron para analizar su expresión mediante RT-PCR, en plantas de Arabidopsis que expresan constitutivamente *PpCbf*. Se muestra que en tres plantas transgénicas (PpCBF-7F, PpCBF-7G y PpCBF-10A) la expresión de estos genes es considerablemente mayor comparada con las silvestres (wt1, wt2 y wt3). Las plantas utilizadas no han sido expuestas a bajas temperaturas, de manera que la alta expresión de estos genes se debe principalmente a PpCBF. Como control de carga y de la reacción de RT-PCR se analizó actina y kanamicina respectivamente.

Los resultados obtenidos muestran que hay una mayor expresión para los 4 genes analizados en plantas de Arabidopsis que expresan ectópicamente *PpCbf*, cuando se les compara con plantas silvestres (Figura 6). Las plantas no fueron expuestas a bajas temperaturas, de manera que la inducción observada es producto de la activación ejercida por el gen del durazno. Con esto podemos concluir que PpCBF es un ortólogo funcional de los CBFs de Arabidopsis.

Por otra parte, al igual que se observó en plantas de Arabidopsis que sobreexpresan CBF1, CBF2, CBF3 o expresan ectópicamente ortólogos de otras especies vegetales, las plantas que expresan PpCBF muestran un retardo de aproximadamente 2 semanas en la

- aparición de flores (datos no mostrados; Dobouzet y col, 2003; Gilmour y cols, 2003; Kitashiba y col 2004; Zhang y col 2004).

5.4- Búsqueda de posibles ortólogos de genes del regulón CBF de Arabidopsis en *Prunus persica*

Si existe un factor de transcripción tipo DREB1/CBF en frutos de durazno ¿existirán posibles genes blanco para esta proteína? Para responder a esta interrogante se realizó una búsqueda de posibles ortólogos del regulón CBF de Arabidopsis en nuestra base de datos de unigenes de frutos de *Prunus persica*. De acuerdo a estudios de microarreglos de DNA en Arabidopsis, se han encontrado un total de 131 genes regulados por la familia DREB1/CBF (Fowler y Thomashow, 2002; Gilmour y col, 2004; Maruyama y col, 2004; Vogel y col, 2005). Un análisis de Blast de las secuencias de Arabidopsis contra la base de datos de unigenes de durazno, permitió identificar que en frutos de durazno se expresan posibles ortólogos para 38 de los 131 genes pertenecientes al regulón CBF de Arabidopsis (Tabla 2).

Al realizar agrupamiento de estos 38 genes de acuerdo a su función biológica (aplicando la anotación de Gene Ontology, GO), se puede observar que el grupo más representado corresponde a genes relacionados con respuesta a estrés (Figura 7). Otro grupo con varios miembros corresponde a genes que codifican proteínas que participan en procesos de transporte. En Arabidopsis estas dos categorías también resultan ser las que se encuentran mayormente representadas (Figura 7).

En la Tabla 2 se puede observar que los posibles ortólogos para miembros del regulón CBF de durazno tienen asociado un perfil de expresión digital (obtenido por medio del

algoritmo descrito por Audic y Claverie, 1997). Se muestran 4 grupos principales: 1) Aquellos que son más expresados en frutos no maduros expuestos durante 21 días a 4 °C (frutos de E3) (n = 5). 2) Unigenes que disminuyen su expresión en frutos de E3 (n = 1). 3) Unigenes que se expresan preferentemente en frutos salidos de empaque (frutos de E1). (n = 4). 4) Corresponde a un grupo heterogéneo compuesto de unigenes que no varían su nivel de expresión frente a las bajas temperaturas, o bien no han podido ser analizados por estar compuesto por un número bajo de ESTs (menor a 5) (n = 28).

Tabla 2: Ortólogos del regulón CBF de Arabidopsis presentes en la base de datos de unigenes de frutos de durazno. La búsqueda de genes ortólogos al regulón CBF de Arabidopsis en los unigenes de durazno, se realizó con TblastN. En la primera columna se encuentran algunos de los genes del regulón CBF de Arabidopsis, representados como el locus en que se ubican dentro del genoma de esta planta. La segunda columna representa el posible ortólogo del durazno para el gen correspondiente de la primera columna. En la penúltima columna se indica el perfil de expresión digital para cada unigen de *Prunus persica*. Las líneas horizontales dividen a los unigenes de acuerdo a si son más expresados en E3 (Grupo1=G1), menos expresados en E3 (Grupo2=G2), más expresados en E1 (Grupo3=G3) y aquellos cuya expresión no se pudo determinar o es equivalente en los 4 estadios evaluados (Grupo4=G4). E1: Frutos salidos de empaque (tratados a 4 °C durante el transporte); E2: Frutos maduros y jugosos (empaque + 4 días a 20 °C); E3: Frutos salidos de frío (empaque + 21 días a 4 °C); E4: Frutos maduros y harinosos (frutos de E3 expuestos 4 días a 20 °C)

AGI ^a	Unigen <i>Prunus persica</i>	Anotación	Perfil de expresión digital	G
AT1G16850	Contig2089	Proteína abundante en embriogénesis tardía (LEA)	E3>E1;E2;E4	1
AT1G20440	Contig304	Deshidrina COR47	E3>E1>E2;E4	
AT3G50970	Contig254	Deshidrina Xero2	E3>E1>E2;E4	
AT2G15970	Contig30	Proteína de aclimatación a frío similar a WCOR413 (WCOR413-PM1)	E3>E1;E2;E4	
AT2G22590	Contig2554	Putativa antocianidin-3-glucósido ramnosiltransferasa	E3>E1;E2;E4	
AT1G69530 [#]	Contig1200	Expansina 1	E3<E1;E2;E4	2
AT2G21660	Contig55	Proteína de unión a RNA, rica en glicina	E1>E2;E3;E4	3
AT5G62360	Contig59	Proteína de la familia de inhibidores de invertasa/pectin metilesterasa (PMEi)	E1> E3>E2;E4	
AT5G62350	Contig3598	Proteína de la familia de inhibidores de invertasa/pectin metilesterasa (PMEi)	E1>E2;E3;E4	
AT4G38580	Contig1437	Chaperona asociada a Cobre	E1>E2;E3;E4	
AT5G20830	Contig871	Sacarosa sintasa 1 (ASUS1)	E1=E2=E3=E4	
AT4G33070	Contig1054	Pyruvato descarboxilasa-1 (PDC1)	E1<E2;E3	4
AT3G55610	Contig4003	Pirrolina-5-carboxilato sintetasa	ND*	
AT1G27730	Contig1572	Proteína de unión a DNA con dedo de zinc C ₂ H ₂	E1=E2=E3=E4	
AT2G47890	Contig725	Proteína de la familia dedo de zinc (tipo B-box)	ND*	
AT5G25110	Contig1221	Proteína kinasa CIPK25	ND*	
AT5G27930	PUI_plate19_G16	Proteína fosfatasa PP2C	ND*	
AT1G77120	Contig1349	Alcohol deshidrogenasa (ADH)	ND*	
AT5G57110	Contig3563	ATPasa transportadora de Calcio 8 (ACA8)	ND*	
AT2G16990	Contig2903	Putativa proteína transportadora de tetraciclina	ND*	
AT4G35300	Contig2836	Proteína transportadora de azúcar	E1=E2=E3=E4	
AT2G28900	Contig950	Familia de proteínas Tim17/Tim22/Tim23.	ND*	
AT1G47710	Contig187	Translocasa de membrana mitocondrial interna Putativa serpina	ND*	
AT1G62710	Contig1375	Proteína de procesamiento vacuolar beta / beta-VPE	E2>E3	
AT1G01470	Contig717	Proteína abundante en embriogénesis tardía (LEA14)	ND*	
AT1G29395	Contig1970	Proteína de aclimatación a frío similar a WCOR413 (ATCOR414-TM1)	ND*	
AT1G30360	Contig3825	Proteína de respuesta temprana a deshidratación (ERD4)	ND*	
AT2G17840	Contig2292	Proteína asociada a senescencia/deshidratación (ERD7)	ND*	
AT1G05170	Contig3452	Proteína de la familia de galactosil-transferasas	ND*	
AT4G38400	Contig2060	Proteína de la familia de expansinas	E1=E2=E3=E4	

AT3G17130	Contig1478	Proteína de la familia de inhibidores de invertasa/pectín metilesterasa (PMEI)	ND*	}
AT4G24960	Contig949	Proteína de respuesta a ABA (HVA22d)	ND*	
AT3G14890	PU4_plate36_C12	Fosfoesterasa	ND*	
AT1G10410	PU1_plate19_N17	Proteína expresada	ND*	
AT1G33230	PU3_plate43_E03	Proteína expresada	ND*	
AT1G68500	PU1_plate42_I14	Proteína expresada	ND*	
AT2G33830	PU1_plate9_N22	Familia de proteínas asociadas a dormancia/auxina	ND*	
AT4G14000	PU3_plate25_C06	Proteína expresada	ND*	

*Arabidopsis Genome Initiative

*ND: No determinado por que el Unigen está compuesto por un número de ESTs menor a 5.

[#]De todos los genes de Arabidopsis que se muestran en la tabla, es el único que disminuye su expresión en respuesta el frío en esta planta.

De los 38 posibles ortólogos a genes del regulón CBF de Arabidopsis identificados en los unigenes de durazno, 10 de ellos se expresan diferencialmente entre frutos no maduros salidos de frío (E1 y/o E3) y frutos maduros expuestos a 20 °C (E2 y/o E4) (de acuerdo a los análisis de expresión digital). Considerando la población total de unigenes disponibles dentro de nuestro proyecto, existen 68 de estos que presentan expresión diferencial considerando las mismas comparaciones antes mencionadas (55 aumentan su expresión en E1 y/o E3 y 13 disminuyen en E3). Esto significa que los unigenes del posible regulón CBF del durazno, representan un 15 % del total de unigenes que tienen este tipo de patrón de expresión. (Observar Tablas 3-6 en ANEXOS, para ver detalles de los unigenes mencionados en el texto).

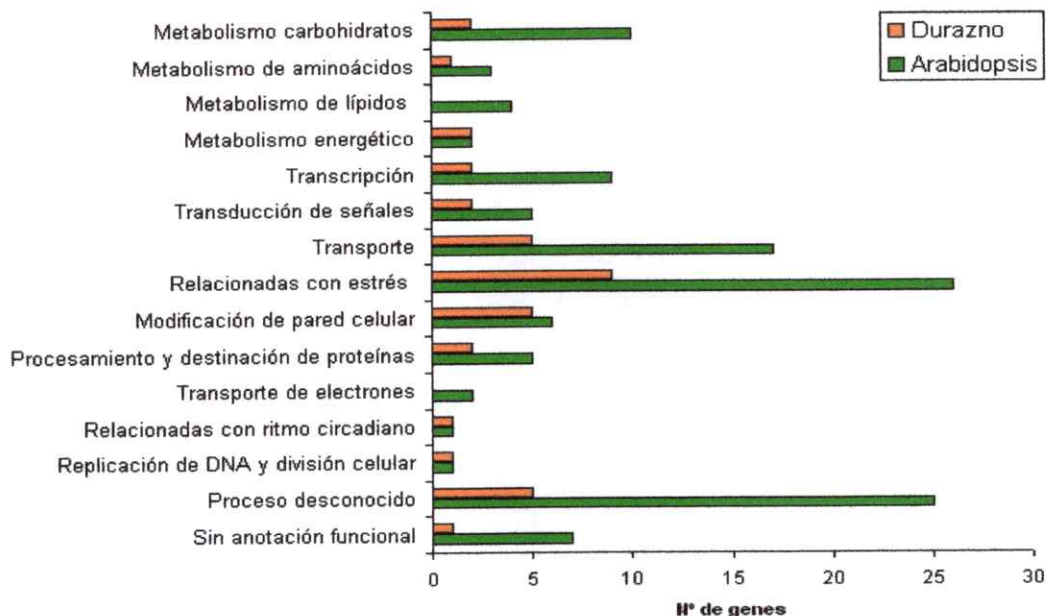


Figura 7: Genes del regulón CBF de Arabidopsis y sus posibles genes ortólogos en durazno, graficados según su función biológica. En Arabidopsis se han identificado 131 genes que responden a la familia de factores de transcripción DREB1/CBF. En nuestra base de datos de unigenes de frutos de durazno, se han encontrado posibles ortólogos para 38 de los 131 genes que conforman el regulón CBF. La clasificación de estos genes de acuerdo a la función biológica otorgada por GO (Gene Ontology), muestra que un número importante de los posibles ortólogos identificados en durazno están dentro del grupo relacionado con respuesta a estrés. Se puede observar que otros procesos biológicos también están constituidos por varios miembros, como es el caso de transporte y modificación de pared celular. En Arabidopsis aún existen numerosos genes que pertenecen al regulón CBF, cuya función aún no se ha determinado.

5.5.- Análisis de expresión de miembros del posible regulón CBF de frutos de durazno mediante RT-qPCR

En la sección anterior se habló sobre unigenes de durazno que son posibles ortólogos de genes del regulón CBF de Arabidopsis y que presentan un perfil de expresión que es distinto entre frutos no maduros recién salidos de frío y frutos maduros que han sido tratados a 20 °C. Este perfil de expresión que ha sido determinado de manera bioinformática, debe ser evaluado por una técnica que permita trabajar con las muestras

biológicas y que tenga características de ser cuantitativo, con el objetivo de comparar ambos resultados. Una de las técnicas que cumple este requisito es el PCR en tiempo real, la cual se caracteriza además por su alta sensibilidad, reproducibilidad y especificidad, entre otras (Gachon y col, 2004; Bustin, 2000).

Para realizar un análisis de expresión por medio de RT-qPCR es necesario contar con un gen normalizador, que presente mínimas variaciones de expresión en respuesta a los tratamientos realizados a las muestras. En el desarrollo de esta tesis, no se logró encontrar un gen que se exprese de manera homogénea en los 4 estadios estudiados, por lo que para normalizar se usó mRNA de kanamicina (esto sirve para determinar que las diferencias en la amplificación no se deben a artefactos de la transcripción reversa, ya que al inicio de esta reacción se ponen cantidades iguales de mRNA de kanamicina en cada tubo). Para asegurar que se agregó cantidades similares de RNA total a cada reacción de transcripción reversa, se corrió un gel de agarosa 1.5% cargado con el mismo volumen de muestra usado para llevar a cabo la reacción. Mediante análisis cualitativo se determinó que la intensidad de las bandas de RNA ribosomal es similar entre las muestras de los distintos estadios (anexo, Figura 10). Para cada uno de los 4 estadios analizados, se usaron 3 réplicas biológicas y para cada una de ellas se realizaron 2 réplicas técnicas. Los datos se graficaron como “% del máximo”, lo que significa que para **cada gen** analizado, se asocia un valor de 100 % a la réplica biológica que presente el valor normalizado más alto y a las 11 restantes se le asocia un porcentaje que es relativo a este 100 % (Tablas 7 y 8 en el anexo).

El análisis de expresión mediante RT-qPCR se realizó sobre tres genes, dos de ellos pertenecientes al grupo 1 (deshidrina *Xero2* y *Wcor413*) y uno perteneciente al grupo 3 (inhibidor de pectin metilesterasa, *Pmei*).

Los resultados obtenidos de las reacciones de RT-qPCR, muestran una buena correlación con lo obtenido de acuerdo a la abundancia de ESTs en cada estadio (Figura 8). En el caso del inhibidor de pectin metilesterasa (*Pmei*) es evidente que ambas aproximaciones coinciden en mostrar una expresión que es mayor en el estadio E1 comparado con los otros tres (Figura 8A). Además la prueba estadística t-student ($p < 0.05$) usada para comparar los niveles de expresión determinados por RT-qPCR, dice que no hay diferencia significativa entre los estadios E2, E3 y E4. *Wcor413* y *Xero2* (Figura 8B y 8C, respectivamente) muestran un perfil de expresión en el cual existe una diferencia que es estadísticamente significativa entre E3 y los demás estadios. Esto significa que estos genes están respondiendo al tratamiento con frío en el durazno y lo hacen a través de una respuesta que es duradera en el tiempo (luego de 21 días a bajas temperaturas, los niveles de expresión siguen altos). Estos resultados coinciden con lo observado para este par de genes en experimentos de microarreglos en *Arabidopsis*, en los cuales se analiza el perfil de expresión génica a diferentes periodos de tratamiento con bajas temperaturas (Vogel y col 2005).

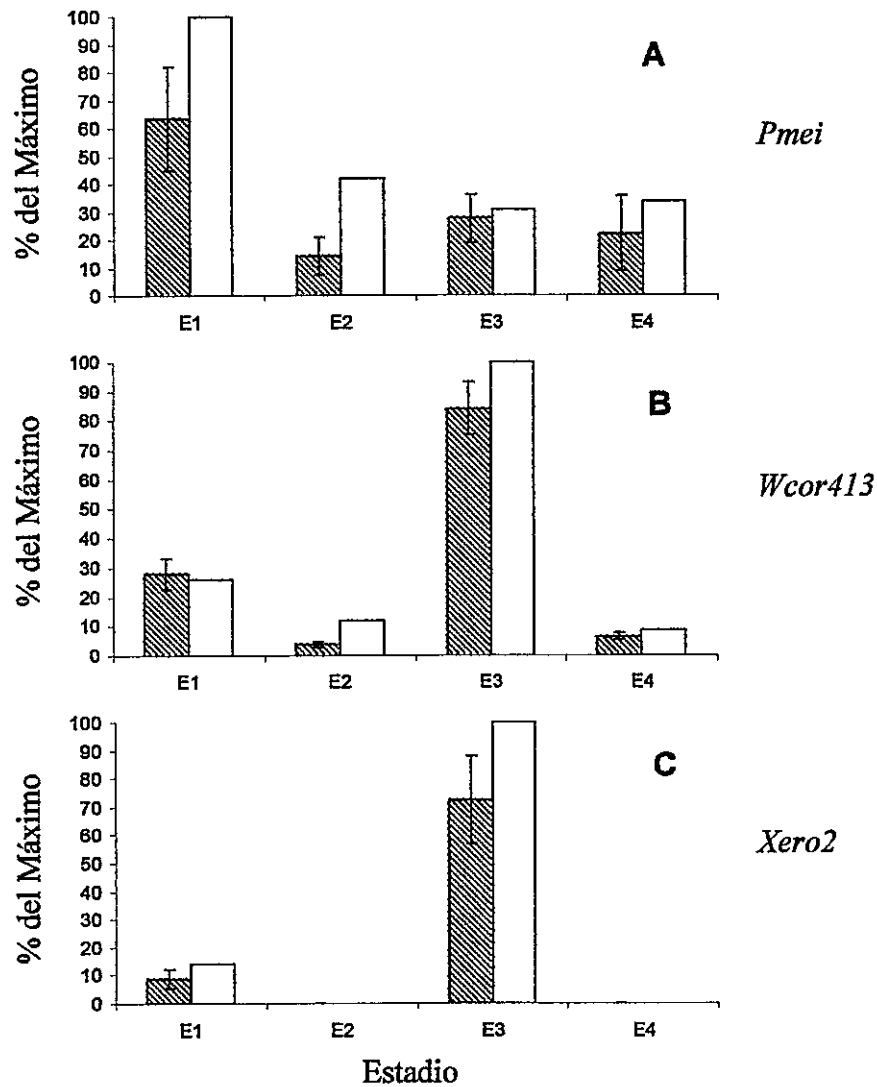
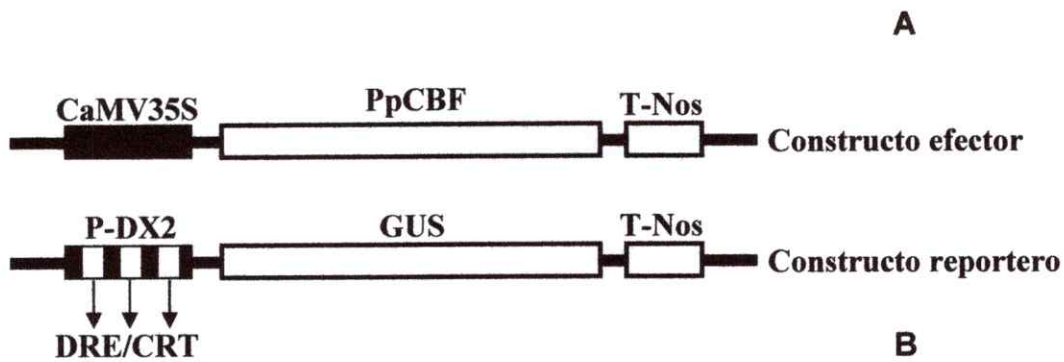


Figura 8: Tres posibles genes blanco de PpCBF se expresan preferentemente luego de tratamientos con frío. Se analizó la expresión de *Pmei*, *Wcor413* y *Xero2* mediante qPCR (barras achuradas) y abundancia de ESTs (barras blancas). Para la reacción de PCR, la abundancia relativa de cDNA para cada gen en los distintos estadios, fue normalizada por la abundancia del cDNA de kanamicina. El máximo para cada gen corresponde al valor normalizado más alto entre las 12 muestras de cDNA (3 muestras para cada estadio). A éste se le asigna un valor de 100%, mientras que a las otras 11 muestras se le asigna un porcentaje relativo a ese 100%. Para generar las barras de abundancia de ESTs, el máximo se consideró aquel estadio que contiene la mayor cantidad de ESTs que componen el contig. En A se muestra que *Pmei* se expresa preferentemente en tratamientos cortos de frío. En B y C se puede observar que los genes analizados presentan un nivel de expresión que es significativamente mayor en el estadio E3 comparado con los otros estadios (t-student; $P < 0,05$). $N=3$ para cada estadio analizado. Las barras representan la desviación estándar.

El RT-qPCR resultó útil no solo para ver las diferencias de expresión entre estadios de los genes estudiados, si no que permitió validar los análisis de expresión digital que sobre estos genes se han realizado.

5.6.-Evaluación de la actividad de PpCBF en frutos de durazno

La expresión de *PpCbf* en *Arabidopsis* resultó en un aumento de la transcripción de genes que poseen motivos DRE/CRT en sus promotores, en plantas que no han sido tratadas con frío. Este resultado es positivo, pero no es una evidencia de que PpCBF sea funcional sobre el promotor de los genes del posible regulón CBF identificado en durazno. En el proyecto que se enmarca esta tesis, se han aislado promotores de genes que presentan mayores niveles de expresión en los frutos que han pasado por una cadena de frío (Frutos E3; Tittarelli y col, no publicado). Uno de los promotores aislados pertenece a un posible ortólogo de la deshidrina *Xero2* de *Arabidopsis*. Como ya se ha mencionado anteriormente, este gen pertenece al regulón CBF en *Arabidopsis* y es inducido por la expresión ectópica de *PpCbf* en esta planta (Figura 6). La secuenciación del promotor obtenido desde durazno, permitió observar que posee tres motivos de tipo DRE/CRT, lo que es un indicio de que este promotor es un posible blanco de PpCBF. La fusión del promotor de durazno con el gen reportero *uidA* (que codifica la enzima Glucoronidasa, GUS), representan una herramienta útil para llevar a cabo experimentos de trans-activación por parte de PpCBF. Esta trans-activación fue evaluada por medio de la observación de actividad de GUS en frutos de durazno que fueron co-infiltrados con los constructos indicados en la Figura 9A.



Variedad de Durazno	O'Henry	Rian Sun	Autum Red
Constructos infiltrados			
CaMV35S=PpCBF + P-DX2=GUS 3 dpi			
P-DX2=GUS 3 dpi			
P-DX2=GUS 4° C; 21 dpi			
Control + pBI121			
Control - pBI101.3			

Figura 9: PpCBF trans-activa al promotor del posible ortólogo de deshidrina *Xero2* en frutos de *Prunus persica*. A) Constructos utilizados para los ensayos de trans-activación en frutos de durazno. El promotor de la posible deshidrina *Xero2* identificada en frutos de durazno contiene 3 posibles motivos DRE/CRT. El constructo efector es el mismo señalado en la Figura 5. B) La co-infiltración de los constructos CaMV35S=PpCBF y P-DX2=GUS en tres variedades distintas de durazno muestra actividad de GUS luego de tres días post infiltración (dpi). No se observa actividad de GUS en muestras que han sido infiltradas solo con el constructo reportero luego de 3 dpi, de manera que la activación del promotor es causada por la trans-activación de PpCBF. El promotor de DX2 responde también al frío, como se evidencia en las muestras expuestas por 21 días a 4 °C luego de la infiltración del fruto. El control positivo corresponde a un vector que contiene a GUS río abajo del promotor CaMV35S, mientras que el control negativo es un vector que no tiene el gen que codifica para GUS.

Como se puede observar en la Figura 9B, aquellos frutos que fueron co-infiltrados con el constructo reportero (P-DX2=GUS) y el constructo efector (CaMV35S=PpCBF), muestran actividad de GUS luego de tres días de infiltración sin tratamiento de frío. Distinto es lo que se observa en este mismo periodo de tiempo, en frutos que han sido infiltrados únicamente con el constructo reportero. Esto es una evidencia entonces de que PpCBF estaría trans-activando el promotor de la deshidrina *Xero2* aislado desde durazno. Por otra parte es posible observar que aquellos frutos infiltrados sólo con el constructo reportero y que han sido mantenidos durante 21 días a 4 °C muestran actividad GUS. La información obtenida con este resultado se complementa con lo observado en el perfil de expresión del gen deshidrina *Xero2* mediante RT-qPCR (Figura 8C)

6.-DISCUSIÓN

6.1.- Análisis de secuencia y expresión de PpCBF

En las secuencias de frutos de durazno que se han utilizado para realizar la búsqueda de ortólogos de DREB1/CBF y sus genes río abajo, sólo se ha encontrado un unigen que presenta una alta identidad con genes del tipo CBF. En otras especies en que se han identificado ortólogos para este tipo de factores de transcripción, existe una familia que está compuesta por lo menos por tres miembros. En el caso del tomate y el arroz, se han encontrado familias de homólogos a DREB1/CBF de tres y cuatro miembros, respectivamente (Dubouzet y col, 2003; Zhang y col, 2004). Sin embargo, en el tomate solo uno de los tres miembros identificados aumenta su expresión en respuesta al frío (Zhang y col, 2004). En el caso del arroz dos de los cuatro ortólogos responden a las bajas temperaturas (Dubouzet y col, 2003). Estas evidencias sugieren que en *Prunus persica* tal vez existan más ortólogos para DREB1/CBF, los cuales no necesariamente se expresan con el frío. Por otra parte, cabe destacar que los unigenes que se utilizaron para buscar ortólogos de DREB1/CBF, se han obtenido a partir de secuencias de RNA extraído sólo de mesocarpo de frutos de durazno. No se descarta la posibilidad que en otro tejido u órgano de *Prunus persica* se estén expresando ortólogos para estos factores de transcripción. Para saber si existe una familia DREB1/CBF en *Prunus persica* se podría llevar a cabo experimentos de southern blot con DNA genómico aislado de esta especie.

En la secuencia aminoacídica predicha para PpCBF, observamos la presencia de tres putativas sábanas β y un hélice α . Estas estructuras secundarias son propias de los

dominios de unión a DNA tipo AP2 y conforman la estructura que permite la interacción del factor de transcripción con el surco mayor del DNA (Allen y col, 1998). La evidencia que apoya que PpCBF es ortólogo de genes del tipo DREB1/CBF es la presencia de las secuencias ETRHP y DSAWRL, las cuales son propias de estos factores de transcripción y los diferencian de los otros miembros de la familia AP2 (Jaglo y col, 2001).

Los CBFs son genes que en *Arabidopsis* y otras especies se expresan tempranamente en respuesta al frío (alrededor de 15 min después de la exposición al frío) (Gilmour y col, 1998; Jaglo y col, 2001; Dubouzet y col, 2003; Zhang y col, 2004), y sus transcritos bajan rápidamente llegando a niveles muy bajos pasadas 24 horas después del tratamiento de bajas temperaturas. De acuerdo al perfil de expresión de *PpCbf* obtenido por RT-qPCR, este factor de transcripción es claramente detectable incluso luego de 3 semanas de exposición al frío. Un resultado como este no es común a todos los ortólogos a DREB1/CBF que se han identificado hasta el momento, sin embargo, existen evidencias similares en experimentos realizados con *Arabidopsis* (Zarka y col, 2003).

6.2.- Funcionalidad de PpCBF en *Arabidopsis thaliana*

PpCBF mostró una alta identidad de secuencia en regiones que son altamente conservadas entre los ortólogos a DREB1/CBF de *Arabidopsis thaliana*. Esto representa una de las primeras evidencias que apoyan la funcionalidad de PpCBF sobre el promotor de los genes del regulón CBF de *Arabidopsis*. Los experimentos de RT-PCR realizados para analizar la expresión de genes del regulón CBF en plantas de *Arabidopsis* que expresan ectópicamente *PpCbf*, dejan de manifiesto que el gen de durazno es capaz de

activar la expresión de los cuatro genes analizados. El RNA se extrajo de plantas de *Arabidopsis* que no fueron sometidas a las bajas temperaturas, por lo que el aumento en la expresión de los genes del regulón CBF se debe a la activación ejercida por PpCBF. Los bajos niveles de expresión observados para *Cor78*, Galactinol sintasa, *Wcor413* y *Xero2* en plantas silvestres de *Arabidopsis* (Figura 6), está de acuerdo con lo obtenido por otros autores en plantas que no han sido expuestas al frío (Fowler y Thomashow, 2002; Gilmour y col, 2004; Maruyama y col, 2004; Vogel y col, 2005).

Un aspecto que se podría estudiar, es la capacidad de resistir al frío de plantas transgénicas que expresen *PpCbf* con respecto a plantas silvestres. Es de esperar que aquellas plantas que expresen el ortólogo de DREB1/CBF sean más resistentes, dado que en experimentos similares utilizando ortólogos provenientes de arroz (Dubouzet y col, 2003), tomate (Zhang y col, 2004) y cereza (Kitashiba y col, 2004) las plantas transformadas presentan una mayor resistencia a las bajas temperaturas. Una característica común en el fenotipo de las plantas transgénicas recién enunciadas, es el retardo en la floración con respecto a las plantas silvestres. En el caso de las plantas que expresan *PpCbf*, se observó que en una población heterogénea de plantas hetero y homocigotas existe un retardo de aproximadamente dos semanas en la aparición de órganos florales con respecto a las plantas silvestres crecidas en las mismas condiciones. Se ha observado que en plantas mutantes de *Arabidopsis* con fenotipo enano y retardo en la floración, existe una deficiencia en la síntesis de Giberelina. La principal característica de estas plantas mutantes es la sobreexpresión de un posible factor de transcripción tipo AP2 (Magome y col, 2004). Este mutante muestra una expresión aumentada de genes

que son propios del regulón CBF, esto sugiere que la inhibición en la síntesis de Giberelina es una función común de los genes DREB1/CBF.

6.3.- Búsqueda de ortólogos del regulón CBF en unigenes provenientes de frutos de durazno

Para realizar la búsqueda de ortólogos a genes del regulón CBF de *Arabidopsis* en las secuencias de durazno, se utilizó la herramienta Blast. Esta ha sido usada con bastante éxito por Wong y col (2005) con el objetivo de identificar ortólogos de *Arabidopsis* en unigenes *Thellungiella* que cambian su expresión frente distintas condiciones de estrés (incluido el frío). Sólo se utilizaron las secuencias de ESTs de frutos de durazno obtenidas dentro de nuestro proyecto, dado que otros proyectos internacionales que aportan información de ESTs de frutos, no han enfocado sus estudios en cambios de expresión causados por el tratamiento con bajas temperaturas.

De los posibles ortólogos del regulón CBF de *Arabidopsis* que se encontraron en las secuencias que disponemos para frutos de durazno, en ambas especies la mayor cantidad de genes están agrupados dentro de las mismas categorías de función biológica, estas son: Proteínas relacionadas con estrés, metabolismo, transporte y modificación de pared celular. Dentro de los 38 miembros del posible regulón CBF del fruto de durazno, sólo 10 presentan variación en su expresión frente al tratamiento con frío según los análisis de expresión digital. Existe la posibilidad que algún otro posible ortólogo identificado responda cambiando su nivel de expresión frente a las bajas temperaturas, sin embargo, al estar compuesto de pocos ESTs no es posible obtener un resultado estadísticamente significativo. Ejemplo de esto son el contig717 (compuesto de 8 ESTs) y contig725

(compuesto de 6 ESTs) que codifican para LEA14 y una proteína con dedo de zinc, respectivamente. Por otra parte, es posible que otros ortólogos presenten cambios de expresión en tiempos de exposición a frío que están fuera de las muestras disponibles en el proyecto en que se desarrolló esta tesis.

En *Arabidopsis* se ha documentado que frente a las bajas temperaturas el número de genes que induce su expresión es bastante mayor con respecto a los genes que la disminuyen (Vogel y col, 2005; Lee y col, 2005). Esto es válido tanto para genes que pertenecen o no al regulón CBF. En durazno es posible observar el mismo tipo de comportamiento en la expresión génica. Sin embargo, teniendo en consideración el modelo experimental que se está usando, es posible que se observen bajos niveles de transcrito para un determinado gen en los estadios E1 y E3 y alto en los estadios E2 y E4. Esto no debe ser interpretado como una represión causada por el frío, ya que cabe la posibilidad que se trate de genes que son inducidos durante la maduración del fruto. Dentro de este grupo de genes encontramos enzimas de degradación de pared celular tales como pectato liasas y proteínas de la familia de endo-poligalacturonasas cuya participación en procesos de maduración ha sido descrita previamente (Marín-Rodríguez y col, 2002; Brummell y col, 2004). Es por esta razón que se consideró como reprimidos por frío, sólo a aquellos genes que disminuyen su expresión en E3 comparado con los otros tres estadios (Tabla 5 en el anexo).

En base a su perfil de expresión digital, se identificaron 55 y 13 genes que aumentan y disminuyen su expresión por frío, respectivamente. Dado que sólo 10 de ellos pertenecen a un posible regulón CBF en durazno, cabe esperar que en esta fruta existan múltiples vías que puedan modificar la expresión génica frente a las bajas temperaturas.

Trabajos realizados en *Arabidopsis* muestran evidencias que apoyan esta idea (Fowler y Thomashow, 2002; Vogel y cols, 2005). En los análisis realizados, no se observó la existencia de genes que codifiquen para factores de transcripción que muestren una expresión diferencial frente al frío. Sin embargo, como se trata de factores de transcripción, es posible que sus niveles de expresión no sean lo suficientemente elevados como para otorgar el número de ESTs suficientes (al menos 5) que permitan realizar análisis estadísticos sobre ellos.

6.4.- Confirmación del perfil de expresión diferencial determinado digitalmente, con RT-qPCR

Los resultados de RT-qPCR mostraron una buena correlación con respecto a lo observado por el análisis de expresión digital, lo que permite inferir que la expresión diferencial determinada por este método digital es confiable, no solo para el grupo de 4 genes analizados, sino que también para el resto de los genes. Cabe destacar que en *Arabidopsis* los genes *Xero2* y *Wcor413* presentan los máximos niveles de expresión aproximadamente a las 24 horas de exposición al frío, luego este nivel baja pero no de manera considerable. De acuerdo a lo observado en durazno, existe una clara expresión preferencial para estos dos genes en el estadio E3, por lo que se puede inferir que estos genes presentan una expresión que se mantiene alta aún luego de 21 días de exposición a bajas temperaturas. El diseño experimental utilizado para las muestras que se usaron en esta tesis, no permite obtener la información de cuando ocurre el máximo de expresión para estos unigenes. Para lograr este objetivo necesitaríamos muestras de durazno tratadas en un curso temporal de frío y determinar cual es su cinética de expresión.

Actualmente disponemos de muestras de durazno de la variedad O'Henry que han sido expuestas a 4 °C por 0, 12, 24, 48 y 72 h. Resultados preliminares entregan evidencias de que *Xero2* aumenta su expresión durante las primeras 24 horas y además se expresión en precedida por la expresión de *PpCbf*.

En plantas de *Prunus persica* de la variedad Canadian Harmony se ha determinado la existencia de dos deshidrinas, una de las cuales responde a las bajas temperaturas (Wisniewski y col, 2006). A esta deshidrina se le denominó *PpDhm1* y de acuerdo a los análisis de su secuencia corresponde a un ortólogo de *Xero2* (NCBI AY465376). Considerando la alta identidad que existe entre esta deshidrina y la que hemos identificado en frutos de durazno (98 % de identidad en un alineamiento de 1715 bases), es muy probable que se trate del mismo gen. En la corteza de plantas de durazno se observó altos niveles de expresión para *PpDhm1* luego de tres semanas de exposición a 5 °C (Wisniewski y col, 2006). Este resultado coincide con los análisis de expresión en frutos de *Prunus persica* que se han realizado en esta tesis.

En las reacciones de PCR en tiempo real, existen variados factores que pueden llevar a la generación de datos erróneos, que tienen como consecuencia una mala interpretación de lo obtenido (Bustin y Nolan, 2004). Alguno de los puntos sensibles son la calidad y la cantidad del RNA utilizado para la reacción de transcripción reversa. En el experimento realizado en este trabajo, se controló ambos parámetros por medio de un gel de agarosa 1.5 %. Se observó la buena calidad del RNA utilizado, además de la homogeneidad en las cantidades de RNA de cada muestra utilizado para el RT-qPCR.

En los análisis de expresión con RT-qPCR, es común normalizar los datos con genes de referencia tales como β -actina ó gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) los

cuales son constitutivamente expresados (Hugget y col, 2005). Sin embargo, existe evidencia de tratamientos que cambian los niveles de expresión de estos genes, de manera que su uso como normalizadores no es adecuado en todos los casos. Ejemplo de ello es la actina 2 que muestra una expresión que es dependiente de las altas temperaturas en *Arabidopsis* (Volkov y col, 2003) y GAPDH que muestra variabilidad frente a distintas condiciones en trabajos con células humanas (Bustin, 2000). En el caso de las muestras de durazno utilizadas, no se encontró un gen que se comporte homogéneamente en los 4 estadios analizados. Actina y tubulina fueron evaluados como posibles genes de referencia, sin embargo, en ninguno de los dos casos se lograron buenos resultados (estos experimentos no fueron mostrados en esta tesis). La falta de un gen normalizador fue superada con los controles de calidad y cantidad de RNA utilizado, junto con la amplificación de kanamicina como control de la reacción de PCR. El mRNA de kanamicina corresponde a una molécula externa otorgada por los fabricantes del kit de transcripción reversa (Promega). En el caso de los experimentos mostrados en esta tesis, se agregó cantidades iguales de mRNA de kanamicina (0.5 pg) a todos los tubos que se utilizaron para realizar la reacción.

6.5.-Actividad de PpCBF en frutos de durazno

Los experimentos realizados sobre plantas de *Arabidopsis* que expresan ectópicamente *PpChf*, muestran que se induce la expresión del gen *Xero2* propio de esta planta. La activación que se observó para el ortólogo de este gen identificado en frutos de *Prunus persica*, implica que en esta planta se encuentran los componentes necesarios para que PpCBF pueda cumplir su función regulando la expresión génica. En *Arabidopsis* existen

evidencias que indican que la familia DREB1/CBF, necesita la participación de otras proteínas para llevar a cabo su función. Estudios realizados en levadura mostraron que CBF1 de *Arabidopsis* interactuaba con un adaptador transcripcional (ADA2) y una histona acetiltransferasa (GCN5) propios de la levadura (Stockinger y col, 2001). Estas dos proteínas son parte de un complejo de proteínas que contribuyen a la modificación de la cromatina y por ende participan de la regulación transcripcional. Se encontraron ortólogos para ADA2 y GCN5 en *Arabidopsis*, y se determinó que estas dos proteínas interactúan con CBF1 (Stockinger y col, 2001). Posteriormente, Vlachonasios y col (2003) observaron que plantas de *Arabidopsis* mutantes en ortólogos de ADA2 y GCN5 muestran efectos dramáticos en su crecimiento e interesantemente observaron una disminución en la expresión de genes del regulón CBF. Los niveles de expresión de DREB1/CBF son iguales entre las plantas mutantes recién mencionadas y plantas silvestres cuando son expuestas a frío. Considerando esta situación, se puede concluir que los CBFs regulan la expresión génica, formando parte de un complejo proteico. En la base de datos de unigenes de frutos de durazno hemos encontrado un posible ortólogo para Ada2. El unigen corresponde a un singleton que de acuerdo a predicciones bioinformáticas presenta los mismos motivos que Ada2 de *Arabidopsis* (Datos no mostrados). No hemos encontrado un posible ortólogo para Gcn5, pero considerando la funcionalidad de PpCBF en *Prunus persica*, es probable que este componente del complejo se encuentre conservado en esta especie.

Se ha evaluado la actividad de PpCBF sobre uno de los posibles genes blanco identificados. Este ensayo de trans-activación que se ha implementado para frutos de durazno, representa una herramienta bastante útil para evaluar la actividad de PpCBF

sobre el promotor de otros posibles genes blanco, así como también para evaluar otros factores de transcripción que resulten de interés.

El gen *PpCbf* que se ha encontrado en frutos de durazno, demostró ser funcional tanto en *Arabidopsis thaliana* como en *Prunus persica*. En el caso de *Arabidopsis*, los genes de la familia DREB1/CBF regulan la expresión de un número amplio de genes (131). Teniendo en cuenta que el problema del daño por frío en frutos de durazno es generado probablemente por más que un solo gen, se podrían generar plantas que presenten modificaciones en la expresión de *PpCbf*. Desde el punto de vista biotecnológico, desarrollar estas líneas transgénicas sería útil para evaluar el desarrollo de daño por frío en las frutas que se generen a partir de estas plantas. Si en alguna de las líneas generadas se logra evitar el daño por frío, estaríamos frente a una posible solución al problema de rechazo que aqueja a nuestra fruta en los mercados lejanos. Alternativamente, el uso de promotores que responden a PpCBF (como es el caso del promotor de *Xero2*), representa una herramienta útil para modular la expresión de nuevos genes candidatos que puedan solucionar el daño por frío en los fruto de durazno.

7.- CONCLUSIONES

- Se ha identificado un posible ortólogo para genes de la familia DREB1/CBF en *Prunus persica*. Este unigen, al que se denominó *PpCbf*, presenta una alta conservación a nivel aminoacídico en regiones que son importantes para la función de este tipo de factores de transcripción. La expresión de *PpCbf* se observó en frutos de durazno recién salidos de frío, siendo indetectable en frutos tratados por 4 días a 20 °C.
- La expresión ectópica de *PpCbf* en plantas de *Arabidopsis*, permitió observar una inducción en la expresión de genes que pertenecen al regulón CBF de esta planta, sin necesidad de exponer las plantas al frío. Esto indica que *PpCbf* es funcional en un sistema heterólogo.
- Se identificaron 38 posibles genes ortólogos del regulón CBF de *Arabidopsis* en las secuencias de frutos de durazno generadas en el proyecto que se enmarcó esta tesis. De estos 38 genes, 10 presentan un perfil de expresión digital que indica su expresión preferencial frente al tratamiento con frío.
- Se confirmó el perfil de expresión digital para 3 posibles genes ortólogos del regulón CBF encontrados en durazno. Los genes ortólogos para *Wcor413* y *Xero2*, se expresan preferentemente en frutos que han sido expuestos a periodos largos de frío. El gen ortólogo para *Pmei* se expresa preferentemente en frutos salidos de empaque.
- PpCbf* puede trans-activar al promotor de la deshidrina *Xero2* de durazno. El ensayo realizado para llegar a este resultado, representa una herramienta útil para evaluar la funcionalidad de factores de transcripción sobre el promotor de sus posibles genes blanco.

8.- PROYECCIONES

En esta tesis se ha encontrado un gen ortólogo para DREB1/CBF en *Prunus persica*. En otras plantas se ha determinado la existencia de una familia de factores de transcripción de este tipo. Para averiguar si es también el caso del durazno, se podrían desarrollar experimentos de southern blot con DNA genómico de esta planta.

Se encontró una alta conservación en motivos que resultan clave para la función de PpCBF. El desarrollo de experimentos con geles de retardo, sería útil para analizar la especificidad PpCBF en el reconocimiento de motivos DRE/CRT como los encontrados en el promotor de *Xero2* de *Prunus persica*.

Se observó que en plantas de Arabidopsis que expresan ectópicamente *PpCbf*, hay un aumento en la expresión de genes del regulón CBF. La resistencia al frío de estas plantas es un aspecto que aún está por evaluar.

Se identificó algunos posibles ortólogos para genes del regulón CBF en *Prunus persica*. Nuevos ortólogos se podrían encontrar en muestras expuestas al frío en un curso temporal. Estas mismas muestras serían útiles para analizar la correlación temporal en la expresión de *PpCbf* y sus posibles genes blanco. Por otra parte, se podría evaluar la actividad de PpCBF sobre el promotor de los posibles genes blanco por medio de ensayos de trans-activación como los mostrados en esta tesis.

La generación de plantas transgénicas de *Prunus persica* que presenten modificaciones en la expresión de *PpCbf*, permitirían evaluar cambios en la expresión génica y los efectos que este gen tiene en el desarrollo del daño por frío en los frutos de estas plantas.

9.- REFERENCIAS

- Allen, M.D., Yamasaki, K., Ohme-Takagi, M., Tateno, M., Suzuki, M. 1998. A novel mode of DNA recognition by a beta-sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *EMBO J* 17: 5484-5496.
- Arora, R., Wisniewski, M.E. 1994. Cold acclimation in genetically related (Sibling) deciduous and evergreen peach (*Prunus persica* [L.] Batsch). *Plant Physiol.* 105: 95-101.
- Audic, S., Claverie, J.M. 1997. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res.* 7: 986-995.
- Baker, S.S., Wilhelm, K.S., Thomashow, M.F. 1994. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol Biol.* 24: 701-13.
- Brummell, D., Dal Cin, V., Lurie, S., Crisosto, C., Labavitch, J. 2004. Cell wall metabolism during the development of chilling injury in cold-stored peach fruit: association of mealiness with arrested disassembly of cell wall pectins. *Journal of Exp. Botany* 55:2041-2052.
- Bräutigam, M., Lindlöf, A., Zakhrebekova, S., Gharti-Chhetri, Olsson, B., Olsson, O. 2005. Generation and analysis of 9792 EST sequences from cold acclimated oat, *Avena sativa*. *BMC Plant Biology.* 5: 18.
- Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 25: 169-193.
- Bustin, S.A., Nolan, T. 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques.* 15: 155-166.
- Clough, S.J., Bent, A.F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal.* 16:735-743.
- Dobouzet, J.G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dobuzet, E.G., Miura, S., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2003. OsDREB gene in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal.* 33: 751-763.
- Ewing, B., Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. II. Error probabilities. *Genome Research.* 8:186-194.
- Fowler, S., Thomashow, M.F. 2002. *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *The Plant Cell.* 14: 1675-1690.

Gachon, C., Mingam, A., Charrier, B. 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies *J Exp Bot.* **55**: 1445-1454.

Gilmour, S.J., Fowler, S.G., Thomashow, M.F. 2004. Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2 and CBF3 have matching functional activities. *Plant Mol Biol.* **54**: 767-781.

Gilmour, S.J., Sebolt, A.M., Salazar, M.P., Everard, J.D., Thomashow, M.F. 2000. Overexpression of the Arabidopsis CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol.* **124**: 1845-1865.

Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Stockinger, E.J., Salazar, M.P., Houghton, J.M., Thomashow, M.F. 1998. Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *The Plant Journal.* **16**: 433-442.

Hugget, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A. 2005. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes and Immunity.* **6**: 279-284.

Ito, Y., Katsura, K., Maruyama, K., Taji, T., Kobayashi, M., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2006. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol.* **47**: 141-153.

Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Schabenberger, O., Thomashow, M.F. 1998. Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science.* **280**: 104-106.

Jaglo-Ottosen, K.R., Kleff, S., Amundsen, K.L., Zhang, X., Haake, V., Zhang, J.Z., Deits, T., Thomashow, M.F. 2001. Components of the arabidopsis C-Repeat/Dehydration-Responsive Element Binding Factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiol.* **127**: 910-917.

Kayal, W., Navarro, M., Marque, G., S  ller, G., Marque, C., Teulieres, C. 2006. Expresión profile of CBF-like transcriptional factor genes from Eucalyptus in response to cold. *J Exp Bot.* **57**: 2455-2469.

Kitashiba, H., Ishizaka, T., Isuzugawa, K., Nishimura, K., Suzuki, T. 2004. Expression of a sweet cherry DREB1/CBF ortholog in Arabidopsis confers salt and freezing tolerance. *J Plant Physiol.* **161**: 1171-1176.

Lill, R., O'Donoghue, E. and King, G. 1989. Postharvest physiology of peaches and nectarines. *Horticultural Reviews.* **11**:413-452.

- Magote, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya, Y., Oda, K.** 2004. dwarf and delayed-flowering 1, a novel Arabidopsis mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *The Plant Journal*. **37**: 720-729
- Marín-Rodríguez, M.C., Orchard, J., Seymour, G.B.** 2002. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *J Exp. Bot.* **53**: 2115-2119.
- Maruyama, K., Sakuma, Y., Kasuga, M., Ito, Y., Seki, M., Goda, H., Shimada, Y., Yoshida, S., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.** 2004. Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *The Plant Journal*. **38**: 982-993.
- McKown, R., Kuroki, G., Warren, G.** 1996. Cold responses of Arabidopsis mutants impaired in freezing tolerance. *J Exp. Bot.* **47**: 1919-1925.
- Medina, J., Bargues, M., Terol, J., Pérez-Alonso, M., Salinas, J.** 1999. The Arabidopsis CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiol.* **119**: 463-469.
- Meisel, L., Fonseca, B., González, S., Baeza-Yates, R., Cambiazo, V., Campos, R., Gonzales, M., Orellana, A., Retamales, J., Silva, H.** 2005. A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomics analyses. *Biol Res.* **38**: 83-88.
- Okamoto, J.K., Caster, B., Villarroel, R., Van Montagu, M., Jofuku, K.D.** 1997. The AP2 domain of *APETALA2* defines a large new family of DNA binding proteins in Arabidopsis. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 7076-7081.
- Sambrook J, Manniatis T, Fritsch EF.** (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Manniatis T and Sambrook Editores. Cold Spring Harbor Laboratory Press Edit Second Edition. New York.
- Savitch, L.V., Allard, G., Seki, M., Robert, L.S., Tinker, L.A., Huner, N.P., Shinozaki, K., Singh, J.** 2005. The effect of overexpression of two Brassica CBF/DREB1-like transcription factors on photosynthetic capacity and freezing tolerance in *Brassica napus*. *Plant Cell Physiol.* **46**: 1525-1539.
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J., Thomashow, M.F.** 1997. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 1035-1040.

- Stockinger, E.J., Mao, Y., Regier, M.K., Triezenberg, S.J., Thomashow, M.F.** 2001. Transcriptional adaptor and histone acetyltransferase proteins in Arabidopsis and their interactions with CBF1, a transcriptional activator involved in cold-regulated gene expression. *Nucleic Acids Res.* **29**: 1524-1533.
- Thomashow, M.F.** 1998. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol.* **118**: 1-7.
- Thomashow, M.F.** 1999. Freezing tolerance genes and regulatory mechanism. 1999. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* **50**: 571-599.
- Vlachonasios, K.E., Thomashow, M.F., Triezenberg, S.J.** 2003. Disruption mutations of ADA2 and GCN5 transcriptional adaptor genes dramatically affect Arabidopsis growth, development, and gene expression. *The Plant Cell.* **15**: 626-638.
- Vogel, J.T., Zarka, D.G., Van Buskirk, H.A., Fowler, S.G., Thomashow, M.F.** 2005. Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of Arabidopsis. *The Plant Journal.* **41**: 195-211.
- Volkov, R.A., Panchuk, I.I., Schöffl, F.** 2003. Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR. *J Exp Bot.* **54**: 2343-2349.
- Warren, G., McKown, R., Marin, A., Teutonico, R.** 1996. Isolation of mutations affecting the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* **111**: 1011-1019.
- Wisniewski, M.E., Bassett, C.L., Renaut, J., Farrell, R., Tworkoski, T., Artlip, T.S.** 2006. Differential regulation of two dehydrin genes from peach (*Prunus persica*) by photoperiod, low temperature and water deficit. *Tree Physiology.* **26**: 575-584.
- Wong, C.E., Li, Y., Whitty, B.R., Diaz-Camino, C., Akhter, S.R., Brandle, J.E., Golding, G.B., Weretilnyk, E.A., Moffatt, B.A., Griffith, M.** 2005. Expressed sequence tags from the Yukon ecotype of *Thellungiella* reveal that gene expression in response to cold, drought and salinity shows little overlap. *Plant Mol Biol.* **58**: 561-574.
- Xin, Z., Browse, J.** 1998. *eskimo1* mutants of Arabidopsis are constitutively freezing-tolerant. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 7799-7804.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.** 1994. A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress *The Plant Cell.* **6**: 251-264.

Zarka, D.G., Vogel, J.T., Cook, D., Thomashow, M.F. 2003. Cold induction of Arabidopsis CBF genes involves multiple ICE (Inducer of CBF Expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature. *Plant Physiol.* **133**: 910-918.

Zhang, X., Fowler, S.G., Cheng, H., Lou, Y., Rhee, S.Y., Stockinger, E.J., Thomashow, M.F. 2004. Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant Arabidopsis. *The Plant Journal.* **39**: 905-919.

Zhou, C., Yang, Y., Jong, Y. 1990. Miniprep in ten minutes. *Biotech.* **8**: 172-172

Zhu, J., Shi, H., Lee, B., Damsz, B., Cheng, S., Stirn, V., Zhu, J., Hasegawa, P., Bressan, R. 2004. An Arabidopsis homeodomain transcription factor gene, HOS9, mediates cold tolerance through a CBF-independent pathway. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**: 9873-9878.

10.- ANEXOS

Unigenes que cambian su expresión en frutos de durazno expuestos al frío, de acuerdo a análisis de expresión digital

Los análisis de expresión digital se desarrollaron para todos los contigs generados a partir del proyecto de Genómica Funcional en Nectarines. Es posible obtener grupos de contigs basándose en el perfil de expresión digital que estos presenten. Considerando que los estadios E1 y E3 representan muestras que han sido expuestas al frío, se generaron los grupos de expresión que se muestran en las tablas 3-6.

Tabla 3: Unigenes expresados preferentemente en E1. En la columna 2 se indica el locus del posible ortólogo de Arabidopsis para el gen de durazno correspondiente. En esta columna se agrega una notación en la cual se indica si este gen de Arabidopsis frente al tratamiento con frío: A= aumenta; D= disminuye ó I= no varia. Además NC= no pertenece al regulón CBF; C= Pertenece al regulón CBF. Las columnas 4-7 indican la abundancia de ESTs en cada estadio para el gen de durazno correspondiente. La columna 8 indica el perfil de expresión obtenido por el método de Audic y Claverie (1997) usando la abundancia de ESTs. E1: Frutos salidos de empaque (tratados a 4 ° C durante el transporte); E2: Frutos maduros y jugosos (empaque + 4 días a 20 °C); E3: Frutos salidos de frío (empaque + 21 días a 4 °C); E4: Frutos maduros y harinosos (Frutos de E3 expuestos 4 días a 20 °C)

Unigen	Ortólogo en Arabidopsis	Descripción	E1	E2	E3	E4	Perfil de expresión digital
Contig3683	AT4G24780 D/NC	Pectato liasa	137	65	9	91	E1>E2;E4>E3
Contig1437	AT4G38580 A/C	Proteína de transporte de metales pesados	88	13	17	9	E1>E2;E3;E4
Contig1609	AT3G14440 A/NC	9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa	45	13	6	15	E1>E2;E3;E4
Contig229	AT5G59845 D/NC	Proteína regulada por giberalina	58	11	14	9	E1>E2;E3;E4
Contig2311	AT4G02380 A/NC	Proteína de la familia LEA3	64	6	35	3	E1>E3>E2;E4
Contig266	AT2G26110 I/NC	No anotación (idéntico a cDNA clone PP_LEa0016A19f)	12	0	0	0	E1>E2;E3;E4
Contig287	no encontrado	Proteína inducida por estrés abscisico (relacionada con maduración)	488	161	221	41	E1>E2;E3>E4
Contig3598	AT5G62350 A/C	Proteína de la familia de inhibidores de pectin metilesterasa	202	85	62	68	E1>E2;E3;E4
Contig365	AT4G27450 D/NC	Proteína desconocida (idéntica a cDNA clone PP_LEa0003H16f)	47	2	0	7	E1>E2;E3;E4
Contig395	AT5G23950 I/NC	Similar al gen regulado por frío SRC2 (Glycine max)	23	5	7	4	E1>E2;E3;E4
Contig451	AT5G59845 D/NC	Proteína regulada por giberalina	25	7	2	2	E1>E2;E3;E4

Contig55	AT2G21660 A/C	Proteína de unión a RNA rica en glicina	72	17	17	12	E1>E2;E3;E4
Contig59	AT5G62360 A/C	Proteína de la familia de inhibidores de pectin metilesterasa	54	4	23	2	E1>E3>E2;E4
Contig639	AT1G01620 D/NC	Proteína intrínseca de membrana (acuaporina)	100	29	33	30	E1>E2;E3;E4
Contig671	AT1G56600 A/NC	Galactinol sintasa	33	0	0	0	E1>E2;E3;E4
Contig795	AT3G02885 D/NC	Proteína regulada por giberalina	58	19	2	14	E1>E3<E2;E4
Contig9	AT5G59845 D/NC	Proteína regulada por giberalina	84	27	20	18	E1>E2;E3;E4

Tabla 4: Unigenes expresados preferentemente en E3. En la columna 2 se indica el locus del posible ortólogo de Arabidopsis para el gen de durazno correspondiente. En esta columna se agrega una notación en la cual se indica si este gen de Arabidopsis frente al tratamiento con frío: A= aumenta; D= disminuye ó I= no varia. Además NC= no pertenece al regulón CBF; C= Pertenece al regulón CBF. Las columnas 4-7 indican la abundancia de ESTs en cada estadio para el gen de durazno correspondiente. La columna 8 indica el perfil de expresión obtenido por el método de Audic y Claverie (1997) usando la abundancia de ESTs. E1: Frutos salidos de empaque (tratados a 4 ° C durante el transporte); E2: Frutos maduros y jugosos (empaque + 4 días a 20 ° C); E3: Frutos salidos de frío (empaque + 21 días a 4 ° C); E4: Frutos maduros y harinosos (Frutos de E3 expuestos 4 días a 20 ° C)

Unigen	Ortólogo en Arabidopsis	Descripción	E1	E2	E3	E4	Perfil de expresión digital
Contig1027	AT3G09440 A/NC	Proteína de shock térmico (HSP70)	21	18	47	7	E3>E2;E3;E4
Contig1240	no encontrado	idéntica a cDNA clone S316H4	8	4	62	8	E3>E2;E3;E4
Contig1258	AT3G03520 D/NC	Proteína de la familia de fosfoesterasa	0	2	19	0	E3>E2;E3;E4
Contig1479	AT5G06320 A/NC	Familia de proteínas inductoras de horquilla	4	13	96	8	E3>E2;E3;E4
Contig1660	AT2G31980 I/NC	Inhibidor de proteinasas	4	8	51	13	E3>E2;E3;E4
Contig1708	AT1G20030 A/NC	Taumatina (relacionada con patogénesis)	1	2	30	9	E3>E2;E3;E4
Contig2089	AT1G16850 A/C	Proteína abundante en embriogénesis tardía (LEA)	0	0	20	0	E3>E2;E3;E4
Contig2091	AT1G62790 I/NC	Proteína de la familia de inhibidor de proteasa/almacenamiento de semilla/transferencia de lípidos	0	0	18	0	E3>E2;E3;E4
Contig2099	AT3G02720 A/NC	Proteína de la familia DJ1 (relacionada con proteasa)	0	1	13	0	E3>E2;E3;E4
Contig2112	AT1G07750 A/NC	Proteína de almacenamiento de semilla (Cupina)	0	1	31	1	E3>E2;E3;E4
Contig2131	AT3G12500 D/NC	Endoquitinasa básica	0	0	65	2	E3>E2;E3;E4
Contig2139	no encontrado	idéntica a cDNA clon S315G13	0	0	12	0	E3>E2;E3;E4
Contig2265	no encontrado	Proteína tipo metalotioneína	29	2	91	7	E3>E1>E2;E4
Contig228	AT3G02720 D/NC	Proteína de la familia DJ1 (relacionada con proteasa)	44	3	112	4	E3>E1>E2;E4
Contig2317	AT1G20030 A/NC	Taumatina (relacionada con patogénesis)	0	2	67	4	E3>E2;E3;E4

Contig2397	AT5G15950 A/NC	S-adenosilmetionina descarboxilasa	4	4	27	1	E3>E2;E3;E4
Contig2436	AT1G63120 D/NC	Proteína de la familia tipo romboide	0	3	17	0	E3>E2;E3;E4
Contig2473	no encontrado	Alérgeno	0	0	10	0	E3>E2;E3;E4
Contig2528	AT3G04720 D/NC	Proteína relacionada con patogénesis	3	2	22	2	E3>E2;E3;E4
Contig254	AT3G50970 A/C	Deshidrina Xero2	10	0	71	0	E3>E1>E2;E4
Contig2554	AT2G22590 A/C	Putativa antocianidin-3-glucósido ramnosiltransferasa	0	2	17	1	E3>E2;E3;E4
Contig2669	AT4G35630 D/NC	Fosfoserina aminotransferasa	8	8	61	12	E3>E2;E3;E4
Contig2715	AT5G28540 I/NC	Proteína de shock térmico (HSP70)	4	7	41	10	E3>E2;E3;E4
Contig2831	no encontrado	Proteína básica rica en prolina	4	0	20	2	E3>E2;E3;E4
Contig2957	AT1G02640 D/NC	Proteína de la familia de Glicosil hidrolasas	0	0	11	0	E3>E2;E3;E4
Contig2988	AT5G06870 D/NC	Proteína de inhibición de poligalacturonasa	6	0	37	0	E3>E2;E3;E4
Contig30	AT2G15970 A/C	Proteína de aclimatación a frío similar a WCOR413 (WCOR413-PM1)	15	7	57	5	E3>E2;E3;E4
Contig304	AT1G20440 A/C	Deshidrina COR47	67	25	189	32	E3>E1>E2;E4
Contig379	AT3G02720 D/NC	Proteína de la familia DJ1 (relacionada con proteasa)	20	1	50	0	E3>E1>E2;E4
Contig910	AT5G24090 I/NC	Endoquitinasa ácida	3	6	126	29	E3>E4>E1;E2
Contig2147	AT1G20030 A/NC	Taumatina (Relacionada con patogénesis)	0	0	8	0	E3>E2;E3;E4
Contig2177	AT1G20030 A/NC	Taumatina (Relacionada con patogénesis)	0	3	15	1	E3>E2;E3;E4
Contig2308	AT3G12580 D/NC	Putativa proteína de shock térmico (HSP70)	0	0	9	0	E3>E2;E3;E4

Tabla 5: Unigenes que disminuyen su expresión en E3. En la columna 2 se indica el locus del posible ortólogo de Arabidopsis para el gen de durazno correspondiente. En esta columna se agrega una notación en la cual se indica si este gen de Arabidopsis frente al tratamiento con frío: A= aumenta; D= disminuye ó I= no varía. Además NC= no pertenece al regulón CBF; C= Pertenece al regulón CBF. Las columnas 4-7 indican la abundancia de ESTs en cada estadio para el gen de durazno correspondiente. La columna 8 indica el perfil de expresión obtenido por el método de Audic y Claverie (1997) usando la abundancia de ESTs. E1: Frutos salidos de empaque (tratados a 4 °C durante el transporte); E2: Frutos maduros y jugosos (empaque + 4 días a 20 °C); E3: Frutos salidos de frío (empaque + 21 días a 4 °C); E4: Frutos maduros y harinosos (Frutos de E3 expuestos 4 días a 20 °C)

Unigen	Ortólogo en Arabidopsis	Descripción	E1	E2	E3	E4	Perfil de expresión digital
Contig1200	AT1G69530 D/C	Expansina 1 (EXP1)	62	64	0	62	E3<E1;E2;E4
Contig128	AT3G04730 D/NC	Proteína inducida por auxina	28	37	7	44	E3<E1;E2;E4
Contig14	AT1G09310 I/NC	Proteína de función desconocida	15	47	2	36	E3<E1<E2;E4

Contig1945	AT4G25250 D/NC	Proteína de la familia de inhibidores de pectinmetilesterasa	56	71	26	72	E3<E1;E2;E4
Contig2158	AT2G45180 I/NC	Proteína de la familia de inhibidor de proteasa/almacenamiento de semilla/transferencia de lípidos	108	64	38	109	E3<E2<E1;E4
Contig2208	AT2G16600 I/NC	Peptidil-propil isomerasa	21	29	6	42	E3<E1;E2;E4
Contig257	no encontrado	Alérgeno	72	135	30	157	E3<E1<E2;E4
Contig3384	AT4G08685 I/NC	Alérgeno	20	21	5	24	E3<E1;E2;E4
Contig3478	no encontrado	idéntica a cDNA clon PP_LEa0001A20f	79	177	0	316	E3<E1<E2<E4
Contig3683	AT4G24780 D/NC	Pectato liasa	137	65	9	91	E3<E2;E4<E1
Contig418	AT3G08030 I/NC	Proteína de función desconocida	9	12	0	28	E3<E1;E2;E4
Contig795	AT1G74670 D/NC	Proteína regulada por giberelina	58	19	2	14	E3<E2;E4<E1
Contig930	no encontrado	Idéntica a AC154901.1 Prunus persica (durazno) BAC 82118	410	634	169	357	E3<E1;E4<E2

Tabla 6: Unigenes expresados preferentemente E1 y E3 con respecto a E2 y E4. En la columna 2 se indica el locus del posible ortólogo de Arabidopsis para el gen de durazno correspondiente. En esta columna se agrega una notación en la cual se indica si este gen de Arabidopsis frente al tratamiento con frío: A= aumenta; D= disminuye ó I= no varía. Además NC= no pertenece al regulón CBF; C= Pertenece al regulón CBF. Las columnas 4-7 indican la abundancia de ESTs en cada estadio para el gen de durazno correspondiente. La columna 8 indica el perfil de expresión obtenido por el método de Audic y Claverie (1997) usando la abundancia de ESTs. E1: Frutos salidos de empaque (tratados a 4 ° C durante el transporte); E2: Frutos maduros y jugosos (empaque + 4 días a 20 °C); E3: Frutos salidos de frío (empaque + 21 días a 4 °C); E4: Frutos maduros y harinosos (Frutos de E3 expuestos 4 días a 20 °C)

Unigen	Ortólogo en Arabidopsis	Descripción	E1	E2	E3	E4	Perfil de expresión digital
Contig4	AT3G02720 D/NC	Proteína de la familia DJ1 (relacionada con proteasa)	26	4	32	0	E1;E3<E2;E4
Contig435	AT3G61260 I/NC	Proteína de unión a DNA (Remorina)	20	5	19	4	E1;E3<E2;E4
Contig2956	AT3G02720 D/NC	Proteína de la familia DJ1 (relacionada con proteasa)	14	0	22	0	E1;E3<E2;E4
Contig92	AT3G18830 A/NC	Proteína transportadora de azúcar	9	0	9	0	E1;E3<E2;E4
Contig2980	AT5G58070 A/NC	Lipocalina inducida por temperatura	29	4	17	2	E1;E3<E2;E4

Cuantificación por RT-qPCR

Como ejemplo se muestra el procedimiento seguido para el gen *Wcor413*. Lo primero fue normalizar los resultados para la muestra. Para ello se obtuvo un promedio de las replicas técnicas del gen en cuestión, el cual se dividió por el promedio obtenido para la amplificación del control externo del PCR (kanamicina). De los valores normalizados se identificó cual es el mayor y a este se le asignó un valor de 100%. Para los demás valores normalizados se determinó un porcentaje que es relativo al 100% ya mencionado. Los valores obtenidos al aplicar este procedimiento a los resultados del gen *Wcor413* se pueden observar en la Tabla 7:

Tabla 7: Resultados de RT-qPCR para *Wcor413*. Los experimentos se realizaron en triplicado biológico (muestras A, B y C). La cifra en destacada en **negrita** en la cuarta columna, representa el valor más alto de la relación *Wcor413/kan*. Este valor se consideró como 100% y se usó como base para el cálculo de los otros porcentajes.

Muestra	Promedio réplica técnica <i>Wcor413</i> (ng)	Promedio réplica técnica de kanamicina	Razón <i>Wcor413/kan</i>	% del máximo
E1A	0,945	0,0019	491,420	19,159
E2A	0,12	0,0020	60,837	2,372
E3A	3,645	0,0020	1779,785	69,387
E4A	0,22	0,0023	96,280	3,754
E1B	1,785	0,0019	950,479	37,056
E2B	0,22	0,0024	92,945	3,624
E3B	4,39	0,0017	2565,001	100
E4B	0,36	0,0019	189,673	7,395
E1C	1,133	0,0016	712,309	27,770
E2C	0,259	0,0019	139,918	5,455
E3C	3,799	0,0018	2139,805	83,423
E4C	0,351	0,0017	209,451	8,166

Una vez obtenido los porcentajes relativos a la muestra que presenta mayor expresión, se procedió a promediar los valores obtenidos para cada muestra biológica (Tabla 8). Este

valor promedio de los porcentajes es el que se graficó y se presenta como resultado del qPCR. La barra de error que se observa en el gráfico generado corresponde a la desviación estándar que se indica en la Tabla 8.

Tabla 8: Obtención de los valores a graficar para resultado de qPCR de Wcor413. Los valores provienen de la columna “% del máximo” de la tabla 7.

Estadio	Muestra A	Muestra B	Muestra C	Promedio	Desviación estándar
E1	19,159	37,056	27,770	27,995	5,168
E2	2,372	3,624	5,455	3,817	0,895
E3	69,387	100	83,423	84,270	8,847
E4	3,754	7,395	8,166	6,438	1,361

Chequeo de RNA usado para RT-qPCR

La integridad del RNA utilizado para los ensayos de RT-qPCR, se evaluó corriendo un gel de agarosa 1.5%. Como se puede observar en la figura 10, hay una clara definición de las bandas de RNA ribosomal 28S y 18S. Esto da cuenta de la buena calidad del RNA utilizado. Por otra parte, la comparación de la intensidad de las bandas entre las 4 muestras cargadas, permite determinar que se usó cantidades similares de RNA total en la reacciones de transcripción reversa.

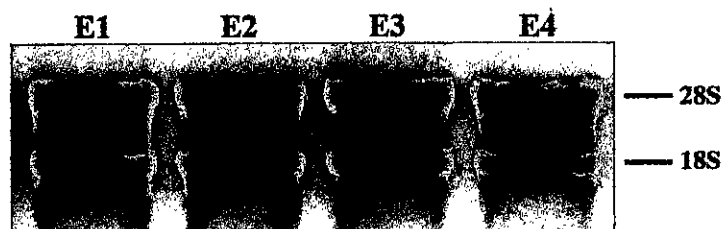


Figura 10: Análisis cualitativo de RNA usado para RT-qPCR. En cada carril se cargo 2.5 µg de RNA proveniente del estadio indicado. Las intensidad de las bandas es similar entre cada una de las muestras, de manera que esto asegura que las cantidades de templado para cada reacción de transcripción reversa fueron similares. Por otra parte es posible observar que la banda de 28S representa aproximadamente el doble en intensidad con respecto a 18S, lo que es indicador de la buena integridad del RNA utilizado. Este gel es representativo de las 12 muestras que fueron usadas para la transcripción reversa.