

UCH-FC  
Biotecnología  
V494  
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

**“ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE AGENTES  
QUÍMICOS Y FÍSICOS SOBRE LA SALIDA DE LAS YEMAS DE  
LA ENDODORMANCIA EN *VITIS VINIFERA* CV. THOMPSON  
SEEDLESS”.**



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

Por el Sr.:

Ricardo Alejandro Vergara González

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

Junio, 2009  
Santiago - Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título presentado por el Sr.:

**RICARDO ALEJANDRO VERGARA GONZÁLEZ**

### “ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE AGENTES QUÍMICOS Y FÍSICOS SOBRE LA SALIDA DE LAS YEMAS DE LA ENDODORMANCIA EN *VITIS VINIFERA* CV. THOMPSON SEEDLESS”.

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

*Dr. Francisco Pérez Correa*  
**Director Seminario de Título**

Handwritten signature of Francisco Pérez Correa in black ink, written over a horizontal line.



**Comisión de Evaluación**

*Dr. Michael Handford*  
**Presidente Comisión**

Handwritten signature of Michael Handford in blue ink, written over a horizontal line.

*Dra. Victoria Guixé Leguía*  
**Evaluadora**

Handwritten signature of Victoria Guixé Leguía in black ink, written over a horizontal line.

Santiago de Chile, Junio, 2009



Siempre me ha interesado el área de las plantas. Mis primeras aproximaciones fueron a muy temprana edad, ya en la básica me acuerdo que me gustaba hacer los experimentos de germinación de granos de porotos y lentejas. Recuerdo muchas veces haber plantado los brotes y que luego de un tiempo, se usaba el poroto verde en las comidas. En este mismo tema, creo que mi máximo logro fue realizado, para sorpresa mía, cuando de un hueso de durazno surgió una pequeña plántula, recuerdo haberla cuidado, y posteriormente la planté en el patio de mi casa. Muchos años pasaron hasta el momento de su primera floración, y sus primeros 6 pequeños frutos. Ya en la primavera de este año que pasó, me encontré con un árbol de unos tres metros, lleno de flores rosadas, y posteriormente aprovechamos en familia de sus dulces frutos. Así, el fenómeno de brotación de frutales es algo que me atrae y me estimula, y pretendo en el futuro seguir por este camino de investigación.

## AGRADEMICIENTOS



Me he caracterizado por ser una persona de pocas palabras, así es que en resumidas cuentas, quisiera agradecer primero que todo a mi familia, por todo su amor y apoyo. Agradecer también al Dr. Francisco Pérez (“El profe”) por las constantes conversaciones y su guía. A Sebastián Rubio (“El Seba”) por su disposición siempre a colaborar, y no puedo dejar de mencionar a don Oscar, cuya labor fue fundamental para mí, y finalmente, agradecer a la gente que conocí en Santiago, que me acompañó y me brindó su amistad y cariño en los distintos periodos de la carrera.



## ÍNDICE

PORTADA	_____	pág. i
BIOGRAFÍA	_____	pág. ii
AGRADECIMIENTOS	_____	pág. iii
ÍNDICE	_____	pág. iv
ÍNDICE DE TABLAS	_____	pág. v
ÍNDICE DE FIGURAS	_____	pág. vi
ABREVIATURAS	_____	pág. vii
RESUMEN	_____	pág. ix
ABSTRACT	_____	pág. xi
I. INTRODUCCIÓN	_____	pág. 1
II. HIPÓTESIS	_____	pág. 12
III. OBJETIVO GENERAL	_____	pág. 12
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	_____	pág. 12
V. MATERIALES Y MÉTODOS	_____	pág. 13
VI. RESULTADOS	_____	pág. 22
VII. DISCUSIÓN	_____	pág. 44
VIII. CONCLUSIONES	_____	pág. 52
IX. PROYECCIONES	_____	pág. 54
X. BIBLIOGRAFÍA	_____	pág. 55



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	_____	pág. 18
Tabla 2	_____	pág. 19
Tabla 3	_____	pág. 25
Tabla 4	_____	pág. 33



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	_____	pág. 2
Figura 2	_____	pág. 4
Figura 3	_____	pág. 10
Figura 4	_____	pág. 21
Figura 5	_____	pág. 23
Figura 6	_____	pág. 24
Figura 7	_____	pág. 27
Figura 8	_____	pág. 28
Figura 9	_____	pág. 30
Figura 10	_____	pág. 31
Figura 11	_____	pág. 33
Figura 12	_____	pág. 35
Figura 13	_____	pág. 37
Figura 14	_____	pág. 38
Figura 15	_____	pág. 40
Figura 16	_____	pág. 41
Figura 17	_____	pág. 43
Figura 18	_____	pág. 51

## ABREVIATURAS

ASC: Ascorbato.

AMT: Aminotriazol.

APX: Ascorbato Peroxidasa.

BGLU: 1,3- $\beta$ -Glucanasa.

BLAST: Herramienta básica de búsqueda de alineamiento local.

BLAT: Herramienta de alineamiento tipo Blast (Blast-Like Alignment Tool).

BR<sub>50</sub>: Brotación del 50% de una población de yemas.

CAG: Ciclo Ascorbato Glutación.

CAT: Catalasa.

cDNA: DNA complementario.

CTAB: Bromuro de Cetiltrimetilamonio (Cetil Trimethyl Ammonium Bromide).

DDT: Días Después del Tratamiento.

DEPC: Dietilpirocarbonato.

DHA: Dehidroascorbato, Ascorbato oxidado.

DHAR: Dehidroascorbato Reductasa.

DTNB: Ditionitrobenzeno (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)).

ECD: Ecodormancia.

ED: Endodormancia

EDTA: Ácido Etileno Diamino Tetracético (Ethylene Diamide Tetraacetic Acid).

FC: Condiciones Forzadas de Crecimiento (Forcing Conditions).



GR: Glutación Reductasa.

GS:  $\beta$ -1,3-Glucano Sintasa (Callosa Sintasa).

GSH: Glutación, Glutación Reducido.

GSSG: Glutación Oxidado.

G6PDH: Glucosa-6- Fosfato Deshidrogenasa.

HC: Cianamida Hidrogenada (Hydrogen cyanamide).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de Hidrógeno.

MA: Meristema Apical.

NADPH: Nicotinamida Dinucleótido Fosfato (reducido).

NaI: Yoduro de Sodio.

MP: Membrana Plasmática.

NaN<sub>3</sub>: Azida de Sodio.

PC: Pared Celular.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction).

PD: Paradormancia.

PR: Relacionadas a Patogénesis (Pathogenesis Related).

PVP: Polivinil Polipirrilidona (Polyvinyl Polypyrrolidone).

SA: Ácido Salicílico.

SSA: Ácido Sulfosalicílico (Sulfosalicylic Acid).

VPF: Vía de las Pentosas Fosfato

## RESUMEN

La vid (*Vitis vinifera* L) como planta perenne leñosa ajusta su ciclo de crecimiento y dormancia a los cambios estacionales. A lo largo del año alterna una etapa de desarrollo en primavera-verano con otra etapa de dormancia y tolerancia al frío durante la temporada de otoño-invierno. Durante la etapa de crecimiento en la axila de cada hoja se forma una estructura que se conoce como yema. Es esta yema la que entra en dormancia, y es la encargada de reanudar el crecimiento cuando las condiciones ambientales así lo permiten. El cultivo de la vid en zonas de inviernos cálidos como la III y IV región de Chile es problemático, ya que siendo la vid una planta de clima templado, al ser introducida a zonas subtropicales brota de manera incompleta y desuniforme. Para obtener una brotación homogénea y una producción viable comercialmente es necesaria la utilización de agentes químicos que de alguna forma sustituyan los efectos del frío invernal. La cianamida hidrogenada (HC) es el compuesto químico más utilizado para estos fines y es universalmente considerado como un inductor de la brotación de yemas y un rompedor de la dormancia; sin embargo, su mecanismo de acción aún no está dilucidado. En este trabajo se evaluó el efecto de azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ), un conocido inhibidor de la respiración mitocondrial, sobre la inducción de la brotación de yemas de vid cv. Thompson Seedless, y sus efectos a nivel molecular fueron comparados con los efectos de HC y del frío. Los resultados mostraron que tanto HC como  $\text{NaN}_3$  estimulan de forma similar la brotación de yemas de vid. Además, ambos compuestos promovieron la transcripción de genes relacionados con el sistema antioxidativo, como son la

glutación reductasa (VvGR) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (VvG6PDH), lo que tuvo un efecto directo sobre la relación GSH/GSSG del tejido. Ambos compuestos estimularon también la transcripción de 1,3- $\beta$ -glucanasas (VvBGLUs), enzimas clave en la salida de las yemas de la endodormancia (Rinne *et al.*, 2001). Por otro lado, en un estudio previo se observó que HC aumenta mientras que NaN<sub>3</sub> disminuye los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los tejidos de yemas de vid (Pérez *et al.*, 2008), por lo cual se evaluó el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tanto sobre el perfil de expresión de VvBGLUs, VvGR y VvG6PDH como sobre la brotación de yemas. Los resultados demostraron que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no estimula la expresión de estos genes y que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presenta un mínimo efecto sobre la brotación de yemas de vid. Finalmente, en esta tesis se propone que el efecto promotor de HC y NaN<sub>3</sub> sobre la brotación en yemas de vid se debería a alteraciones respiratorias que aumentarían la vía glicolítica afectando los niveles de glucosa-6-fosfato (G6P) en el tejido, lo que a su vez actuaría como una señal que induce la transcripción de genes relacionados con la salida de la dormancia y la inducción de la brotación de las yemas.

## ABSTRACT

Grapevine (*Vitis vinifera L*) as a woody perennial plant adjusts its growth-dormancy cycle to environmental changes. Along the year it alternates a development stage during the spring-summer season with a dormancy and freezing-tolerant stage during the autumn-winter season. While the growing stage lasts in each leaf axil emerge and develop a structure known as bud that enters into dormancy, and that is responsible to resume growth when there are permissive environmental conditions.

Commercial production of grapevine in warm-winter zones such as the III and IV regions in Chile, is problematic due to low and uneven bud break. To obtain homogeneous bud break and commercially feasible productions chemical agents are required for somehow substituting winter chilling effects. Hydrogen cyanamide (HC) is the most used chemical compound for these purposes and it is widely considered as a bud break inductor and a dormancy releaser for grapevine buds; nevertheless, its mechanism of action is not yet elucidated. In this work the effect of sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ), a known mitochondrial respiration inhibitor, was assessed on the induction of bud break in grapevine cv. Thompson Seedless, and its effect at the molecular level compared with those produced by HC applications and chilling treatments. Results showed that both HC and  $\text{NaN}_3$  stimulate bud break in grapevines in a similar fashion. Moreover, both compounds promoted the transcription of genes related to the anti-oxidative system, such as glutathione reductase (VvGR) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (VvG6PDH), and increased the GSH/GSSG ratio. Both compounds

promoted also the transcription of 1,3- $\beta$ -glucanases (VvBGLUs), key enzymes on bud endodormancy release (Rinne *et al.*, 2001). On the other hand, in a previous study it was observed that HC increases while  $\text{NaN}_3$  decreases  $\text{H}_2\text{O}_2$  levels within the bud tissue (Pérez *et al.*, 2008); that is why the effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was assessed on the expression of VvBGLUs, VvGR and VvG6PDH, and in bud break. Results showed that  $\text{H}_2\text{O}_2$  did not stimulate the expression of these genes and exhibited a marginal effect on bud break. Finally, in this thesis is proposed that bud break stimulatory effect of HC and  $\text{NaN}_3$  in grapevines might be due to respiratory disturbances which increase the glycolytic pathway affecting thus the glucose-6-phosphate (G6P) levels within the tissue. The initial reduction in sugar levels in turn, might act as a signal, inducing the transcription of genes related with dormancy release and bud break.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Dormancia

Biológicamente, la dormancia es una respuesta frente a una serie de estímulos como la deshidratación, las bajas temperaturas, el fotoperíodo, y se manifiesta como la suspensión temporal del crecimiento.

#### 1.1.1. Dormancia de yemas

Las plantas perennes de climas templados desarrollaron mecanismos para ajustar su crecimiento y desarrollo a los cambios estacionales. La sincronización del crecimiento y desarrollo con las estaciones se conoce como “ciclo de dormancia” (Lang, 1994). Este ciclo consiste en la alternancia de fases de crecimiento y de receso a lo largo de las estaciones a fin de asegurar la reproducción y permanencia de la especie. Las plantas perennes se adelantan a los cambios estacionales percibiendo y sensando variables ambientales. Dado que los cambios en el fotoperíodo son absolutamente regulares, proveen por tanto de una señal ideal para la sincronización del desarrollo de la planta con los cambios estacionales (Rinne *et al.*, 2001) (Fig.1). Efectivamente, gran parte de las plantas perennes leñosas sensan y perciben el fotoperíodo a través de los fitocromos como una forma de sincronizar su crecimiento y desarrollo a los cambios de estación.

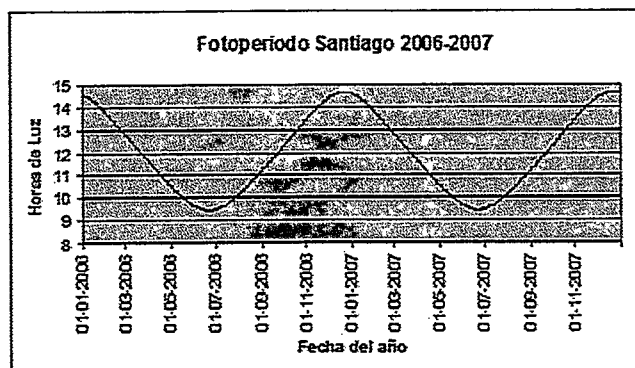


Figura 1. Cambios en el fotoperíodo a lo largo de los años 2006 y 2007 en la ciudad de Santiago de Chile.

Las plantas perennes leñosas desarrollan anualmente estructuras conocidas como yemas. Estas estructuras entran en dormancia inducidas por el acortamiento del fotoperíodo. Las yemas dormantes proveen a las plantas de una red segura para el crecimiento y la reproducción, si las condiciones ambientales son tales que provocan la muerte del tejido metabólicamente activo, como por ejemplo las heladas intensas, y posteriormente, son las encargadas de reanudar el crecimiento de la planta una vez que las condiciones ambientales así lo permiten (Gil, 1997).

La dormancia desde un punto de vista operativo ha sido clasificada en tres estadios definidos como paradormancia (PD), endodormancia (ED) y ecodormancia (ECD). Durante la PD o dormancia estival, el crecimiento es inhibido por factores originados fuera de la yema (ejemplo: dominancia apical), en la ED el crecimiento está reprimido por factores endógenos de la yema, y durante la ECD, el brote de la yema está inhibido por las condiciones desfavorables para el crecimiento (Lang, 1987). A medida que progresa el otoño, el acortamiento de los días y las bajas temperaturas inducen la endodormancia (ED). La ED se conoce también como “dormancia invernal o dormancia profunda”. La entrada, mantención y salida de las yemas de la ED ha sido ampliamente

estudiada debido a la importancia que tiene para la horticultura y la fruticultura por el papel que juega tanto en la sobrevivencia como en la adaptación de las plantas. Definir un estado dormante en una planta es difícil, dado que un tejido puede pasar de un estado dormante a otro sin ningún cambio fenotípico. Sin embargo, aunque no hay crecimiento ni cambios visibles, la dormancia es una etapa fisiológica y bioquímicamente activa en el desarrollo de las yemas (Young *et al.*, 1973).

En frutales caducifolios, la profundidad de la dormancia se ha estudiado utilizando estacas de una yema, las cuales se someten a condiciones que promueven la brotación y los resultados se expresan como porcentaje de brotación en un período de tiempo definido, o como el tiempo que se requiere para que el 50% de la población de yemas brote (BR<sub>50</sub>) (Pérez *et al.*, 2007).

## **1.2 Meristema apical de la yema.**

### **1.2.1. El bloqueo de los plasmodesmos durante la endodormancia.**

El meristema apical (MA) de la yema produce el tejido meristemático que da lugar a los órganos aéreos de la planta. La organización celular básica del MA consta de células indiferenciadas que en ciertos aspectos se parecen a las células troncales de los animales. El ciclo de dormancia puede ser analizado en términos de los cambios en la comunicación célula - célula del MA (van der Schoot y Rinne, 1999), y la parte simplásmica de esta red está constituida por los plasmodesmos que interconectan todas las células del MA (Fig. 2A). El espacio simplásmico provee de una ruta directa de señalización célula - célula (Bergmans *et al.*, 1993). Los plasmodesmos son las conexiones intercelulares que permiten el transporte célula-célula de azúcares,



aminoácidos, iones inorgánicos, proteínas, y ácidos nucleicos entre las células vegetales (Lucas *et al.*, 1993). A pesar de que todas las células del MA están interconectadas a través de los plasmodesmos, no todas están en el mismo estado de desarrollo (Rinne y van der Schoot, 1998). Durante el ciclo de dormancia el MA pasa a través de tres estados secuenciales de comunicación célula-célula: i) **Online**, estado proliferativo, con células fisiológicamente activas y en división, con un continuo intercambio de materia e información; ii) El estado **Offline**, de desconexión celular, donde la comunicación está suspendida; iii) Estado **Standby**, una condición de espera, donde las células están reconectadas, pero inactivas (Rinne *et al.*, 2001) (Fig. 2B).

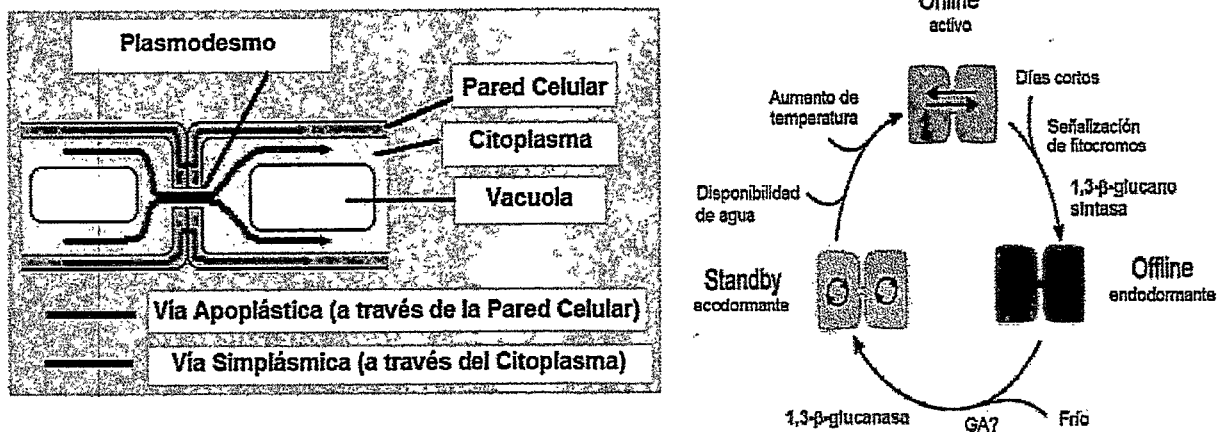


Figura 2. Comunicación a través de plasmodesmos en células vegetales. A: Representación de un plasmodesmo entre dos células vegetales. B: Ciclo de dormancia en Abedul (*Betula pubescens*). El modelo muestra las alteraciones cíclicas inducidas ambientalmente en la red de comunicación simplásmica del meristema apical.

Se ha demostrado que la restauración de la organización simplásmica del meristema es indispensable para la liberación de la dormancia de yemas y para asumir un estado competente de proliferación (Rinne *et al.*, 2001).

### 1.2.2. 1,3- $\beta$ -Glucano sintasas, 1,3- $\beta$ -Glucanasas y su papel en la dormancia de yemas

La callosa es un polisacárido de las plantas. Está compuesto de residuos de glucosa unidos a través de enlaces beta 1,3 y se denomina Beta Glucano. Se encuentra en los plasmodesmos, en las placas de células en división y durante el desarrollo del polen. Se ha observado en plántulas de Abedul (*Betula pubescens*) que al ser sometidas a fotoperíodos cortos, se forman esfínteres de glucano en los plasmodesmos de todas las células del meristema apical (MA) de la yema, lo que implica un aislamiento simplásmico. Aparentemente, la presencia de estos esfínteres estaría relacionada con el estado de ED (Rinne *et al.*, 2001). La enzima 1,3- $\beta$ -Glucano sintasa (GS, también conocida como callosa sintasa) es una proteína integral de membrana que sintetiza glucanos a partir de UDP-glucosa entre la membrana plasmática (MP) y la pared celular (PC) y sería la responsable de este aislamiento simplásmico (Lucas *et al.*, 1993). Estas enzimas son de importancia central en el normal desarrollo de la planta, ya que son necesarias para la biosíntesis de la pared celular. La GS es también responsable de la síntesis de 1,3- $\beta$ -glucanos en respuesta a heridas, estrés fisiológico o infecciones (Stone y Clarke, 1992).

Para que las yemas se liberen de la endodormancia, los esfínteres plasmodesmales deben degradarse. Las enzimas 1,3- $\beta$ -Glucanasas (BGLUs) catalizan el clivaje de las uniones 1,3- $\beta$ -glucosídicas en 1,3- $\beta$ -glucanos y son conocidas como proteínas PR (relacionadas a patogénesis), pertenecientes a la familia PR-2 (van Loon, 1999). Aunque el mayor interés en estas enzimas radica en su posible papel en la respuesta de plantas a

microorganismos patógenos y respuesta a heridas (Kombrink y Somssich, 1997; Leubner-Metzger y Meins, 1999), existe fuerte evidencia que estas enzimas también están implicadas en diversos procesos fisiológicos y del desarrollo en plantas no infectadas, incluyendo división celular (Waterkeyn, 1967), embriogénesis y floración (Leubner-Metzger y Meins, 1999). Las glucanasas se han encontrado también durante la germinación de arvejas (*Pisum sativum*; Petruzzelli *et al.*, 1999), cebada (*Hordeum vulgare*; Ballance *et al.*, 1976), maíz (*Zea mays*; Cordero *et al.*, 1994), y trigo (*Triticum aestivum*; Caruso *et al.*, 1999).

### **1.3. Dormancia en Vitis**

Como la mayoría de las plantas perennes leñosas, la vid crece y se desarrolla a través de un ciclo continuo de dormancia y crecimiento (Pacey-Miller *et al.*, 2003). En la vid, cada hoja de un tallo en crecimiento presenta una yema axilar, la cual se desarrolla durante el verano, y se torna dormante al final de la temporada de crecimiento (Mathiason *et al.*, 2008), esto es, a fines de enero en el hemisferio sur. Son estas yemas dormantes o latentes las responsables de reanudar el crecimiento de la planta a comienzos de la primavera siguiente.

En *Vitis*, la regulación ambiental tanto del cese del crecimiento como de la entrada en la ED de la yema varía entre los genotipos. Algunos genotipos se vuelven dormantes en respuesta a fotoperíodos decrecientes mientras que otros requieren de bajas temperaturas, o ambos, para inducir la ED (Fannell y Hoover, 1991; Schnabel y Wample, 1987). Estudios en *Vitis riparia* indican que la inducción de la ED de yemas por fotoperíodos cortos es mediada por fitocromos y es heredable (Fannell *et al.*, 2004).

#### **1.4. Requerimientos de frío en frutales.**

##### **1.4.1. Problemas de brotación en frutales y la utilización de agentes promotores de brotación.**

Se considera que el frío juega un papel dual durante el desarrollo de la dormancia. En una primera etapa las bajas temperaturas contribuyen a profundizar la intensidad de la dormancia. Una vez que se ha alcanzado la dormancia profunda o endodormancia (ED), el frío contribuye a la salida de este estado. Así, mientras mayor es la exposición al frío, menor es la profundidad de la dormancia de los tejidos, aumentando con esto su capacidad de responder a condiciones estimulantes del crecimiento (Gil, 1997).

Uno de los desafíos que la industria horticultural ha enfrentado por años es la producción económica de frutos templados (o relativamente de altos requerimientos de frío) en climas cálidos, debido a la falta de frío invernal suficiente para liberar las yemas vegetativas y florales de la ED (Arora *et al.*, 2003). En regiones de inviernos cálidos, el mayor obstáculo para la producción de frutos de clima templado, es producido por la prolongación excesiva del estado de ED (Shulman *et al.*, 1983), lo que aparentemente tiene como consecuencia una brotación retrasada y no uniforme (Nir y Lavee, 1993).

Actualmente, la salida de la ED debe ser inducida mediante la utilización de compuestos rompedores de dormancia (y/o promotores de brotación), para compensar la falta de frío natural, y esta práctica es indispensable para la mantención de una producción económica sustentable en estas regiones (Erez, 1987). Los compuestos efectivos disponibles actualmente son costosos y significan un riesgo de daño a las yemas dado su fitotoxicidad (Erez, 1987; Or *et al.*, 1999). Así, se hace necesario entender los

mecanismos biológicos involucrados en la dormancia de yemas para la manipulación de su tiempo de brotación.

La compleja red de procesos bioquímicos y celulares responsables de la regulación y ejecución de la salida de dormancia de yemas no ha sido caracterizada (Seeley, 1994).

El agente químico conocido como cianamida hidrogenada (HC) es el compuesto rompedor de dormancia más utilizado (Shulman *et al.*, 1983; Or *et al.*, 1999; Halaly *et al.*, 2008). Aunque el mecanismo por el cual ejerce su efecto no está claro aún. Aparte de HC, señales de estrés como altas temperaturas (estrés térmico o "heat-shock") y anaerobiosis se han reportado como liberadores de dormancia de yemas (Lavee y May, 1997). Sin embargo, aún no es claro si estos estímulos externos gatillan una misma cascada de eventos bioquímicos y celulares en estas yemas. El hecho de que una amplia variedad de factores puedan romper el estado de dormancia, sugiere la existencia de vías y componentes universales clave en el ciclo de dormancia (Lang, 1987). De este modo, la identificación de genes con similares patrones de expresión posterior a las aplicaciones de diferentes agentes liberadores de la dormancia puede constituir una herramienta potente para la identificación de vías que se activan durante la salida de la dormancia (Halaly *et al.*, 2008).

## **1.5. Vías metabólicas relacionadas con la salida de yemas de la ED.**

### **1.5.1. Estrés y estado oxidativo de la yema.**

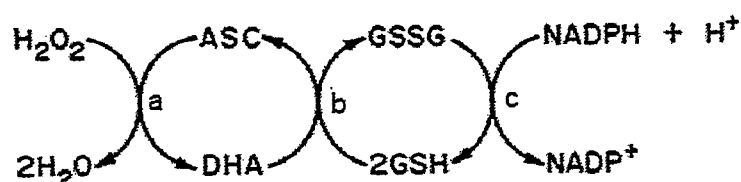
La aplicación de cianamida hidrogenada (HC) provee de un sistema controlado para el análisis de la salida de las yemas de vid de la ED, con una respuesta relativamente uniforme de la población de yemas, lo que permite la detección de cambios metabólicos

tempranos luego de la aplicación de este estímulo químico (Or *et al.*, 1999, 2002). Usando este sistema se ha demostrado previamente que la expresión y la actividad de catalasa (CAT), una enzima que detoxifica  $H_2O_2$  en yemas de vid, es inhibida inmediatamente después de la aplicación de HC (Nir *et al.*, 1986; Or *et al.*, 2002), y por tanto, los niveles de  $H_2O_2$  aumentan en los tejidos de las yemas (Pérez y Lira, 2005; Pérez *et al.*, 2008). Basado en ello, se ha especulado que la aplicación de HC lleva al desarrollo de estrés oxidativo, y se ha considerado como un factor que promueve la salida de la ED de yemas.

#### **1.5.2. Activación de vías antioxidativas, ciclo ascorbato-glutación y vía de las pentosas fosfato.**

Tohbe *et al.* (1998a, 1998b) demostraron que la aplicación de glutación reducido (GSH) producía la salida de ED en yemas de vid, mientras que la aplicación de glutación oxidado (GSSG) inhibía la brotación de estas yemas. A partir de estos resultados se infirió que la brotación debe estar bajo el control de la relación GSH/GSSG en el tejido de la yema. Existen antecedentes que señalan que altas concentraciones de GSSG inhiben la síntesis de proteínas, por ello es necesario que el pool de glutación reducido (GSH) se regenere para así poder sustentar un metabolismo normal durante el período de desarrollo y crecimiento (Kranner y Lutzoni, 1999). La reacción de reducción del glutación oxidado a reducido es catalizada por la enzima glutación reductasa (GR). En plantas, el glutación forma parte de un sistema de detoxificación de  $H_2O_2$ , conocido como el ciclo ascorbato-glutación (CAG) (Fig. 3). La reacción peroxidasa inicial de este sistema utiliza ascorbato (ASC) como antioxidante y produce dehidroascorbato (DHA)

por acción de la enzima ascorbato peroxidasa (APX). El ascorbato es entonces regenerado en una reacción dependiente de GSH, catalizado por la enzima dehidroascorbato reductasa (DHAR). En esta última reacción se produce GSSG, que es finalmente reducido a GSH en una reacción que involucra a GR y NADPH. (Dalton *et al.*, 1986).



**Figura 3. Ciclo ascorbato-glutatión (CAG).** Vía de óxido-reducción involucrada en la detoxificación de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Enzimas: a, ascorbato peroxidasa (APX); b, deshidroascorbato reductasa (DHAR); c, glutatión reductasa (GR).

La formación de GSH a partir de su forma oxidada es dependiente de NADPH producido por la vía de las pentosas fosfato (VPF), y por tanto, esta vía puede activarse en respuesta a una disminución de GSH (Clancy *et al.*, 1994). La enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) es la primera enzima de la VPF y utiliza glucosa-6-fosfato (G6P) para convertirla en 6-fosfogluconolactona, y durante ese proceso se genera una molécula de NADPH a partir de  $\text{NADP}^+$ . Se ha sugerido que la actividad de esta enzima estaría regulada a nivel transcripcional, ya sea por los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  o de azúcares metabolizables dependiendo de la especie y del tejido en cuestión (Hauschild y von Schaewen, 2003).

Por otra parte, se ha propuesto recientemente que la liberación de las yemas desde la ED involucra perturbaciones en la respiración mitocondrial de las yemas (Pérez *et al.*, 2008). En el presente trabajo se utilizó un inhibidor de la respiración mitocondrial, azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ), con el objeto de estudiar su efecto sobre la salida de las yemas de la ED y

comparar su efecto a nivel molecular con los efectos de HC, el conocido agente rompedor de la dormancia en yemas. Los resultados mostraron que  $\text{NaN}_3$  indujo de forma similar que HC la brotación de las yemas de vid. Ambos compuestos estimularon las vías CAG y VPF favoreciendo la relación GSH/GSSG y promovieron la transcripción de genes que codifican para 1,3- $\beta$ -glucanasas, enzima clave en la salida de las yemas de la ED. Adicionalmente, se estudió el efecto del frío y del  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre alguno de los factores involucrados en la salida de las yemas de la ED.



## II. HIPÓTESIS

“Si el efecto de los agentes químicos rompedores de dormancia es mediado por  $H_2O_2$ , y a su vez, sustituyen el efecto del frío en la inducción de la brotación de yemas de vid, entonces, el  $H_2O_2$ , el frío y los agentes químicos debieran activar las mismas vías metabólicas en las yemas de vid.”

## III. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el frío, y el peróxido de hidrógeno estimulan las mismas vías metabólicas que los agentes rompedores de dormancia.

## IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Diseño de primers específicos para genes de 1,3- $\beta$ -Glucanasas de clase I, Glutación reductasa y Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa.

-Evaluación del efecto de agentes rompedores de dormancia sobre la brotación de yemas endodormantes de vid, y seguimiento de perfiles de expresión de genes de interés.

-Determinar si el efecto liberador de dormancia ejercido por cianamida es mediado por peróxido de hidrógeno.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Material vegetal.

Las yemas de Vid (*Vitis vinifera* L) cv. Thompson Seedless, se colectaron en Santiago, desde la estación experimental La Platina, del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Las varas de 8-10 yemas fueron colectadas a principio de Junio.

### 5.2. Inducción química de salida de dormancia.

Los tratamientos promotores de la brotación se aplicaron a comienzos de Junio, cuando las yemas se encuentran todavía en etapa endodormante, de acuerdo con las curvas de dormancia determinadas previamente (Pérez *et al.*, 2007). Las cañas que contienen 8-10 yemas fueron cortadas en esquejes o estacas de una sola yema y separadas en tres grupos de 30 yemas cada uno. El primer grupo fue pintado con una solución de 5% (v/v) de Dormex (SKW, Trotsberg, Germany; 49 % v/v HC), el segundo grupo fue pintado con una solución 2% (p/v) de azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) (Sigma, USA), y el tercer grupo se pintó con agua destilada como control. Después de los tratamientos, los esquejes fueron montados en una plancha de polipropileno y se dejaron flotando en agua dentro de contenedores plásticos. Las bandejas plásticas se transfirieron a una cámara de crecimiento, sometidas a condiciones forzadas de crecimiento, esto es a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  bajo 14 h de luz  $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . El porcentaje de brotación fue utilizado para evaluar el efecto de los tratamientos en la salida de dormancia.

### **5.3. Tratamientos con peróxido de hidrógeno e inhibidores de actividad catalasa, aminotriazol (AMT) y ácido salicílico (SA).**

Los tratamientos promotores de la brotación se aplicaron a comienzos de Junio. El primer grupo fue pintado con una solución de 5% (v/v) de Dormex (SKW, Trotsberg, Germany; 49% v/v HC), el segundo grupo fue pintado con una solución 1% (v/v) de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el tercer grupo fue pintado con una solución 1% (v/v) de peróxido de hidrógeno y 2% (p/v) de 3-amino-1,2,4-triazol ( $H_2O_2$ +AMT), el cuarto grupo fue pintado con una solución 1% (v/v) de peróxido de hidrógeno y 2% (p/v) de ácido salicílico ( $H_2O_2$ +SA) y el quinto grupo se pintó con agua destilada como control. Después de los tratamientos, los esquejes fueron montados en una plancha de polipropileno y se dejaron flotando en agua dentro de contenedores plásticos. Las bandejas plásticas se transfirieron a una cámara de crecimiento, sometidas a condiciones forzadas de crecimiento (FC), esto es a  $23 \pm 2^\circ C$  bajo 14 h de luz  $350 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ . El porcentaje de brotación fue utilizado para evaluar el efecto de los tratamientos en la salida de dormancia.

### **5.4. Extracción y purificación de RNA.**

El RNA total fue extraído de yemas de vid de acuerdo al protocolo descrito por Noriega *et al.* (2007) para los distintos tratamientos (HC,  $NaN_3$ ,  $H_2O_2$ , Control) en los días 2, 8 y 14 post-tratamiento bajo FC. La selección de esos días se hizo en base al conocimiento previo de que el efecto de HC sobre las yemas ED de vid provoca el inicio de la brotación luego de alrededor de 2 semanas de aplicado el tratamiento. Así los días 2, 8 y 14 reflejarían los cambios que se producen ya sea luego de aplicado el tratamiento, a la

mitad del tiempo de inicio de la brotación y cercanos al momento del inicio de la brotación, respectivamente. Aproximadamente, 0.5 g de muestra se congelan con nitrógeno líquido y se muelen en un mortero hasta que se transforme en un polvo fino y luego, es mezclado en un tubo que contiene buffer CTAB (2% p/v CTAB, 2% p/v PVP, 0.1 M Tris (pH 8.0), 25 mM EDTA, 2 M NaCl, agua DEPC) y 2% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol. La mezcla se agita vigorosamente mediante el uso de un vórtex y se mantiene en un baño termorregulado a 65°C durante 30 minutos, con agitaciones cada 10 minutos. Posteriormente, la mezcla se vierte en un tubo plástico con lana de vidrio, contenido dentro de un tubo Corex de 30 mL, para ser filtrado. El tubo se centrifuga a 400g durante 10 minutos a 4°C. El filtrado es traspasado a otro tubo Corex de 30 mL y es lavado 2 veces con 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), la fase acuosa se separa mediante la centrifugación del tubo a 2000g por 20 minutos. Finalmente, la fase acuosa recuperada se mezcla con 2 - 2.5 volúmenes de etanol 100% (v/v) para la precipitación del RNA durante la noche a -20°C. El RNA precipitado es recuperado mediante la centrifugación del tubo a 2000g por 20 minutos a 4°C. Luego de centrifugar, se descarta el sobrenadante, y el pellet se lava suavemente con 1 mL de etanol 70% (v/v), y luego se deja secar bajo campana durante 20 - 30 minutos. Finalmente, el precipitado se resuspende en 500  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O DEPC. Es habitual encontrar contaminación con DNA en este procedimiento, así que con el fin de prevenirla, se hace necesario tratar los extractos de RNA con 5 U de DNAsa (10 U/ $\mu$ L, Winkler) por cada 1  $\mu$ g de RNA, a 36°C durante 30 minutos, y 2 minutos a 85°C para desactivar la DNAsa, y evitar posibles problemas posteriores en los PCR. La

contaminación con DNA en las preparaciones de RNA se chequeó mediante PCR (35 ciclos: 30 segundos a 94°C de denaturación, 30 segundos a 55°C para el apareamiento de los partidores y 45 segundos a 72°C de extensión), usando partidores del gen de actina para *V. vinifera* (código de acceso: AY680701). Los extractos luego de ser tratados con DNAsa son sometidos a una purificación que consiste en mezclar el RNA con 1 volumen de NaI 6 M, 0.5 volúmenes de etanol 100% (v/v) y 15 - 25 µL de sílica en NaI 3 M (100 mg/mL). La mezcla se agita cada 2 minutos, hasta completar un tiempo de 10 minutos, a temperatura ambiente. Se centrifuga la mezcla durante 1 minuto a 13000g. Luego de descartar el sobrenadante, el pellet (sílica que contiene el RNA extraído) se lava con 0.5 mL de buffer de lavado (10 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 50% v/v Etanol). Después de centrifugar 1 minuto, se descarta el sobrenadante y se repite el lavado 2 veces más. Luego de la última centrifugación, el sobrenadante se descarta y el pellet se deja secar bajo campana durante 30 minutos. El RNA adherido a la sílica se separa mediante la resuspensión del pellet con 50 - 100 µL de H<sub>2</sub>O DEPC. La muestra se centrifuga durante 2 minutos y el sobrenadante que contiene el RNA se recupera, y se guarda a -80°C hasta ser utilizado para experimentos posteriores.

### **5.5. Cuantificación de RNA.**

La cuantificación del RNA extraído se llevó a cabo espectrofotométricamente, a una longitud de onda de 260 nm.

### 5.6. Síntesis de cDNA.

La mezcla de reacción contiene 5 µg de RNA, 1 µL Oligo (dT)<sub>12-18</sub> 0.50 µg/µL, 1 µL dNTP Mix 10 mM, y H<sub>2</sub>O DEPC hasta completar un volumen total de 14 µL, la mezcla se mantiene 5 minutos a 65°C, luego se incuba 2 minutos a -20°C. Posteriormente a la mezcla se le agregan 4 µL de Buffer 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µL DTT 0.1M y 1 µL SuperScript<sup>TM</sup> III RT (200 U/µL Invitrogen USA).

Las condiciones de incubación para la síntesis de cDNA fueron 30 minutos a 50°C y luego 15 minutos a 70° C para la inactivación de la reacción.

### 5.7. Reacciones de PCR.

Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 12.5 µL. La mezcla de reacción contiene 1 µL de cDNA. Luego se agregan 0.25 µL de cada partidador (preparado a una concentración de 10 µM), 0.1 µL Platinum® Taq DNA Polymerase (5 U/µL Invitrogen USA), 0.25 µL de dNTP Mix 10 mM, 0.3 µL MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1.25 µL de 10X PCR Buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4 y 500 mM KCl) y 9.1 µL de H<sub>2</sub>O DEPC. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (Thermocycler MJ Research (PTC-150)). El programa de PCR consiste en 35 ciclos (30 segundos a 94°C de denaturación, 30 segundos a 55°C para el apareamiento de los partidores y 45 segundos a 72°C de extensión). La extensión final fue a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa 1.5% (p/v) y corrido en buffer TAE 1X (0.038

M Tris, 1 mM EDTA, 1.1 % (v/v) ácido acético glacial) a 75 Volts y visualizado por tinción con bromuro de etidio (1  $\mu$ L, 10 mg/mL).

### 5.8. Diseño de partidores.

Los partidores específicos se diseñaron usando el software Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000). Se diseñaron partidores específicos para las secuencias nucleotídicas de glutatión reductasa (VvGR) y 1,3- $\beta$ -glucanasas (VvBGLUs) basados en la información de la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), y en el caso del diseño de partidores para la secuencia nucleotídica de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (VvG6PDH) de *V. vinifera*, se basó en la información perteneciente a la base de datos de EST CAES genomics facility de la Universidad de California (<http://cfg.ucdavis.edu>). Posteriormente, la información fue corroborada en la base de datos genómica de *Vitis* GENOSCOPE (<http://www.genoscope.cns.fr/vitis>) (Tabla 1 y 2). En todos los casos la existencia de la proteína correspondiente se supone en base a la evidencia a nivel de transcrito.

Tabla 1. Códigos de secuencias de 1,3- $\beta$ -glucanasas, Glutatión reductasa y Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en las diferentes bases de datos.

Gen	Abreviatura	NCBI	GENOSCOPE
Glutatión reductasa	VvGR	AF019907	GSVIVT00023848001
1,3- $\beta$ -glucanasa	VvBGLU78	AJ277900	GSVIVT00025341001
1,3- $\beta$ -glucanasa	VvBGLU22	AF239617	GSVIVT00033125001

Gen	Abreviatura	Genomics Facility	GENOSCOPE
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	VvG6PDH	CTG1030637	GSVIVT00020574001

Tabla 2. Partidores diseñados para las secuencias de 1,3- $\beta$ -glucanasas, Glutación reductasa y Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

<i>Nombre Partidor</i>	<i>Secuencia Partidor 5' <math>\rightarrow</math> 3'</i>	<i>Tamaño Amplificado</i>
<i>VvBGLU78 Fw</i>	GGTTGGAAATGAAGTAAGCCC	567 pares de bases
<i>VvBGLU78 Rv</i>	CACGTAAGTCTCGATAGGCC	
<hr/>		
<i>Nombre Partidor</i>	<i>Secuencia Partidor 5' <math>\rightarrow</math> 3'</i>	<i>Tamaño Amplificado</i>
<i>VvBGLU22 Fw</i>	GTATGCTATGGAATGCTAGGC	735 pares de bases
<i>VvBGLU22 Rv</i>	CCCGGCAGACGGCCAGC	
<hr/>		
<i>Nombre Partidor</i>	<i>Secuencia Partidor 5' <math>\rightarrow</math> 3'</i>	<i>Tamaño Amplificado</i>
<i>VvG6PDH Fw</i>	CGCCAGGGATTCTTACACTC	559 pares de bases
<i>VvG6PDH Rv</i>	CAATGTTGTCACGGTTCCAG	
<hr/>		
<i>Nombre Partidor</i>	<i>Secuencia Partidor 5' <math>\rightarrow</math> 3'</i>	<i>Tamaño Amplificado</i>
<i>VvGR Fw</i>	GTTTTGCAGTTCGAGCAGAG	454 pares de bases
<i>VvGR Rv</i>	TTCCATCCACGTCAACTGT	

### 5.9. Estimación del nivel de transcritos.

La abundancia de los transcritos se determinó usando el software de análisis MCID (InterFocus Imaging Ltda., UK) y los valores se estandarizaron con la expresión del gen de actina de *V. vinifera* (código de acceso: AY680701).

### 5.10. Secuenciación.

Para el análisis de secuencias los DNAs amplificados mediante PCR fueron purificados usando Montage PCR Filter Units (Millipore, Amicon USA). Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo con 2  $\mu$ L de DYENAMIC ET Terminator cycle kit (Amersham Bioscience) y 5 pmol de partidor en un volumen de reacción de 10  $\mu$ L. Los fragmentos para secuenciar se separaron y analizaron con un secuenciador de 4 capilares ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) perteneciente al Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, a cargo del profesor Victor Cifuentes.

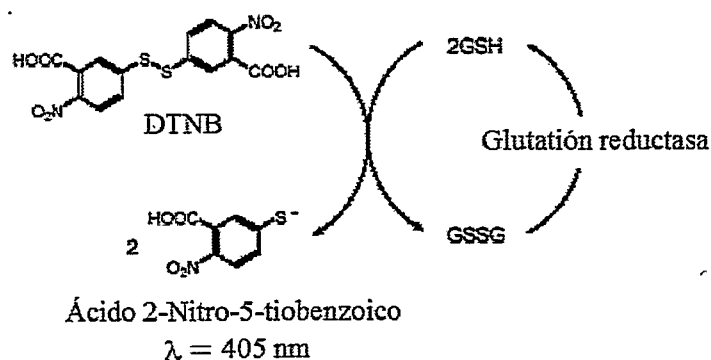


El kit de secuenciamiento requiere del DNA templado, que en este caso corresponde a los fragmentos de PCR amplificados utilizando los distintos partidores diseñados para los experimentos (Tabla 2). La reacción de PCR se lleva a cabo con sólo uno de los partidores específicos en un termociclador. El producto es una hebra de DNA simple en la cual el nucleótido terminal está marcado con una sonda fluorescente. Como sólo un partidador es utilizado, sólo una hebra es copiada durante la secuenciación. Por ello la reacción se repite utilizando el otro partidador, para así obtener la secuencia de la hebra complementaria.

#### **5.11. Medición de glutatión.**

El ensayo de glutatión se realizó mediante el sistema de reciclado de glutatión por DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) y glutatión reductasa (GR) (Fig. 4), con pequeñas modificaciones del método descrito por Smith (1985). Aproximadamente, 0.2 g de yemas de vid se molieron en nitrógeno líquido, usando mortero y pistilo, y luego se homogenizaron en 1 mL 5% (p/v) de ácido sulfosalicílico (SSA). Se agregó 1 mL adicional de SSA al homogenizado y se centrifugó durante 10 minutos a 13000g. Para el ensayo de glutatión total (GSH + GSSG), 100  $\mu$ L del sobrenadante se neutralizaron con 150  $\mu$ L de buffer fosfato de potasio 0.5 M pH 7.5. Para el ensayo de GSSG, otros 100  $\mu$ L de sobrenadante se neutralizaron con 150  $\mu$ L de buffer fosfato 0.5 M pH 7.5 y 20  $\mu$ L de 2-vinilpiridin, la mezcla se agitó vigorosamente hasta emulsión y fue incubado por 1 h a temperatura ambiente. La función del compuesto 2-vinilpiridin es la de atrapar el glutatión reducido. Ambos tubos se extrajeron dos veces con 0.5 mL dietileter y la fase acuosa se diluyó 4 veces en solución buffer (0.1 M fosfato de sodio, 5 mM EDTA, pH

7.5). La mezcla de incubación estándar contiene 0.5 mL de solución buffer, 0.2 mL de DTNB 6 mM y 0.1 mL del extracto diluido. La reacción se inició mediante la adición de 0.1 mL (1 U) de glutatión reductasa (GR) de levadura tipo III (Sigma Chemical Co.) y 0.1 mL de NADPH 2 mM. Los cambios en la absorbancia a 405 nm fueron seguidos a temperatura ambiente por 2 minutos y se determinó la pendiente para cada curva. Para cada muestra se determinó el glutatión total o GSSG mediante su respectiva pendiente usando una curva estándar de pendientes versus concentración inicial de glutatión.



**Figura 4.** Esquema del principio del sistema de reciclamiento de glutatión por DTNB y GR para la determinación de glutatión. En este esquema se ve que DTNB reacciona con el glutatión reducido, generando un producto de color amarillo, el ácido 2-nitro-5-tiobenzoico. El GSH se produce a partir del glutatión oxidado GSSG por acción de la enzima glutatión reductasa (GR). La concentración de GSH en la muestra puede ser determinada midiendo la absorbancia a 405nm. La reacción colorimétrica es estable y la intensidad del color aumenta linealmente. La velocidad de la reacción de generación de color amarillo es dependiente de la concentración inicial de GSH, lo que le confiere una pendiente característica.

## VI. RESULTADOS

### 6.1. Efecto de HC y $\text{NaN}_3$ sobre la brotación de yemas de vid.

Se estudió la brotación de yemas de vid bajo condiciones de brotación forzada en estacas de una yema colectadas a principio de Junio en el valle del Maipo, dado que en esa fecha las yemas están endodormantes de acuerdo a la curva de profundidad de dormancia determinada previamente (Pérez *et al.*, 2007). Tres grupos de 30 yemas cada uno fueron analizados, un primer grupo fue tratado con cianamida hidrogenada (HC) (2.5 % p/v), un segundo grupo fue tratado con azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) (2% p/v), y al tercer grupo se le aplicó agua, siendo este último grupo el control. La aplicación de los tratamientos de HC y  $\text{NaN}_3$  a las estacas adelantó la brotación de las yemas en comparación con el tratamiento control (Fig. 5). La brotación de yemas tratadas con HC y  $\text{NaN}_3$  comenzó luego de 13 días en la cámara de crecimiento bajo condiciones forzadas y la brotación completa fue alcanzada después de 21 días en las yemas tratadas con  $\text{NaN}_3$ . La brotación de las yemas tratadas con HC fue inicialmente más rápida que aquéllas tratadas con  $\text{NaN}_3$ , pero posteriormente la velocidad de brotación de las yemas tratadas con  $\text{NaN}_3$  superó a aquéllas tratadas con HC. En el caso de las yemas control, la brotación comenzó el día 20.

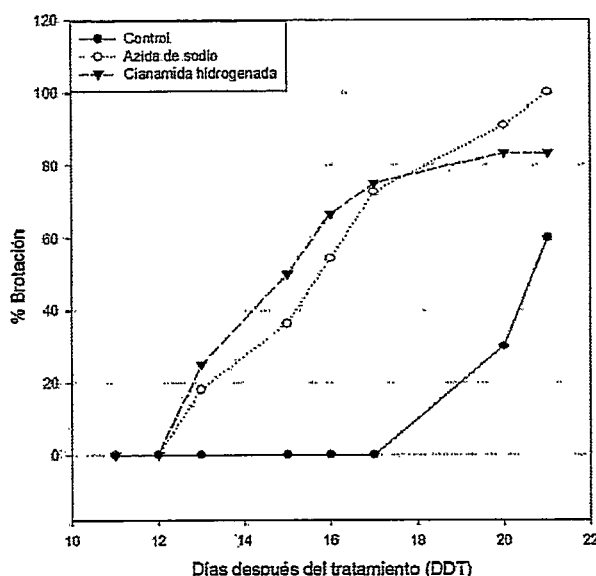


Figura 5. Efecto de los tratamientos con cianamida hidrogenada (HC) y azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) sobre la brotación de yemas endodormantes de vid colectadas el 11 de Junio del 2007. HC se aplicó al 2.5% (p/v),  $\text{NaN}_3$  fue aplicado al 2% (p/v), y como control se aplicó agua destilada. Luego de los tratamientos, las yemas se colocaron en una cámara de crecimiento bajo condiciones forzadas. Cada grupo constó de 30 yemas ED. Los resultados presentados son producto de un solo ensayo ( $n=1$ ).

## 6.2. $\text{H}_2\text{O}_2$ presenta un efecto marginal sobre la brotación de yemas de vid.

Debido a que la aplicación de HC produce un aumento en los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en los tejidos de yemas de vid (Pérez *et al.*, 2008) se analizó si el efecto liberador de la dormancia que ejerce la HC está o no mediado por  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Para este fin se evaluó el efecto de  $\text{H}_2\text{O}_2$  solo y en combinación con dos inhibidores de la actividad catalasa, que son aminotriazol (AMT; Allen y Whatley, 1978; Pérez *et al.*, 2008) y ácido salicílico (SA; Dat *et al.*, 1998; Perez y Lira, 2005), sobre la brotación de yemas de vid.

La respuesta de brotación de las yemas se midió como porcentaje de brotación a distintos tiempos después de los tratamientos. En la figura 6 se puede apreciar que la aplicación de HC produjo los mejores resultados adelantando el inicio de la brotación de las yemas en aproximadamente 10 días con respecto al tratamiento control. Por otra

parte, las aplicaciones de  $H_2O_2$  adelantaron sólo levemente la brotación de las yemas en relación al tratamiento control. En el caso de la combinación  $H_2O_2$  + SA y  $H_2O_2$  + AMT, el resultado no mejoró significativamente, observándose además un efecto fitotóxico en las hojas en el tratamiento con  $H_2O_2$  + AMT. En este experimento, el inicio de la brotación se ve retrasada en comparación con el experimento de la figura 5. El grupo de yemas tratadas con HC se retrasó 7 días, y el grupo control en 10. Estos resultados indicarían que las yemas ED de vid a inicios de Junio del 2008 se encuentran más profundamente dormantes que aquellas colectadas en Junio del 2007. Sin embargo, en ambos experimentos, para el caso de las yemas tratadas con HC, se alcanzó aproximadamente el 80% de brotación luego de 8 días de iniciada la brotación (Fig. 5 y Fig. 6).

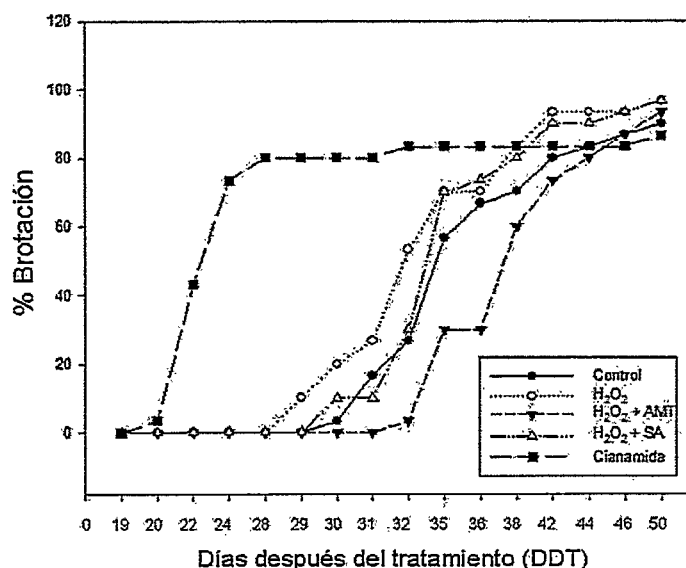


Figura 6. Efecto del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) sólo y en combinación con inhibidores de actividad catalasa (aminotriazol: AMT; ácido salicílico: SA) sobre la brotación de yemas ED de vid colectadas el 9 de Junio del 2008. El peróxido de hidrógeno se aplicó al 1% (v/v) en todos los casos. El AMT y SA se aplicaron al 2% (p/v) cada uno. Luego de los tratamientos las yemas fueron colocadas en una cámara de crecimiento bajo condiciones forzadas (23°C, régimen de 14/10 horas luz/oscuridad). Cada grupo consta de 30 yemas. Un grupo de yemas fue pintado con HC al 2.5 % (p/v) y otro grupo con agua destilada como controles. La brotación se siguió durante 7 semanas y se evaluó como porcentaje de brotación en distintos tiempos. Cada grupo constó de 30 yemas ED. Los resultados presentados son producto de un solo ensayo (n=1).

### 6.3. Análisis bioinformático de genes de $\beta$ -1,3-glucanasas en *V. vinifera*.

Utilizando como palabra clave (keyword) “glucanase” en la base de datos de EST para *V. vinifera* de la Universidad de California “genomics facility” (<http://cgf.ucdavis.edu/home/>) se identificaron 19 secuencias para 1,3-  $\beta$ -glucanasas, de las cuales 9 eran CONTIG y 10 SINGLETON. Utilizando la base de datos genómica de *V. vinifera* GENOSCOPE (<http://www.genoscope.cns.fr/>) y la herramienta “Blat-Search” (Kent, 2002) se identificaron 9 *loci* correspondiente a cada uno de los CONTIG de la base de datos de EST, además se identificaron 5 *loci* utilizando las 10 secuencias SINGLETON, lo que da un total de 14 genes putativos de 1,3- $\beta$ -glucanasas en el genoma de *V. vinifera* (Tabla 3). En el caso del análisis de  $\beta$ -1,3-glucanasas básicas de *V. vinifera* en la base de datos NCBI (<http://b.ncbi.nlm.nih.gov/>) arrojó 8 secuencias las cuales correspondieron a 4 genes putativos identificados en GENOSCOPE (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencias de 1,3-  $\beta$ -glucanasas de *V. vinifera* en las distintas bases de datos.

GENOSCOPE	Genomics Facility	NCBI
GSVIVT00025340001	CTG1028534; U68144	AJ245614.1; U68144.1
GSVIVT00036393001	CTG1029513	
GSVIVT00033125001	CTG1030057; U73709	DQ267748.1; AF239617.2; U73709.1
GSVIVT00025341001	CTG1032552	AJ277900.1; AF053750.1
GSVIVT00025337001	CTG1032910; BQ795670	
GSVIVT00025946001	CTG1034282	
GSVIVT00014622001	CTG1034673	
GSVIVT00022223001	CTG1037265	
GSVIVT00032980001	CTG1037401; BQ795788; CF413631	
GSVIVT00025345001	CB006476	
GSVIVT00018906001	CB982916	
GSVIVT00019372001	CF207478	
GSVIVT00027269001	CF607477	
GSVIVT00025346001		EU676806.1

#### 6.4. Aislamiento e identificación de dos transcritos de 1,3- $\beta$ -glucanasas básicas VvBGLU78 y VvBGLU22 en vid cv. Thompson Seedless.

En la base de datos de NCBI se encontraron 8 secuencias de 1,3- $\beta$ -glucanasas básicas de *V. vinifera* (Tabla 3), de esas 8 secuencias se escogieron 2 (código de acceso AF239617.2 y código de acceso AJ277900.1) dado que eran secuencias completas de mRNA. Utilizando el programa Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000) se diseñaron partidores específicos (Tabla 2). El amplificado de PCR obtenido usando los partidores específicos diseñados a partir de la secuencia AJ277900.1 se secuenció (ver materiales y métodos) y se le denominó VvBGLU78. El análisis Blastx de VvBGLU78 contra la base de datos NCBI mostró una identidad del 96% con 1,3- $\beta$ -glucanasa de *Vitis riparia* (código de acceso ACD45060.1), una identidad del 96% con 1,3- $\beta$ -glucanasa de *Vitis cv. híbrido* (código de acceso BAF95876.1), una identidad del 96% con una proteína sin nombre de *V. vinifera* (código de acceso CAO23359.1), una identidad del 94% con una proteína sin nombre de *V. vinifera* (código de acceso CAO23363.1) y una identidad del 94% con 1,3- $\beta$ -glucanasa *V. vinifera* (código de acceso CAB91554.1) (Fig. 7). Por otra parte, el análisis Blat-Search (Blast-like alignment tool) (Kent, 2002), en GENOSCOPE, mostró que VvBGLU78 comparte un 98.6% de identidad con un *locus* ubicado en el cromosoma 8 (GSVIVT00025341001), que contiene 2 exones y un intrón. La secuencia no está anotada como 1,3- $\beta$ -glucanasa. Sin embargo, a partir del análisis de la secuencia aminoacídica deducida se predice que la proteína participa del metabolismo de carbohidratos.

VvBGLU78	1	-----NLFNAISAAGLGNQIKVSTALDTRVTLGTSYPPSKGAF	37
ACD45060 <i>V. riparia</i>	121	YVAVGNEVSPTCGTAQFVLPAMRNI FNATSAAGLGNQIKVSTALDTRVTLGTSYPPSKGAF	180
BAF95876 <i>V. hybrid cv.</i>	121	YVAVGNEVSPTCGTAQFVLPAMRNI FNATSAAGLGNQIKVSTALDTRVTLGTSYPPSKGAF	180
CAO23359 <i>V. vinifera</i>	121	YVAVGNEVSPTCGTAQFVLPAMRNI FNATSAAGLGNQIKVSTALDTRVTLGTSYPPSKGAF	180
CAO23363 <i>V. vinifera</i>	121	YVAVGNEVSPTCGTAQFVLPAMRNI FNATSAAGLGNQIKVSTALDTRVTLGTSYPPSKGAF	180
CAB91554 <i>V. vinifera</i>	121	YVAVGNEVSPTCGTAQFVLPAMRNI FNATSAAGLGNQIKVSTALDTRVTLGTSYPPSKGAF	180
VvBGLU78	38	KPEVTSFLNPIIISFLVNNRAPLLNVNLYPYFSYIGNTRDIRLDYALFAPAGV VVQDGGQLGY	97
ACD45060 <i>V. riparia</i>	181	KPEVTSFLNPIIISFLVNNRAPLLNVNLYPYFSYIGNTRDIRLDYALFAPAGV VVQDGGQLGY	240
BAF95876 <i>V. hybrid cv.</i>	181	KPEVTSFLNPIIISFLVNNRAPLLNVNLYPYFSYIGNTRDIRLDYALFAPAGV VVQDGGQLGY	240
CAO23359 <i>V. vinifera</i>	181	KPEVTSFLNPIIISFLVNNRAPLLNVNLYPYFSYIGNTRDIRLDYALFAPAGV VVQDGGQLGY	240
CAO23363 <i>V. vinifera</i>	181	KPEVTSFLNPIIISFLVNNRAPLLNVNLYPYFSYIGNTRDIRLDYALFAPAGV VVQDGGQLGY	240
CAB91554 <i>V. vinifera</i>	181	KPEVTSFLNPIIISFLVNNRAPLLNVNLYPYFSYIGNTRDIRLDYALFAPAGV VVQDGGQLGY	240
VvBGLU78	98	RNLFDAILLDAVYSALERAGGGSLQVVISSESGWPSAGGTATTVDNARTYNSNLIQHVKGGT	157
ACD45060 <i>V. riparia</i>	241	RNLFDAILLDAVYSALERAGGGSLQVVISSESGWPSAGGTATTVDNARTYNSNLIQHVKGGT	300
BAF95876 <i>V. hybrid cv.</i>	241	RNLFDAILLDAVYSALERAGGGSLQVVISSESGWPSAGGTATTVDNARTYNSNLIQHVKGGT	300
CAO23359 <i>V. vinifera</i>	241	RNLFDAILLDAVYSALERAGGGSLQVVISSESGWPSAGGTATTVDNARTYNSNLIQHVKGGT	300
CAO23363 <i>V. vinifera</i>	241	RNLFDAILLDAVYSALERAGGGSLQVVISSESGWPSAGGTATTVDNARTYNSNLIQHVKGGT	300
CAB91554 <i>V. vinifera</i>	241	RNLFDAILLDAVYSALERAGGGSLQVVISSESGWPSAGGTATTVDNARTYNSNLIQHVKGGT	300
VvBGLU78	158	PKKPGGPIETTYVFAMENENRKSPEYEKHWGLFENPKCAKYPINFN	166
ACD45060 <i>V. riparia</i>	301	PKKPGGPIETTYVFAMENENRKSPEYEKHWGLFENPKCAKYPINFN	345
BAF95876 <i>V. hybrid cv.</i>	301	PKKPGGPIETTYVFAMENENRKSPEYEKHWGLFENPKCAKYPINFN	345
CAO23359 <i>V. vinifera</i>	301	PKKPGGPIETTYVFAMENENRKSPEYEKHWGLFENPKCAKYPINFN	345
CAO23363 <i>V. vinifera</i>	301	PKKPGGPIETTYVFAMENENRKSPEYEKHWGLFENPKCAKYPINFN	345
CAB91554 <i>V. vinifera</i>	301	PKKPGGPIETTYVFAMENENRKSPEYEKHWGLFENPKCAKYPINFN	345

Figura 7. Análisis de identidad de secuencia aminoacídica del fragmento amplificado de PCR para VvBGLU78 (Blastx en base de datos de NCBI). VvBGLU78 presenta una identidad del 96% con la enzima 1,3-β-glucanasa de *V. riparia* ACD45060, 96% con 1,3-β-glucanasa *V. hybrid cultivar* BAF95876, 96% con proteína sin nombre de *V. vinifera* CAO23359, 94% con proteína sin nombre de *V. vinifera* CAO23363, y una identidad del 94% con 1,3-β-glucanasa *V. vinifera* CAB91554. La conservación de aminoácidos se encuentra sombreada, en negro aquellas secuencias que comparten > 60% de identidad y en gris aquellos aminoácidos con que comparten propiedades similares de su cadena lateral R.

A partir de la secuencia AF239617 de *V. vinifera* para 1,3-β-glucanasas básicas de la base de datos NCBI se diseñó un par de partidores específicos (Tabla 2). El amplificado PCR obtenido con dichos partidores se le denominó VvBGLU22 y fue secuenciado (ver materiales y métodos). El análisis de Blastx en NCBI dio como resultado que VvBGLU22 presenta una identidad del 99% con 1,3-β-glucanasa *V. vinifera* (código de acceso AAF44667.2), un 98% de identidad con 1,3-β-glucanasa de clase I de *V. vinifera* (código de acceso ABB82365.1), un 78% de identidad con 1,3-β-glucanasa de *Hevea brasiliensis* (código de acceso ABN09655.1), una identidad del 78% con dos secuencias de 1,3-β-glucanasa de *Hevea brasiliensis* (árbol de caucho) (código de acceso ABJ74161.1 y código de acceso AAP87281.1) (Fig. 8). Al mismo tiempo, se realizó un



Blat-Search en la base de datos de GENOSCOPE que muestra que VvBGLU22 comparte un 99.7% de identidad con un *locus* ubicado en el cromosoma 5 de *V. vinifera* (GSVIVT00033125001), que contiene 6 exones y 5 intrones. La secuencia no está anotada como 1,3- $\beta$ -glucanasa. Sin embargo, a partir del análisis de la secuencia aminoacídica deducida se predice que la proteína participa del metabolismo de carbohidratos.

VvBGLU22	1	-----YDPNGAALQALRGSNTCLMLGVPNSDLGCHATNPSCAQSWVGRNVVRYWV	50
AAF44667 <i>V. vinifera</i>	45	KSRNIDRMRTYDENCAALQALRGSNTCLMLGVPNSDLGCHATNPSCAQSWVGRNVVRYWV	104
ABB82365 <i>V. vinifera</i>	45	KSRNIDRMRTYDENCAALQALRGSNTCLMLGVPNSDLGCHATNPSCAQSWVGRNVVRYWV	104
ABN09655 <i>H. brasiliensis</i>	60	RKSNIDRMRTYDENCAVLEALRGSNTCLMLGVPNSDLGCHT-NFSNARSWVGRNVVRYWV	118
ABJ74161 <i>H. brasiliensis</i>	24	KQSNIDRMRTYDENCAVLEALRGSNTCLMLGVPNSDLGCHT-NFSNARSWVGRNVVRYWV	82
AAP87281 <i>H. brasiliensis</i>	60	KQSNIDRMRTYDENCAVLEALRGSNTCLMLGVPNSDLGCHT-NFSNARSWVGRNVVRYWV	118
VvBGLU22	51	GVSFRYIAYGNEVSEVNGGTSRBAQFVLPAMRNIRAAHASAGLQDRVQVSTALDLETLGN	110
AAF44667 <i>V. vinifera</i>	105	GVSFRYIAYGNEVSEVNGGTSRBAQFVLPAMRNIRAAHASAGLQDRVQVSTALDLETLGN	164
ABB82365 <i>V. vinifera</i>	105	GVSFRYIAYGNEVSEVNGGTSRBAQFVLPAMRNIRAAHASAGLQDRVQVSTALDLETLGN	164
ABN09655 <i>H. brasiliensis</i>	119	SVRFRYIAYGNEVSEVNRGTAWLAQFVLPAMRNIRAAHASAGLQDRVQVSTALDLETLGN	178
ABJ74161 <i>H. brasiliensis</i>	83	SVLFRYIAYGNEVSEVNGGTAWLAQFVLPAMRNIRAAHASAGLQDRVQVSTALDLETLGN	142
AAP87281 <i>H. brasiliensis</i>	119	SVLFRYIAYGNEVSEVNGGTAWLAQFVLPAMRNIRAAHASAGLQDRVQVSTALDLETLGN	178
VvBGLU22	111	SYPPSCGAFRCQDVRGYLDFIIRFLVDNKSPILLANIYPYETVYGNPKDISLPYALFTSPSV	170
AAF44667 <i>V. vinifera</i>	165	SYPPSCGAFRCQDVRGYLDFIIRFLVDNKSPILLANIYPYETVYGNPKDISLPYALFTSPSV	224
ABB82365 <i>V. vinifera</i>	165	SYPPSCGAFRCQDVRGYLDFIIRFLVDNKSPILLANIYPYETVYGNPKDISLPYALFTSPSV	224
ABN09655 <i>H. brasiliensis</i>	179	SYPPSAGAFRDVRSYLDFIIRFLSSIRSPILLANIYPYETVYGNPKDISLPYALFTSPSV	238
ABJ74161 <i>H. brasiliensis</i>	143	SYPPSAGAFRDVRSYLDFIIRFLSSIRSPILLANIYPYETVYGNPKDISLPYALFTSPSV	202
AAP87281 <i>H. brasiliensis</i>	179	SYPPSAGAFRDVRSYLDFIIRFLSSIRSPILLANIYPYETVYGNPKDISLPYALFTSPSV	238
VvBGLU22	171	VVWDGQRGYKNLFDAML-----	188
AAF44667 <i>V. vinifera</i>	225	VVWDGQRGYKNLFDAMLDAALYSALERAGGASLEVVVSESGWPSAGAGGTFVQDARTYNSN	284
ABB82365 <i>V. vinifera</i>	225	VVWDGQRGYKNLFDAMLDAALYSALERAGGASLEVVVSESGWPSAGAGGTFVQDARTYNSN	284
ABN09655 <i>H. brasiliensis</i>	239	VVWDGQRGYKNLFDATLDALYSALERASGGASLEVVVSESGWPSAGAFATFDNGRTYLSN	298
ABJ74161 <i>H. brasiliensis</i>	203	VVWDGQRGYKNLFDATLDALYSALERASGGASLEVVVSESGWPSAGAFATFDNGRTYLSN	262
AAP87281 <i>H. brasiliensis</i>	239	VVWDGQRGYKNLFDATLDALYSALERASGGASLEVVVSESGWPSAGAFATFDNGRTYLSN	298

Figura 8. Análisis de identidad de secuencia aminoacídica del fragmento amplificado de PCR para VvBGLU22 (Blatx en base de datos de NCBI). VvBGLU22 presenta una identidad del 99% con 1,3- $\beta$ -glucanasa de *V. vinifera* AAF44667, 98% con 1,3- $\beta$ -glucanasa de *V. vinifera* ABB82365, 78% con 1,3- $\beta$ -glucanasa de *H. brasiliensis* ABN09655, 78% con 1,3- $\beta$ -glucanasa de *H. brasiliensis* ABJ74161, y un 78% de identidad con 1,3- $\beta$ -glucanasa de *H. brasiliensis* AAP87281. La conservación de aminoácidos se encuentra sombreada, en negro aquellas secuencias que comparten > 60% de identidad y en gris aquellos aminoácidos con que comparten propiedades similares de su cadena lateral R.

### **6.5. Búsqueda de secuencias para glutatión reductasa (GR) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en *V. vinifera*. Diseño de partidores, secuenciación y confirmación de identidad de fragmentos amplificados de PCR.**

Se buscó en la base de datos de NCBI por glutatión reductasa de *V. vinifera* y se encontró sólo la secuencia AF019907, la cual fue utilizada para el diseño de partidores (Tabla 2). El amplificado de PCR obtenido con dichos partidores fue secuenciado (ver materiales y métodos) y se le denominó VvGR. El resultado del Blastx en la base de datos de NCBI dio como resultado un 100% de identidad con la secuencia de GR de *V. vinifera* (código de acceso AAB70837), una identidad del 88% con GR de *Zinnia elegans* (código de acceso BAD27394), una identidad del 85% con GR de *Pisum sativum* (código de acceso CAA62482), una identidad del 83% con GR de *Glycine max* (código de acceso AAF26175), y una identidad del 82% con GR de *Vigna unguiculata* (código de acceso ABB89041) (Fig. 9). El resultado del Blat-Search en la base de datos de GENOSCOPE arrojó que VvGR comparte un 99.2% de identidad con un *locus* ubicado en el cromosoma 7 (GSVIVT00023848001), que consta de 9 exones y 8 intrones, y cuya función molecular predicha es la de tener una actividad glutatión disulfuro reductasa.

VvGR	1	-----	FAVRAESR-NGAEPR-HYDFDLETTICAGSGGVRASRFAA	37
AAB70837 <i>V.vinifera</i>	50	LTVPAGSLISORPSSFS-PRRC	FAVRAESR-NGAEPR-HYDFDLETTICAGSGGVRASRFAA	106
BAD27394 <i>Z.elegans</i>	53	FSLGKKILGFTSDYKPKSRFVT-PAES	STNGAEPR-SYDFDLETTICAGSGGVRASRFAA	110
CAA62482 <i>P.sativum</i>	39	LEFSTRKLLISLSPPH-----	RFAVRAESQNGADPAR-CTDFDLETTICAGSGGVRASRFAS	93
AAF26175 <i>G.max</i>	32	LPFD-KSLLSLSTRR-----	RFAVRAESQNGRDAAPAHYDFDLETTICAGSGGVRARFEEA	86
ABB89041 <i>V.unguiculata</i>	32	RPEFS-KSLIPDFTRR-----	CTFVRAESQNGAEFVAHYDFDLETTICAGSGGVRARFEEA	86
VvGR	38	NFGSSVAVCELPPEFTISSETTGGVGGTCVDR	RCCVPKKLLVYASRFSHEEESGCGFGWKEE	97
AAB70837 <i>V.vinifera</i>	107	NFGSSVAVCELPPEFTISSETTGGVGGTCVDR	RCCVPKKLLVYASKFSHEEESGCGFGWKEE	166
BAD27394 <i>Z.elegans</i>	111	NFGASVAVCELPPEFTISSETTGGVGGTCVDR	RCCVPKKLLVYASRFSHEEESLGGFGWYIN	170
CAA62482 <i>P.sativum</i>	94	NFGASVAVCELPPEFTISSETTGGVGGTCVDR	RCCVPKKLLVYASKFSHEEESNGFGWRYD	153
AAF26175 <i>G.max</i>	87	NFGASVAVCELPPEFTISSETTGGVGGTCVDR	RCCVPKKLLVYASRFSHEEESNGFGWRYD	146
ABB89041 <i>V.unguiculata</i>	87	NFGASVAVCELPPEFTISSETTGGVGGTCVDR	RCCVPKKLLVYASKFSHEEESSHGFGWRYD	146
VvGR	98	SEPKHDWSSLANKNAELQRLT-----	-----	119
AAB70837 <i>V.vinifera</i>	167	SEPKHDWSSLANKNAELQRLTGGYKNI	LNNAGVKLIEGGRKLIIDPHFVDVNGKLYSARKH	226
BAD27394 <i>Z.elegans</i>	171	SEPKHDWSSLANKNAELQRLTGGYKNI	LNNAGVKLIEGGRKLIIDPHFVDVNGKLYSARKH	230
CAA62482 <i>P.sativum</i>	154	SEPKHDWSSLANKNAELQRLTGGYKNI	LNNAGVKLIEGGRKLIIDPHFVDVNGKLYSARKH	213
AAF26175 <i>G.max</i>	147	SEPKHDWSSLANKNAELQRLTGGYKNI	LNNAGVKLIEGGRKLIIDPHFVDVNGKLYSARKH	206
ABB89041 <i>V.unguiculata</i>	147	SEPKHDWSSLANKNAELQRLTGGYKNI	LNNAGVKLIEGGRKLIIDPHFVDVNGKLYSARKH	206

Figura 9. Análisis de identidad de secuencia aminoacídica del fragmento amplificado de PCR para VvGR (Blastx en base de datos de NCBI). VvGR presenta una identidad del 100% con GR de *V.vinifera* AAB70837, 88% con GR de *Z. elegans* BAD27394, 85% con GR de *P. sativum* CAA62482, 83% con GR de *G. max* AAF26175 y un 82% de identidad con GR de *V. unguiculata* ABB89041. La conservación de aminoácidos se encuentra sombreada, en negro aquellas secuencias que comparten > 60% de identidad y en gris aquellos aminoácidos con que comparten propiedades similares de su cadena lateral R.

En el caso de la búsqueda de una secuencia para la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *V.vinifera*, ésta no se encontró en la base de datos de NCBI, por lo tanto se buscó en la base de datos EST para *V. vinifera* de la Universidad de California (<http://cgf.ucdavis.edu>). Ahí se encontró sólo una secuencia, el CONTIG CTG1030637. Esta secuencia fue utilizada para el diseño de partidores específicos utilizando el programa Primer3 (Tabla 2). El fragmento amplificado de PCR obtenido con estos partidores se le denominó VvG6PDH y se secuenció (ver materiales y métodos). El Blastx de VvG6PDH contra la base de datos de NCBI dio un 100% de identidad con una secuencia sin nombre de *V. vinifera* (código de acceso CAO14620), una identidad del 78% con G6PDH de *Medicago sativa* (código de acceso AAB41552), una identidad del 83% con G6PDH de *Arabidopsis thaliana* (código de acceso CAB52675), una identidad del 79% con G6PDH de *Actinidia chinensis* (código de acceso ABR45722), y una

identidad del 86% con G6PDH de *Nicotiana tabacum* (código de acceso CAA04993) (Fig. 10). El Blat-Search contra la base de datos de GENOSCOPE dio un 99.8% de identidad con un *locus* ubicado en el cromosoma 14 (GSVIVT00020574001), que consta de 15 exones y 14 intrones, y cuya función molecular predicha correspondería a tener una actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

VvG6PDH	4	-----IINEN--EDANSEHSGSEVVSREPLQLIRYVSGSYTAE	36
CAO14620 <i>V.vinifera</i>	61	CHSNLEWHIFGYSRRKISDDELNRRECYLEN--EDANSEHSGSEVVSREPLQLIRYVSGSYTAE	119
AAB41552 <i>M.sativa</i>	59	DPPEVHIFGYSRSEISDDELNRRECYLEN--EDANSEHSGSEVVSREPLQLIRYVSGSYTAE	118
CAB52675 <i>A.thaliana</i>	61	NPPEVWHIFGYSRRKISDDELNRRECYLVDERNRQ--SEHSEHREPLQLIRYVSGSYTAE	119
ABR45722 <i>A.chinensis</i>	61	CGSNLEWHIFGYSRRKISDDELNRRECYLQGGSGSDRQSEVVSREPLQLIRYVSGSYTAE	120
CAA04993 <i>N.tabacum</i>	59	EGSNLEWHIFGYSRRKISDDELNRRECYLQGGSGRNE---EVSREPLQLIRYVSGSYTAE	114
VvG6PDH	37	EGSRLLDRKESGHEEISKNSQEGSSRRLEFYLLPSPVYPSVQRMILCCMNRKSDLGGWTRR	96
CAO14620 <i>V.vinifera</i>	120	EGSRLLDRKESGHEEISKNSQEGSSRRLEFYLLPSPVYPSVQRMILCCMNRKSDLGGWTRR	179
AAB41552 <i>M.sativa</i>	119	EGSRLLDRKESGHEEISKNSQEGSSRRLEFYLLPSPVYPSVQRMILCCMNRKSDLGGWTRR	178
CAB52675 <i>A.thaliana</i>	119	EGSRLLDRKESGHEEISKNSQEGSSRRLEFYLLPSPVYPSVQRMILCCMNRKSDLGGWTRR	178
ABR45722 <i>A.chinensis</i>	121	EGSRLLDRKESGHEEISKNSQEGSSRRLEFYLLPSPVYPSVQRMILCCMNRKSDLGGWTRR	190
CAA04993 <i>N.tabacum</i>	115	EGSRLLDRKESGHEEISKNSQEGSSRRLEFYLLPSPVYPSVQRMILCCMNRKSDLGGWTRR	174
VvG6PDH	97	VVEKPFEGKDLGSAEQLSAQEGELFEEBQIYRREDHYLGGKELVQNE-----	139
CAO14620 <i>V.vinifera</i>	180	VVEKPFEGKDLGSAEQLSAQEGELFEEBQIYRREDHYLGGKELVQNEVWLRFAKRFLELQNR	239
AAB41552 <i>M.sativa</i>	179	VVEKPFEGKDLGSAEQLSAQEGELFEEBQIYRREDHYLGGKELVQNEVWLRFAKRFLELQNR	238
CAB52675 <i>A.thaliana</i>	179	VVEKPFEGKDLGSAEQLSAQEGELFEEBQIYRREDHYLGGKELVQNEVWLRFAKRFLELQNR	238
ABR45722 <i>A.chinensis</i>	181	VVEKPFEGKDLGSAEQLSAQEGELFEEBQIYRREDHYLGGKELVQNEVWLRFAKRFLELQNR	240
CAA04993 <i>N.tabacum</i>	175	VVEKPFEGKDLGSAEQLSAQEGELFEEBQIYRREDHYLGGKELVQNEVWLRFAKRFLELQNR	234

Figura 10. Análisis de identidad de secuencia aminoacídica del fragmento amplificado de PCR para VvG6PDH (Blastx en base de datos de NCBI). VvG6PDH presenta una identidad del 100% con una proteína sin nombre de *V.vinifera* CAO14620, 78% de identidad con G6PDH de *M. sativa* AAB41552, 83% con G6PDH de *A. thaliana* CAB52675, 79% de identidad con G6PDH de *A. chinensis* ABR45722, y un 86% de identidad con G6PDH de *N. tabacum* CAA04993. La conservación de aminoácidos se encuentra sombreada, en negro aquellas secuencias que comparten > 60% de identidad y en gris aquellos aminoácidos con que comparten propiedades similares de su cadena lateral R.

## 6.6. Identificación de los genes putativos de los transcritos VvBGLU78, VvBGLU22, VvGR y VvG6PDH en la base de datos genómica de *V. vinifera* GENOSCOPE.

Los resultados del Blastx en la base de datos de NCBI (Fig.7) mostraron que VvBGLU78 presenta un 96% de identidad con una proteína sin nombre de *V. vinifera* (código de acceso CAO23359), una identidad del 94% con 1,3- $\beta$ -glucanasa de *V. vinifera* (código de acceso CAB91554) y un 94% de identidad con proteína sin nombre

de *V. vinifera* (código de acceso CAO23363). Análisis en la base de datos de GENOSCOPE señalan que las secuencias cuyo código de acceso son CAO23359 y CAB91554 en NCBI corresponden a una misma secuencia en GENOSCOPE (GSVIVT00025341001), mientras que la secuencia cuyo código de acceso es CAO23363 corresponde a GSVIVT00025346001 en GENOSCOPE (Tabla 4). La razón por la cual VvBGLU78 se alinea con dos secuencias en la base de datos de GENOSCOPE se debe a que estas dos secuencias comparten una identidad del 98% a nivel de nucleótidos, y los partidores que se diseñaron para VvBGLU78 amplificarían para ambas secuencias (Fig. 11). Esta información se desconocía al momento de diseñar los partidores para VvBGLU78.

El análisis de identidad de secuencia aminoacídica del fragmento amplificado de PCR para VvBGLU22 (Fig. 8) presenta una identidad del 99% y del 98% con dos secuencias de 1,3- $\beta$ -glucanasa de *V. vinifera* código de acceso AAF44667 y código de acceso ABB82365, el análisis en la base de datos de GENOSCOPE indica que estas dos secuencias de NCBI corresponden a una misma secuencia GSVIVT00033125001 en GENOSCOPE (Tabla 4).

Para el caso del análisis de identidad de secuencia aminoacídica de VvGR (Blastx en base de datos de NCBI) (Fig. 9) se observa que VvGR presenta una identidad del 100% con GR de *V. vinifera* código de acceso AAB70837, esta secuencia corresponde a la traducción de la secuencia cuyo código de acceso es AF019907 en NCBI, y es la que se utilizó para el diseño de los partidores de VvGR (Tabla 4).

Finalmente, el resultado del Blastx en la base de datos de NCBI para VvG6PDH presenta una identidad del 100% con una proteína de *V.vinifera* código de acceso CAO14620, que hasta el momento no ha sido asignada como glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Tabla 4).

Tabla 4. Códigos de secuencia en las bases de datos de GENOSCOPE y NCBI correspondientes a VvBGLU78, VvBGLU22, VvGR y VvG6PDH.

GENOSCOPE (secuencias nucleotídicas)	NCBI (secuencias nucleotídicas)	NCBI (secuencias aminoácidas)	Denominación
GSVIVT00033125001	DQ267748.1; AF239617.2;	ABB82365.1; AAF44667.2	VvBGLU22
GSVIVT00025341001	AJ277900.1; AF053750.1	CAB91554.1; CAO23359.1	VvBGLU78
GSVIVT00025346001	EU676806.1	CAO23363.1	VvBGLU78
GSVIVT00023848001	AF019907.1	AAB70837.1	VvGR
GSVIVT00020574001		CAO14620.1	VvG6PDH

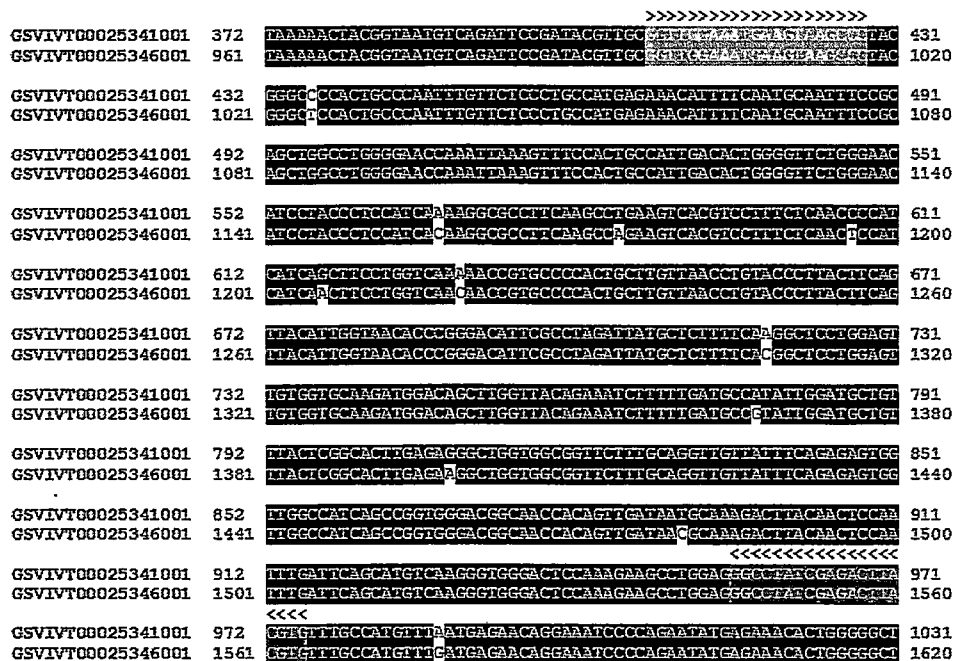


Figura 11. Alineamiento de secuencias nucleotídicas GSVIVT00025341001 y GSVIVT00025346001 de la base de datos de GENOSCOPE. Sombreado en negro indica la identidad entre las secuencias. En gris se destaca la posición de los partidores diseñados que amplifican el fragmento VvBGLU78.

### **6.7. Los tratamientos con HC y $\text{NaN}_3$ promueven la transcripción de genes de 1,3- $\beta$ -glucanasa en yemas endodormantes de vid.**

Se ha sugerido anteriormente que las enzimas 1,3- $\beta$ -glucanasas (BGLUs) juegan un papel central en el proceso de salida de la ED en *Betula pubescens* (Rinne *et al.*, 2001). Con el objetivo de testear si esto se aplica también a las yemas de vid, se analizó el efecto de HC y  $\text{NaN}_3$ , dos inductores de la salida de la ED en vid, sobre la expresión de dos transcritos de 1,3- $\beta$ -glucanasas: VvBGLU78 y VvBGLU22. El patrón de expresión de VvBGLUs se evaluó los días 2, 8 y 14 después de aplicado los tratamientos mediante la técnica de RT-PCR. En la figura 12 se observa que ambos agentes químicos promueven la expresión de VvBGLU78 y VvBGLU22 de manera similar. En las yemas control, la expresión de VvBGLUs aparece en el último día de evaluación (día 14), mientras que en las yemas tratadas con HC y  $\text{NaN}_3$  la expresión de transcritos de 1,3- $\beta$ -glucanasas es evidente desde el primer día de evaluación (día 2). La expresión de VvBGLUs en las yemas control el día 14 puede explicarse como producto del efecto de las condiciones de brotación forzada generadas por la cámara de crecimiento. Se puede relacionar la expresión de este transcrito con el inicio de la brotación (Fig. 5). En el caso de las yemas tratadas con los compuestos químicos, la expresión se detecta el día 2 y la brotación comienza el día 13, y en el caso de las yemas control la expresión de VvBGLUs se detecta el día 14 (lo que quiere decir que la expresión inició algún día después del día 8) y la brotación comienza el día 20.

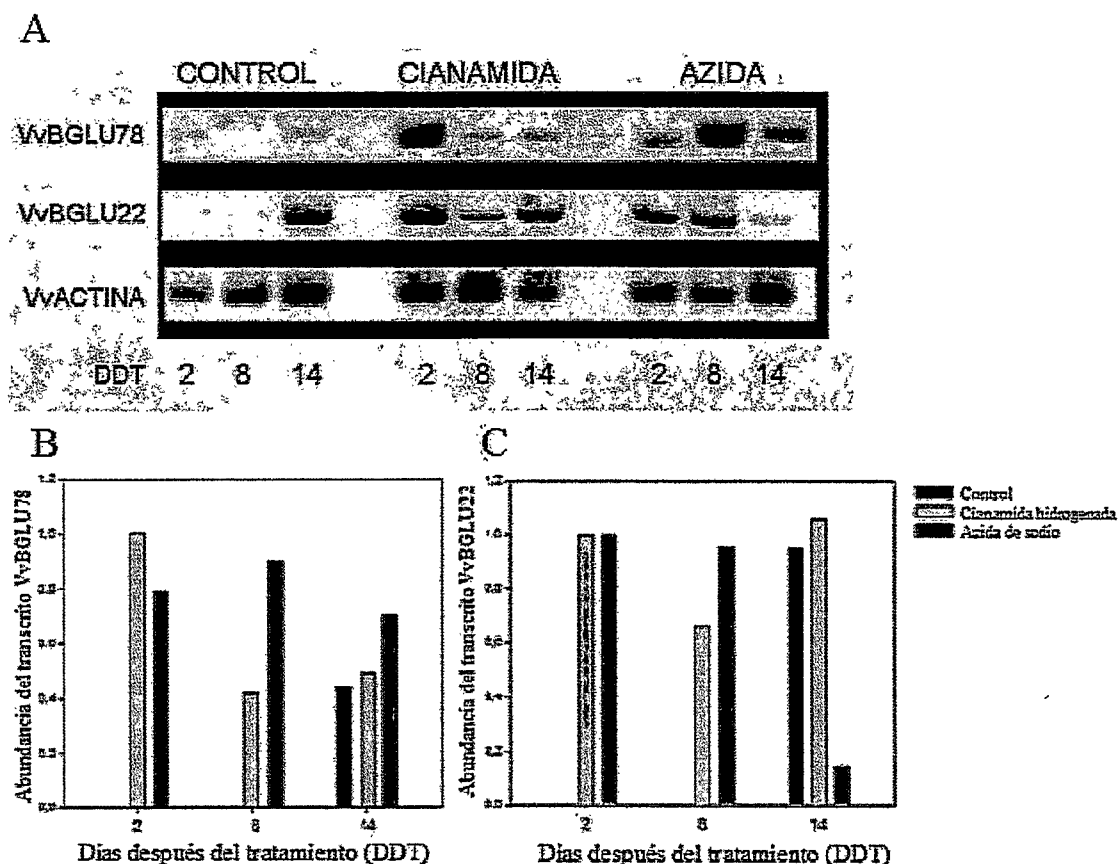


Figura 12. Efecto de cianamida hidrogenada (HC) y azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) sobre la expresión de los transcritos VvBGLU78 y VvBGLU22 en yemas de vid colectadas el 11 de Junio del 2007. A: Visualización en gel de agarosa 1,5% (p/v) de la expresión de transcritos de VvBGLU78 y VvBGLU22 analizada mediante RT-PCR en el RNA total extraído de yemas control y tratadas químicamente los días 2, 8 y 14 después del tratamiento (DDT). B: Abundancia relativa del transcrito VvBGLU78. C: Abundancia relativa del transcrito VvBGLU22. La expresión del gen de actina de *V. vinifera* (VvACTINA) se usó como control interno en todos los PCRs. La abundancia de los transcritos se determinó en relación a la expresión del transcrito VvACTINA. Los resultados presentados son producto de un solo ensayo ( $n=1$ ).

### 6.8. Efecto de HC y $\text{NaN}_3$ sobre la expresión de los genes VvGR y VvG6PDH en yemas de vid.

Recientemente se ha sugerido que la activación del ciclo ascorbato-glutati6n (CAG) y la subsiguiente activaci6n de la vía de las pentosas fosfato (VPF) jugarían un papel determinante en el proceso de salida de las yemas de la ED en vid (Pérez *et al.*, 2008). Con la finalidad de determinar si los inductores de la brotaci6n de yemas,  $\text{NaN}_3$  y HC



afectan la transcripción de genes relacionados con el CAG y con la VPF, como GR y G6PDH, se estudió la expresión mediante RT-PCR de los transcritos VvGR y VvG6PDH en yemas tratadas y no tratadas con los agentes químicos. Las evaluaciones se realizaron a los 2, 8 y 14 días después de los tratamientos. Los resultados muestran que en el día 2, VvGR presenta expresión sólo en las yemas tratadas con los agentes químicos HC y  $\text{NaN}_3$ . En el caso del control, la expresión de VvGR se observa muy débilmente los días 8 y 14. El efecto de HC parece ser más transitorio que el efecto de  $\text{NaN}_3$ , el cual es evidente aún el día 8. De manera similar a lo que ocurre con VvGR, tanto HC como  $\text{NaN}_3$  estimulan la expresión de VvG6PDH, los días 2 y 8 (Fig. 13). En las yemas control, la expresión de VvG6PDH se observa levemente los días 2 y 8, y aumenta en el día 14. Este aumento se puede asociar al efecto estimulante de brotación que ejerce la cámara de crecimiento.

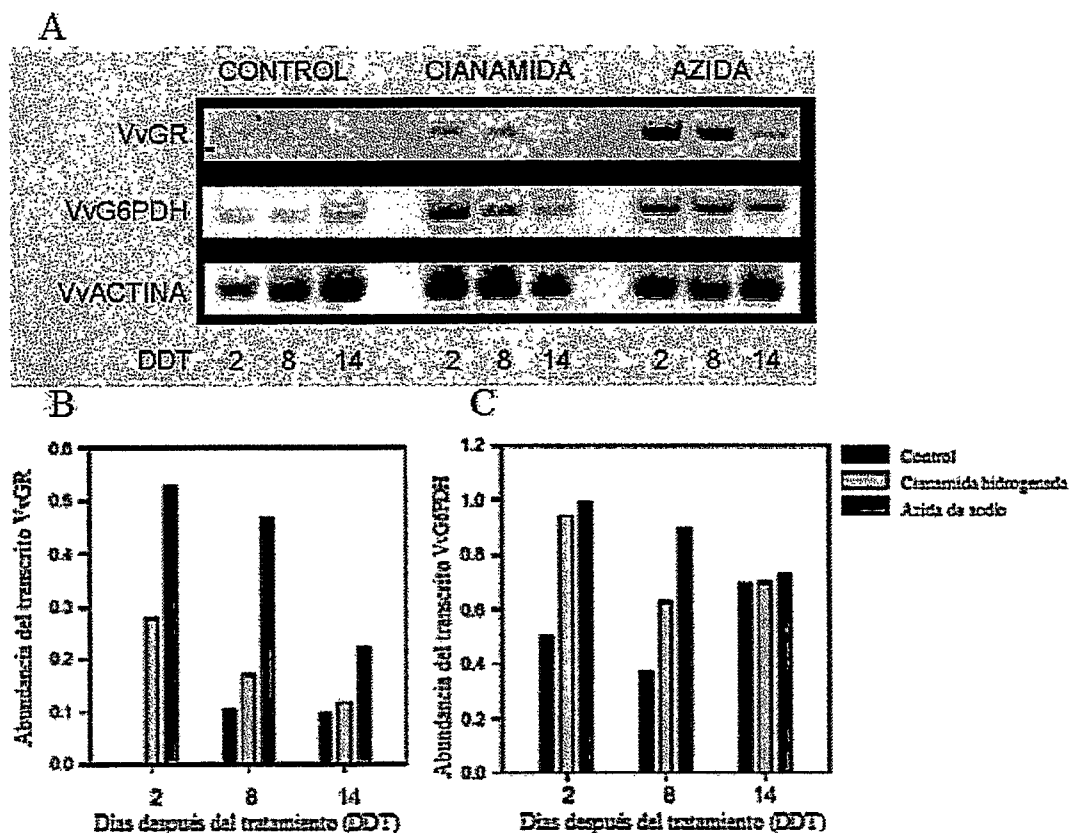


Figura 13. Efecto de cianamida hidrogenada (HC) y azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) sobre la expresión de transcritos de VvGR y VvG6PDH en yemas de vid (*Vitis vinifera* cv. Thompson seedless) colectadas el 11 de Junio del 2007. A: Visualización en gel de agarosa 1,5% (p/v) de la expresión de transcritos de VvGR y VvG6PDH analizada mediante RT-PCR en el RNA total extraído de yemas control y tratadas químicamente los días 2, 8 y 14 después del tratamiento (DDT). B: Abundancia relativa del transcrito VvGR. C: Abundancia relativa del transcrito VvG6PDH. La expresión del gen de actina de *V. vinifera* (VvACTINA) se usó como control interno en todos los PCRs. La abundancia de los transcritos se determinó en relación a la expresión del transcrito VvACTINA. Los resultados presentados son producto de un solo ensayo (n=1).

### 6.9. Efecto de HC y $\text{NaN}_3$ en los niveles de glutatión total y en la relación GSH/GSSG.

La concentración de glutatión total (GSH + GSSG) y la relación GSH/GSSG están sujetas a un estricto control homeostático en las células vegetales, y la salida de la homeostasis puede actuar como señales que gatillan respuestas adaptativas (Noctor *et al.*, 2002).

En las yemas ED de vid se encontró una baja relación GSH/GSSG que fue rápidamente revertida luego de la aplicación de HC y  $\text{NaN}_3$ . Después de 2 días desde el tratamiento, la razón GSH/GSSG aumentó drásticamente desde un valor de 0.1 a valores cercanos a 0.7 y 0.3 en las yemas tratadas con HC y  $\text{NaN}_3$  respectivamente; Sin embargo, la concentración total glutatión no cambió (Fig. 14). Al día 8 post tratamiento, la razón GSH/GSSG descendió 0.7 a 0.4 en las yemas tratadas con HC, pero en las yemas control y las tratadas con  $\text{NaN}_3$  la razón GSH/GSSG permaneció sin mayores cambios a pesar del aumento en el glutatión total. La relación GSH/GSSG en las yemas control aumenta el día 14, esto puede relacionarse con el leve aumento en la expresión de los transcritos VvGR y VvG6PDH que se observa en las yemas control el día 14 (Fig. 13) y se debería al efecto de las condiciones forzadas de brotación generadas por la cámara de crecimiento.

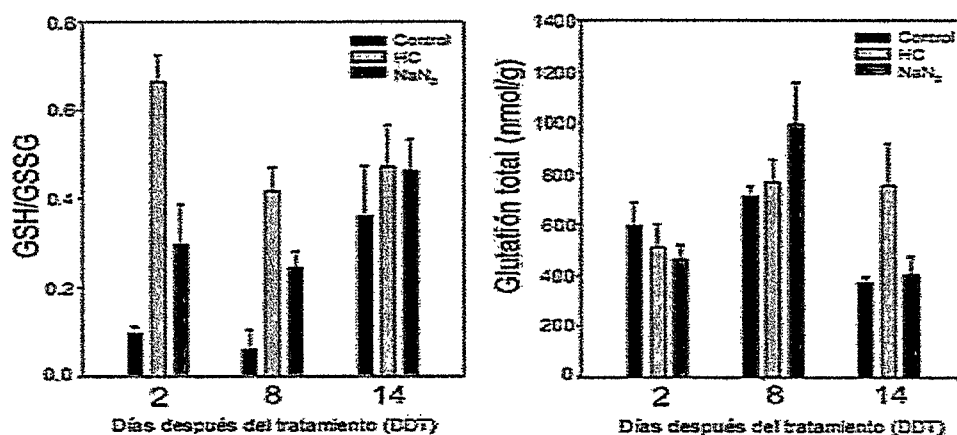


Figura 14. Efecto de la cianamida hidrogenada (HC) y azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) sobre los niveles de glutatión en yemas ED de vid. A: Relación de los niveles de glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG) en yemas control y tratadas químicamente los días 2, 8 y 14 después del tratamiento (DDT). B: nivel del pool de glutatión total (GSH + GSSG) en yemas control y tratadas químicamente los días 2, 8 y 14 después del tratamiento (DDT). Las mediciones se hicieron en duplicado ( $n=2$ ). Las barras muestran la desviación estándar

### **6.10. Expresión de los transcritos de VvBGLU78, VvBGLU22, VvGR y VvG6PDH durante la salida natural de las yemas de la ED.**

Con el objeto de determinar si los transcritos de 1,3- $\beta$ -glucanasas (VvBGLUs), VvGR y VvG6PDH se expresan naturalmente durante el proceso de salida de las yemas de la ED, se estudió su expresión durante el curso normal de salida de las yemas de la ED en la Región Metropolitana (33° 34' lat. S). Las extracciones de RNA de yemas de vid se realizaron en cuatro fechas, las que fueron determinadas de acuerdo al status dormante de las yemas determinado previamente (Pérez *et al.*, 2007). La primera extracción se realizó el día 9 de Junio, cuando las yemas se encuentran endodormantes, y las otras extracciones se realizaron en tres fechas posteriores, 27 de Junio, 17 de Julio y 6 de Agosto, cuando las yemas se encuentran saliendo de la ED (Pérez *et al.*, 2007). Los resultados muestran que los transcritos de VvBGLU78 y VvBGLU22 no se expresan durante el mes de Junio cuando las yemas se encuentran endodormantes. VvBGLU78 se expresa en las dos últimas fechas evaluadas, mientras que VvBGLU22 se expresa sólo a inicios de Agosto cuando las yemas se han liberado completamente de la ED (Fig. 15A). El transcrito de VvGR se expresa sólo en las dos ultimas fechas de evaluación, mientras que el transcrito VvG6PDH se expresa débilmente en las muestras colectadas el mes de Junio y sólo se expresan significativamente una vez iniciado el proceso de salida de las yemas de la ED. (Fig. 15B).

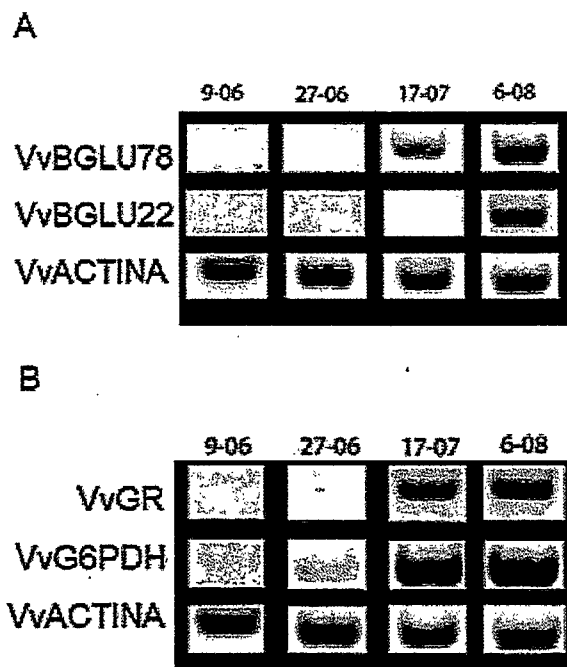
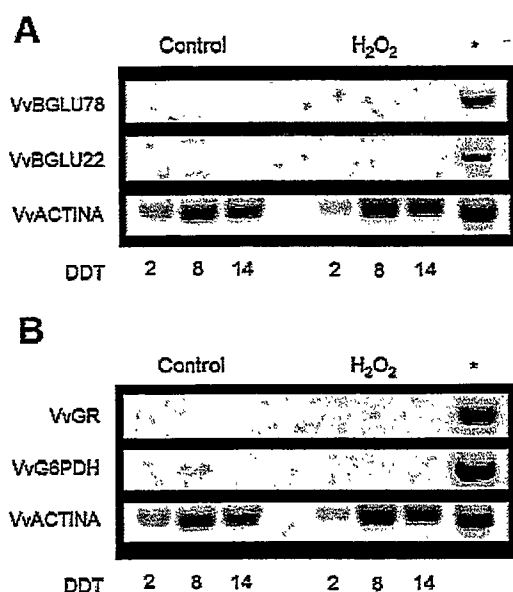


Figura 15. Análisis de la expresión de transcritos durante la salida de la endodormancia en yemas de vid (*Vitis vinifera* cv. Thompson seedless). A: Expresión de los transcritos de VvBGLUs: VvBGLU78 y VvBGLU22. B: Expresión de transcritos de VvGR y VvG6PDH. La expresión de los transcritos se analizó mediante RT-PCR en el RNA total extraído de yemas colectadas el año 2008, en las fechas siguientes: 9 de Junio, 27 de Junio, 17 de Julio y 6 de Agosto. La expresión del gen de actina de *V. vinifera* (VvACTINA) se usó como control interno en todos los PCRs. Los resultados presentados son producto de un solo ensayo (n=1).

### 6.11. La expresión de los transcritos VvBGLU78, VvBGLU22, VvGR y VvG6PDH no es inducida por peróxido de hidrógeno en yemas de vid.

Dado que las aplicaciones de HC aumentan los niveles de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en yemas de vid, se ha postulado que éste podría mediar el efecto de HC sobre la inducción de la brotación de las yemas (Or *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2008). En este trabajo, se analizó el efecto de  $H_2O_2$  sobre el perfil de expresión de los transcritos VvBGLU78, VvBGLU22, VvGR y VvG6PDH los días 2, 8 y 14 post-tratamiento. Los resultados de la figura 16 muestran que la aplicación exógena de  $H_2O_2$  (1% v/v) no estimula la expresión de estos transcritos.



**Figura 16.** Efecto del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sobre la expresión de transcritos en yemas ED de vid. **A)** Expresión de los transcritos de VvBGLUs: VvBGLU78 y VvBGLU22. **B)** Expresión de transcritos de VvGR y VvG6PDH. La expresión los transcritos se analizó mediante RT-PCR en el RNA total extraído de yemas colectadas el 9 de Junio del 2008, y las extracciones se realizaron los días 2, 8 y 14 luego de ser tratadas y colocadas en la cámara de crecimiento bajo condiciones forzadas. La expresión del transcrito VvACTINA (gen de actina de *V. vinifera*) se usó como control interno para chequear cada uno de los cDNAs de yema. Además se realizaron controles internos de PCR donde cada par de partidores se probó con cDNA de hoja (\*). Los resultados presentados son producto de un solo ensayo (n=1).

De modo similar a como se observa en las figuras 12 y 13, la expresión del transcrito del gen de actina (VvACTINA) presenta una baja expresión el día 2 en las yemas control. Una posible explicación es que la transferencia de las yemas colectadas hacia la cámara de crecimiento genere este efecto en las yemas control, y que sea algún tipo de respuesta en un periodo de ajuste a las nuevas condiciones de luz, humedad y temperatura. En las yemas tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también se aprecia el mismo efecto el día 2 (Fig. 16) no así en los tratamientos con HC y NaN<sub>3</sub> (Fig. 12 y Fig. 13), confirmando el poco efecto que este compuesto tuvo sobre las yemas ED de vid. Por otra parte se esperaba que producto del efecto de la cámara de crecimiento, el día 14 apareciera la expresión de los transcritos de VvBGLUs, VvGR y VvG6PDH como en las figuras 12 y 13. Su no aparición puede

relacionarse con el desfase observable en la brotación de las yemas control entre las figuras 5 y 6. Siguiendo esa lógica, si el inicio de la brotación se desfasó en aproximadamente 10 días, la expresión de VvBGLUs debería haber aparecido entre los días 18 y 24. Eso explicaría la ausencia de la expresión de estos transcritos el día 14. En el caso del tratamiento con peróxido de hidrógeno, si efectivamente este compuesto media la acción de la cianamida hidrogenada, se habría esperado algún efecto sobre los cuatro transcritos analizados, por lo menos en los días 8 y 14.

#### **6.12. La expresión de los transcritos VvBGLU78, VvBGLU22, VvGR, y VvG6PDH no es inducida por el frío.**

Actualmente, existe el supuesto de que los tratamientos con HC de las yemas ED de vid compensan la falta de frío u horas frío (horas que las yemas están sometidas a condiciones de temperatura inferiores a 7°C durante el periodo de receso invernal o dormancia (Saure, 1985)), lo que conlleva a la creencia de que el frío es necesario para la salida de las yemas de la ED y que HC sustituye los efectos del frío. Para determinar si esto es cierto, se diseñó un experimento donde se colectaron a principios de Junio dos grupos de yemas ED. A uno de ellos se le extrajo el RNA inmediatamente después de la colecta y se analizó mediante RT-PCR la expresión de los transcritos que son inducidos por HC y  $\text{NaN}_3$ : VvBGLU78, VvBGLU22, VvGR, y VvG6PDH (Fig.12 y Fig.13). El otro grupo de yemas se mantuvo a 4°C durante 240 horas, ya que a la fecha se estimó que las yemas ED llevaban ya acumuladas aproximadamente 340 horas frío (Pérez *et al.*, 2007) con la finalidad de que completaran su requerimiento de frío de aproximadamente

600 horas (Gil, 2000), y posteriormente, se extrajo el RNA y se analizó la expresión de los transcritos. Al comparar los resultados entre las yemas control y las yemas mantenidas en frío, se pudo observar que el frío no tuvo ningún efecto sobre la expresión de los transcritos analizados (Fig. 17).

Se ha considerado durante varias décadas al frío como un inhibidor ambiental de la actividad catalasa en yemas de vid (Nir *et al.*, 1986). Era de esperar entonces en este experimento, que producto del tratamiento de frío se haya generado la inhibición de la actividad catalasa con un consiguiente aumento en los niveles endógenos de  $H_2O_2$ , y que esta alza generara la activación de la transcripción de VvBGLU78, VvBGLU22, VvGR y VvG6PDH. Sin embargo, al igual a como ocurrió en el experimento con  $H_2O_2$  exógeno (Fig. 16), el tratamiento de frío no estimuló la transcripción de ninguno de los transcritos analizados en este estudio.

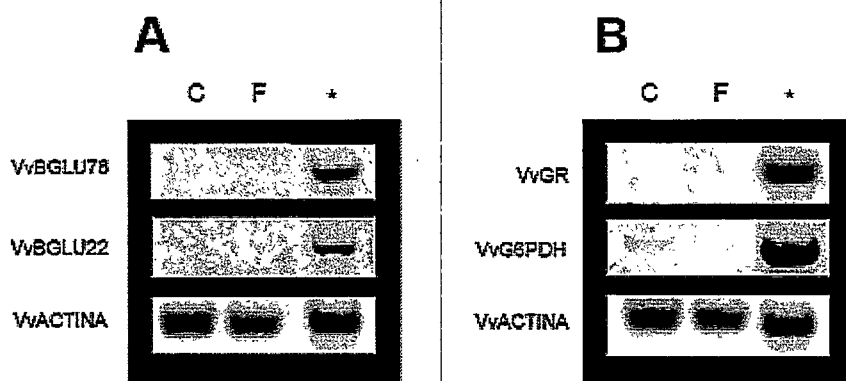


Figura 17. Efecto del frío sobre la expresión de transcritos en yemas ED de vid (*Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless) colectadas el 9 de Junio del 2008 en el valle de Maipo. A: Visualización en gel de agarosa 1,5% (p/v) de la expresión de los transcritos de VvBGLU: VvBGLU78 y VvBGLU22. B: Visualización en gel de agarosa 1,5% (p/v) de la expresión de transcritos de VvGR y VvG6PDH. La expresión de los transcritos fue analizada por RT-PCR. La expresión del transcrito VvACTINA (gen de actina de *V. vinifera*) se usó como control interno para chequear cada uno de los cDNAs de yema. Además se realizaron controles internos de PCR donde cada par de partidores se probó con cDNA de hoja (\*). C: yemas control; F: frío, yemas mantenidas 240 horas a 4°C. Los resultados presentados son producto de un solo ensayo (n=1).



## VII. DISCUSIÓN

### **7.1. 1,3- $\beta$ -glucanasas en relación a la salida de dormancia en yemas de vid.**

En yemas de vid, la estimulación de la expresión de transcritos de 1,3- $\beta$ -glucanasa como consecuencia de la aplicación de HC y  $\text{NaN}_3$  (Fig.12) coincide con el modelo de ciclo de dormancia propuesto por Rinne *et al.* (2001) para explicar la inducción y salida de dormancia en Abedul (*Betula pubescens*) (Fig. 2). En ese modelo, la interrupción de las vías simplásmicas a causa de la deposición de callosa (1,3- $\beta$ -glucano) en los plasmodesmos gatillarían la ED, mientras que la liberación de la ED estaría asociada con la degradación de la callosa por acción de las 1,3- $\beta$ -glucanasas, con el subsiguiente reestablecimiento de las vías simplásmicas y las comunicaciones célula-célula. Por otro lado, la estimulación de la transcripción de 1,3- $\beta$ -glucanasa ha sido demostrada en un reciente estudio sobre el efecto del estrés térmico “heat-shock” (HS) en yemas de vid (Or *et al.*, no publicado). Así, la inducción de los transcritos de 1,3- $\beta$ -glucanasa por medio de agentes liberadores de dormancia, como son  $\text{NaN}_3$ , HC y HS, apoya la hipótesis de que estas enzimas son clave en el proceso de salida de las yemas de la ED.

### **7.2. Participación del ciclo ascorbato-glutación y la vía de las pentosas fosfato en la salida de endodormancia en yemas de vid.**

Las mediciones de glutatión y de la relación GSH/GSSG en las yemas de vid (Fig. 14) muestran que, inicialmente, las yemas tienen una baja razón GSH/GSSG, lo cual es usual en tejidos en receso. Diversos estudios han asociado los altos niveles de GSSG con

la deshidratación del tejido (Kranmer y Grill, 1996). Las yemas endodormantes son tejidos altamente deshidratados o con poca agua libre disponible (Faust *et al.*, 1991; Vertucci y Stushnoff, 1992), y la disecación es comúnmente inducida como parte del proceso de aclimatación al frío (Steponkus, 1990). En abeto (*Picea abies*), se ha demostrado que los niveles de GSSG en los tejidos son varias veces superiores durante el invierno que durante el verano (Esterbauer y Grill, 1978).

En este trabajo, se demostró que  $\text{NaN}_3$  estimula la expresión de la enzima glutatión reductasa (Fig. 13), una enzima antioxidativa que participa del CAG, y que es inducida en respuesta a estrés oxidativo (Pastori y Trippi, 1992). La misma respuesta ha sido reportada anteriormente en yemas de vid frente a estímulos como HS y HC (Halaly *et al.*, 2008). En este trabajo, se demuestra por primera vez que la VPF, responsable de la producción de NADPH en las células vegetales y animales (Baxter *et al.*, 2007; Salvemini *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2004), es estimulada en respuesta a  $\text{NaN}_3$  y HC, como se vio reflejado por la inducción de la expresión del transcrito de VvG6PDH (Fig. 13). El aumento en la relación GSH/GSSG como producto de la aplicación de HC y  $\text{NaN}_3$  a las yemas de vid podría estar relacionado con la inducción tanto del CAG como de la VPF ya que la conversión de GSSG a GSH es dependiente de la actividad de la enzima GR perteneciente al CAG, y su actividad es dependiente de la presencia de NADPH que se produce en la VPF, principalmente por la enzima G6PDH (Dalton *et al.*, 1986; Clancy *et al.*, 1994). También se ha sugerido que el glutatión estaría involucrado en la salida de las yemas de la ED en vid (Fuchigami y Nee, 1987). Tohbe *et al.* (1998a, 1998b) concluyeron que el glutatión juega un papel importante en el control de la dormancia de yemas de vid, ya que demostraron que la aplicación de glutatión reducido (GSH)

producía la salida de la dormancia y además probaron que tratamientos con GSSG exógeno eran capaces de inhibir la brotación.

### 7.3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en relación a la salida de dormancia en yemas de vid.

Ha sido bien establecido que como resultado de la aplicación de HC a las yemas de vid, éstas acumulan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en sus tejidos (Nir y Lavee, 1993; Pérez *et al.*, 2008), por lo cual se ha sugerido que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podría mediar la respuesta de HC de inducir la salida de la ED en yemas de vid. Además, en juncos (*Phragmites communis*) se ha reportado que aplicaciones exógenas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentan la actividad enzimática de G6PDH y GR, y el contenido de GSH (Wang *et al.*, 2008), lo cual favorecería la salida de las yemas de la ED. Sin embargo, en este trabajo, la aplicación exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a yemas dormantes de vid presentó un efecto marginal en la salida de la ED y en la brotación de las yemas (Fig. 6). Estos resultados fueron consistentes con la ausencia de efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la transcripción de VvGR, VvG6PDH o 1,3-β-glucanasas en las yemas de vid (Fig. 16). Sin embargo, existe la posibilidad de que la aplicación exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> genere un estrés oxidativo insuficiente en las yemas de vid producto de la actividad de peroxidasas extracelulares, como ha sido reportado en células de *Arabidopsis* (Baxter *et al.*, 2007). Sin embargo, los resultados de los experimentos de brotación realizados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de inhibidores de la actividad catalasa (AMT y SA) permiten sugerir que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido endógenamente en respuesta al estrés oxidativo no sería la señal que media entre los agentes promotores de brotación (HC y NaN<sub>3</sub> que también inhiben la actividad catalasa (Nir y Lavee, 1993)) y salida de ED en yemas de vid.

#### 7.4. Papel de la acumulación de frío en la salida de las yemas de vid de la ED.

Diversos antecedentes en la literatura indican que la acumulación de frío durante la estación invernal es fundamental para el rompimiento de la dormancia y la brotación normal de las yemas en la primavera (Mathiason *et al.*, 2008). Es así como en Abedul (*Betula pubescens*) se ha demostrado que el frío (acumulación de horas frío) induce el rompimiento de la dormancia de yemas y estimula la expresión de 1,3- $\beta$ -glucanasas (Rinne *et al.*, 2001). En los frutales caducifolios también se ha señalado que la acumulación de frío juega un papel central en la salida de las yemas de la ED, y es así que se ha definido el concepto de requerimiento de frío de las especies, que habitualmente se expresa como horas frío y que indica el número de horas que las yemas deben ser expuestas a temperaturas no congelantes menores a 7 °C (Saure, 1985). En *Vitis* se ha postulado que los requerimientos de frío de la especie son de aproximadamente 600 h (Gil, 2000) y también se ha demostrado que la falta de frío provoca una brotación escasa y dispareja de las yemas (Pérez *et al.*, 2007). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el frío no induce la activación de ninguna de las vías (CAG, VPF) ni la transcripción de 1,3- $\beta$ -glucanasas (Fig. 17), que sí son inducidas por los agentes rompedores de la dormancia como HC, NaN<sub>3</sub> y HS, y que también son inducidas durante el transcurso normal de salida de las yemas de la ED. Más aún, un estudio realizado en *Vitis riparia* (Mathiason *et al.*, 2008), demuestra que la acumulación de frío, genera una inhibición general de las vías involucradas en el metabolismo de los carbohidratos, lo que se ve reflejado por ejemplo en la disminución de la expresión de EST con similitud a enzimas de sacarosa sintasa (SuSy) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), reforzando así la hipótesis de que el frío no juega un

papel que favorezca la salida de las yemas de la ED. Sin embargo, no es posible desconocer el papel que juega el frío en la brotación homogénea de las yemas, por lo cual el proceso de aclimatación al frío de las yemas adquiere especial relevancia como factor que explicaría los requerimientos de frío de la especie.

### **7.5. Glicólisis y actividad mitocondrial en relación con la salida de dormancia en yemas de vid.**

Existe evidencia del efecto estimulador de HC y HS en el metabolismo de los azúcares en yemas de vid. Ambos estímulos aumentan la transcripción de genes como sacarosa sintasa (SuSy), responsable de la degradación de la sacarosa, y de las enzimas piruvato descarboxilasa (PDC) y alcohol deshidrogenasa (ADH), pertenecientes a la vía fermentativa (Halaly *et al.*, 2008). Dado que tanto HC como  $\text{NaN}_3$  son inhibidores del complejo IV (citocromo c) de la cadena transportadora de electrones de la membrana interna de las mitocondrias, ambos compuestos interrumpen el consumo de  $\text{O}_2$ . Se ha aceptado que bajo condiciones de privación de  $\text{O}_2$ , las plantas requieren de la producción de ATP a través de la glicólisis y de la regeneración de  $\text{NAD}^+$  a través de la fermentación etanólica (Baxter *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 1991). Así surge la posibilidad de que alteraciones en el metabolismo de los azúcares producto de la privación de  $\text{O}_2$  sea responsable de la activación de las vías relacionadas con el mecanismo de salida de ED. Existen antecedentes, por ejemplo en hojas de trigo (*Triticum aestivum* L), de que una disminución de glucosa aumenta la actividad y los niveles de la enzima 1,3- $\beta$ -glucanasa, mientras que altos niveles de glucosa causan un rápido descenso en su abundancia

(Roulin y Feller, 2001). Por otro lado, en papa (*Solanum tuberosum*) se ha demostrado que la transcripción del gen de G6PDH (isoforma citosólica) es regulado más bien por la disponibilidad de azúcares metabolizables, en vez de por  $H_2O_2$ , y que  $H_2O_2$  no afecta ni su transcripción ni su actividad (Hauschild y von Schaewen, 2003).

Así el estrés respiratorio que se desarrolla en respuesta a los estímulos liberadores de dormancia como HC y  $NaN_3$  podrían modificar la disponibilidad de azúcares dentro del tejido de la yema, induciendo así una cascada de señalización que podría regular la transcripción de genes clave como por ejemplo 1,3- $\beta$ -glucanasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Estudios previos han demostrado que mitocondrias aisladas a partir de yemas de vid utilizan como sustrato exclusivamente NADH para la respiración (Pérez *et al.*, no publicado), lo que lleva a pensar que su actividad es altamente dependiente del estado redox del tejido. Durante la ED, y en relación a lo encontrado en las mediciones de GSH/GSSG, se aprecia que el tejido se encuentra altamente oxidado, lo que explicaría la baja actividad respiratoria de las mitocondrias presente en este período. Los tratamientos con HC y  $NaN_3$  elevan los niveles de GSH previo al momento de la brotación, con lo cual el tejido de la yema se torna más reducido favoreciendo así un aumento en los niveles de NADH, y esto estimularía posteriormente la respiración mitocondrial, lo que es evidente en el proceso de salida de ED y necesario a su vez para sustentar los requerimientos energéticos obvios durante el proceso de brotación.

### 7.6. Modelo propuesto de salida de endodormancia en yemas de vid.

A continuación, se propone un modelo que da explicación de la serie de eventos que podrían ocurrir y que concluyen en la salida del estado de endodormancia. En principio se propone a la mitocondria de las yemas como potencial centro sensor del estímulo de liberación de ED.

Los agentes químicos promotores de brotación, HC y  $\text{NaN}_3$  inhiben el consumo de  $\text{O}_2$  en las mitocondrias de las yemas. Este estrés respiratorio provocaría una caída en los niveles de ATP del tejido, generando así un aumento en la relación AMP/ATP. Esto actuaría como una señal que desencadenaría un fenómeno conocido como "Efecto Pasteur", lo que se traduce como la activación de la glicólisis y la desviación del metabolismo hacia la vía fermentativa. La glicólisis por sí sola genera sólo dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. La activación de la glicólisis es necesaria para compensar la caída en los niveles de ATP producto de la inhibición temporal de la actividad mitocondrial por efecto de los agentes químicos. La activación de la transcripción de genes de PDC y ADH que participan de la vía fermentativa es necesaria para la regeneración de  $\text{NAD}^+$  y sustentar así la glicólisis.

Producto de la activación de la glicólisis, es probable que ocurra un descenso en los niveles de glucosa-6-fosfato (G6P) en el citosol. Esta señal podría activar la transcripción de 1,3- $\beta$ -glucanasas, y también la transcripción de SuSy, lo que provocaría un aumento en los niveles de G6P en el citosol. La presencia de G6P, por su parte, puede estimular la vía de las pentosas fosfato mediante la transcripción de genes de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lo que conllevaría a un aumento en los niveles de NADPH, el

cual puede ser utilizado por la enzima glutatión reductasa perteneciente al ciclo ascorbato-glutatión. Con ello, se produciría un aumento en la relación GSH/GSSG, elevando así el potencial reductor en el citosol, lo cual tendría un efecto directo en los niveles de NADH y con ello en la respiración mitocondrial.

Así nos encontraríamos con el siguiente panorama, la activación de VPF tiene un efecto directo en la síntesis de ácidos nucleicos y algunos aminoácidos. La activación del CAG tiene efecto directo en el estado redox del citosol, permitiendo la activación del ciclo celular. La actividad de 1,3- $\beta$ -glucanasas permitiría una fluida transferencia de señales entre las células del MA de la yema, mediante la degradación de los esfínteres plasmodesmales. Así, finalmente, nos encontramos con las condiciones básicas características de la salida de ED (Fig. 18).

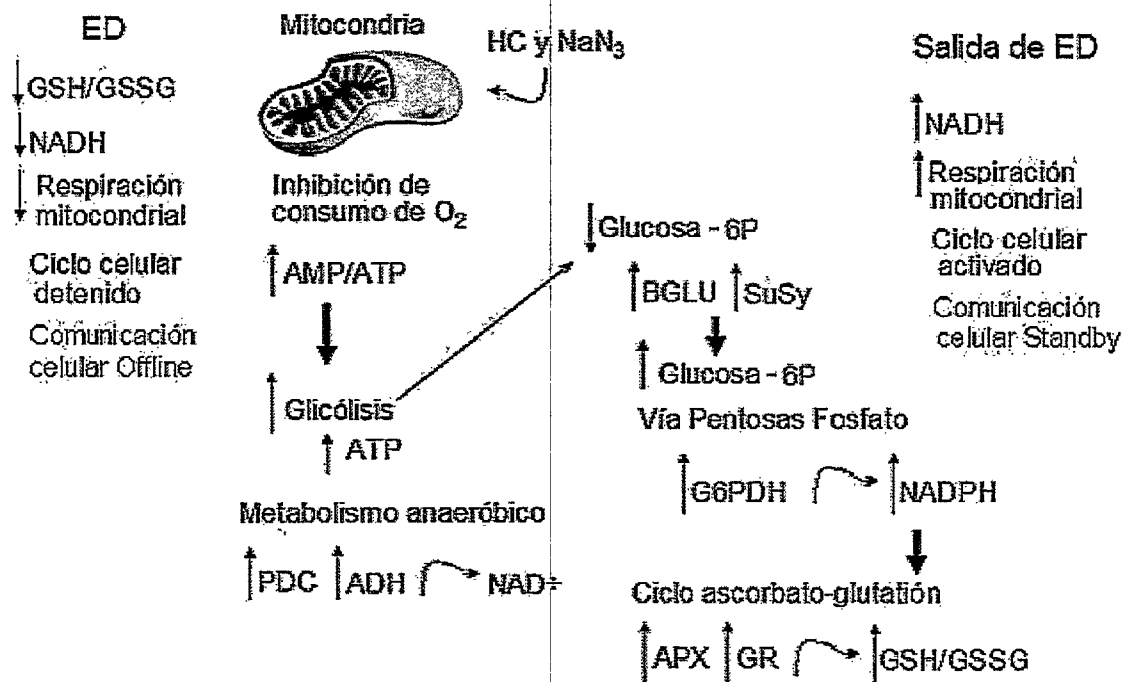


Figura 18. Modelo propuesto de salida de endormancia en yemas de vid. PDC: Piruvato descarboxilasa; ADH: Alcohol deshidrogenasa; BGLU: 1,3- $\beta$ -glucanasa; SuSy: Sacarosa sintasa; G6PDH: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; APX: Ascorbato peroxidasa; GR: Glutatión reductasa.



## VIII. CONCLUSIONES

En base a los resultados presentados en esta tesis se puede concluir que:

- 1.- La acumulación de frío en yemas de vid (*Vitis vinifera* cv. Thompson seedless) no activa las mismas vías metabólicas que los agentes químicos, cianamida hidrogenada (HC) y azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ), utilizados para promover la salida de la endodormancia (ED) y la brotación.
- 2.- El efecto de HC y  $\text{NaN}_3$  en la brotación no es mediado por peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ni por su efecto inhibitorio de la actividad catalasa en estos tejidos, sino más bien por la activación de las vías antioxidativas, como son el ciclo ascorbato-glutatión (CAG) y la vía de las pentosas fosfato (VPF).
- 3.- Se confirma además, que al igual como ocurre en estudios realizados en Abedul (*Betula pubescens*), la estimulación de la transcripción de genes de 1,3- $\beta$ -glucanasas en yemas de vid (VvBGLUs) es esencial para la salida de las yemas de la ED.
- 4.- Se concluye que existen fundadas evidencias que señalan a las mitocondrias como el centro sensor del estímulo de liberación de yemas de la ED. En este trabajo, se sugiere que producto del estrés respiratorio que HC y  $\text{NaN}_3$  provocan en las mitocondrias de las

yemas, se desencadena la cascada de señales que tiene como resultado la salida de las yemas de la ED y la posterior brotación de estas yemas.

## IX. PROYECCIONES

A partir de los resultados presentados en esta tesis, que han sido basados en el análisis de los niveles de transcritos de VvBGLU78, VvBGLU22, VvGR y VvG6PDH, surge la necesidad de realizar estudios que tiendan a determinar si la expresión de estos transcritos se traduce posteriormente en la estimulación de la actividad de las respectivas enzimas.

Además queda pendiente demostrar si alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos que generen cambios en los niveles de azúcares como glucosa-6-fosfato o sacarosa regulan ya sea la transcripción de VvBGLUs y/o de VvG6PDH en yemas de vid.

Si bien se ha demostrado que tanto la cianamida hidrogenada (HC) como la azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) son efectivos en la promoción de la brotación en yemas ED de vid, es innegable que se trata de dos compuestos altamente tóxicos, y que su aplicación siempre implica un riesgo para el hombre. Es por ello que aún persiste el desafío de encontrar otro compuesto, natural o sintético, que estimule la vía de las pentosas fosfato (VPF), el ciclo ascorbato-glutación (CAG) y la transcripción de BGLUs y que no signifique un daño para los tejidos vegetales ni amenace la seguridad y la salud de las personas durante su aplicación.

El siguiente paso en esta investigación es la identificación de los factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de los genes que participan de la VPF y CAG y el estudio de su funcionamiento.

## X. BIBLIOGRAFÍA

Allen J. F., Whatley F. R. (1978). Effects of inhibitors of catalase on photosynthesis and on catalase activity in unwashed preparations of intact chloroplasts. *Plant Physiol.*, 61: 957-960.

Arora R., Rowland L. J., Tanino K. (2003). Induction and release of bud dormancy in woody perennials: A science comes of age. *HortScience*, 38(5): 911-921.

Ballance G. M., Meredith W. O. S., Laberge D. E. (1976). Distribution and development of endo- $\beta$ -glucanase activities in barley tissues during germination. *Can. J. Plant Sci.*, 56: 459-466.

Baxter C. J., Redestig H., Schauer N., Repsilber D., Patil K. R., Nielsen J., Selbig J., Liu J., Fernie A. R., Sweetlove L. J. (2007). The metabolic response of heterotrophic *Arabidopsis* cells to oxidative stress. *Plant Physiol.*, 143: 312-325.

Bergmans A., de Boer D., van Bel A., van der Schoot C. (1993). The initiation and development of Iris flowers: permeability changes in the apex symplasm. *Flowering Newsl.*, 16: 19-26.

Caruso C., Chilosi G., Caporale C., Leonardi L., Bertini L., Magro P., Buonocore V. (1999). Induction of pathogenesis related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Sci.*, 140: 87-97.

Clancy R. M., Levartovsky D., Leszczynska-Piziak J., Yegudin J., Abramson S. B. (1994). Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(9): 3680-3684.

Cordero M. J., Raventos D., San Segundo B. (1994). Differential expression and induction of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases in response to fungal infection during germination of maize seeds. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 7: 23-31.

Dalton D. A., Russell S. A., Hanus F. J., Pascoe G. A., Evans H. J. (1986). Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 3811-3815.

Dat J. F., López-Delgado H., Foyer C. H., Scott I. M. (1998). Parallel changes in  $H_2O_2$  and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in Mustard Seedlings. *Plant Physiol.*, 116: 1351-1357

Erez A. (1987). Chemical control of bud break. *HortScience*, 22: 1240-1243.

Esterbauer H., Grill D. (1978). Seasonal variation of glutathione and glutathione reductase in needles of *Picea abies*. *Plant Physiol.*, 61: 119-121.

Fannell A., Hoover E. (1991). Photoperiod influences growth, bud dormancy and cold acclimation in *Vitis labruscana* and *Vitis riparia*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 116: 270-273.

Fannell A., Mathiason K., Luby J. (2004). Genetic segregation for indicators of photoperiod control of dormancy induction in *Vitis* species. *Acta Horticulturae* submitted.

Faust M., Liu D., Merle M. M., Stutte G. W. (1991). Bound versus free water in dormant apple buds - a theory for endodormancy. *HortScience*, 26: 887-890.

Fuchigami L. H., Nee C. C. (1987). Degree growth stage model and rest-breaking mechanisms in temperate woody perennials. *HortScience*, 22: 836-844.

Gil G. (1997). El potencial productivo. Santiago. Ediciones Universidad Católica de Chile. 342.

Gil G. (2000). La producción de fruta. Santiago. Ediciones Universidad Católica de Chile. 583.

Halaly T., Pang X., Batikoff T., Crane O., Keren A., Venkateswari J., Ogrodovitch A., Sadka A., Lavee S., Or E. (2008). Similar mechanisms might be triggered by alternative external stimuli that induces dormancy release in grape buds. *Planta*, 228: 79-88.

Hauschild R., von Schaewen A. (2003). Differential regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzyme activities in potato. *Plant Physiol.*, 133: 47-62.

Kent W. J. (2002). BLAT, the Blast-like alignment tool. *Genome Research*, 12: 95-103.

Kombrink E., Somssich I. E. (1997). Pathogenesis-related proteins and plant defense. *In* G.C. Carroll, P. Tudzynski, eds, *The Mycota V. Plant Relationships Part A*. Springer-Verlag, Berlin, 107-128.

Kranmer I., Grill D. (1996). Significance of thiol-disulfide exchange in resting stages of plant development. *Botanica Acta*, 109: 8-14.

Kranmer I., Lutzoni F. (1999). Evolutionary consequences of transition to a lichen symbiotic state and physiological adaptation to oxidative damage associated with poikilohydry. *In*: Lerner HR, ed. *Plant response to environmental stress: from phytohormones to genome reorganization*. New York, USA: Dekker, 591-628.

Lang G. (1987). Dormancy: a new universal terminology. *HortScience*, 22: 817-820.

Lang G. (1994). Dormancy - the missing links: molecular studies and integration of regulatory plant and environmental interactions. *HortScience*, 29: 1255-1263.

Lavee S., May P. (1997). Dormancy of grapevine buds - facts and speculation. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 3: 31-46.

Leubner-Metzger G., Meins F. Jr. (1999). Functions and regulation of plant  $\beta$ -1,3-glucanases (PR-2). In SK Datta, S Muthukrishnan, eds, *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL., 49-76

Lucas W., Ding B., van der Schoot C. (1993). Plasmodesmata and supracellular nature of plants. *New Phytol.*, 125: 435-476.

Mathiason K., He D., Grimplet J., Venkateswari J., Galbraith D. W., Or E., Fennel A. (2008). Transcript profiling in *Vitis riparia* during chilling requirement fulfillment reveals coordination of gene expression patterns with optimized bud break. *Funct. Integr. Genomics*.

Nir G., Lavee S. (1993). Metabolic changes during cyanamide induced dormancy release in grapevines. *Acta Hortic.* 329: 271-274.



Nir G., Shulman Y., Fanbergstein L., Lavee S. (1986). Changes in the activity of catalasa (EC 1.11.1.6) in relation to the dormancy of grapevine (*Vitis vinifera L.*) buds. *Plant Physiol.*, 81: 1140-1142.

Noctor G., Gómez L., Vanacker L., Foyer C. (2002). Interaction between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1283-1304.

Noriega X., Burgos B., Pérez F. J. (2007). Short day-photoperiod triggers and low temperatures increase expression of peroxidase RNA transcripts and basic peroxidase isoenzyme activity in grapevine buds. *Phytochemistry*, 68: 1376-1383.

Or E., Nir G., Vilozny I. (1999). Timing of hydrogen cyanamide application to grapevine buds. *Vitis*, 38: 1-6.

Or E., Vilozny I., Fennell A., Eyal Y., Ogrodovitch A. (2002). Dormancy in grape buds: isolation and characterization of catalasa cDNA and analysis of its expression following chemical induction of bud dormancy release. *Plant Sci.*, 162: 121-130.

Pacey-Miller T., Scout K., Valet E., Tingey S., Ching A., Henry R. (2003). Genes associated with the end of dormancy in grapes. *Funct. Integr. Genomics*, 3: 144-152.

Pastori G. M., Trippi V. S. (1992). Oxidative stress induces high rate of GR synthesis in a drought resistant maize strain. *Plant Cell Physiol.*, 33: 957-961.

Pérez F. J., Lira W. (2005). Possible role of catalasa in post-dormancy bud break in grapevines. *J. Plant Physiol.*, 162: 301-308.

Pérez F. J., Rubio S., Ormeño-Núñez J. (2007). Is erratic bud-break in grapevines grown in warm winter areas related to disturbances in mitochondrial respiratory capacity and oxidative metabolism?. *Functional Plant Biology*, 34: 624-632.

Pérez F. J., Vergara R., Rubio S. (2008). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is involved in the dormancy-breaking effect of hydrogen cyanamide in grapevine buds. *Plant Growth Regul.*, 55: 149-155.

Petruzzelli L., Kunz C., Waldvogel R., Meins F. Jr., Leubner-Metzger G. (1999). Distinct ethylene- and tissue-specific regulation of  $\beta$ -1,3-glucanases and chitinases during pea seed germination. *Planta*, 209: 195-201.

Rinne P. L. H., Kaikuranta P. M., van der Schoot C. (2001). The shoot apical meristem restores its symplasmic organization during chilling-induced release from dormancy. *The Plant Journal*, 26: 249-264.

Rinne P. L. H., van der Schoot C. (1998). Symplasmic fields in the tunica of the shoot apical meristem coordinate morphogenetic events. *Development*, 125: 1477-1485.

Roulin S., Feller U. (2001). Reversible accumulation of (1,3- 1,4)- $\beta$ -glucan endohydrolase in wheat leaves under sugar depletion. *Journal of Experimental Botany*, 365: 2323-2332.

Rozen S., Skaletsky H. (2000). Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ), 132: 365-386.

Salvemini F., Franzé A., Iervolino A., Filosa S., Salzano S., Ursini M. V. (1999). Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression. *J. Biol. Chem.*, 274: 2750-2757.

Saure M. C. (1985). Dormancy release in deciduous fruit trees. *Horticultural Reviews*, 7: 239-299.

Schnabel B., Wample R. (1987). Dormancy and cold hardiness in *Vitis vinifera L.* cv. White riesling as influenced by photoperiod and temperature. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 38: 265-272.

Seeley S. D. (1994). Dormancy: the black box. *HortScience*, 29: 1248.

Shulman Y., Nir G., Fanberstein L., Lavee S. (1983). The effect of cyanamide on the release from dormancy of grapevines buds. *Sci. Hort.*, 19: 97-104.

Smith I. K. (1985). Stimulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalase inhibitors. *Plant Physiol.*, 79: 1044-1047.

Steponkus P. (1990). Cold acclimation and freezing injury from a perspective of the plasma membrane. In *Environmental Injury to Plants* (ed. F. Katterrrran). Academic Press, San Diego. 1-16.

Stone B., Clarke A. (1992). *Chemistry and biology of (1,3)- $\beta$ -D glucans*. La Trobe University Press, Melbourne.

Tohbe M., Mochioka R., Horiuchi S., Ogata T., Shiozaki S., Kurooka H. (1998a). Roles of ACC and glutathione during breaking of dormancy in grapevine buds by high temperature treatment. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 67(6): 897-901.

Tohbe M., Mochioka R., Horiuchi S., Ogata T., Shiozaki S., Kurooka H. (1998b). The role of glutathione on the onset of endodormancy of grape buds. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 67(6): 912-916.

van der Schoot C., Rinne P. L. H. (1999). The symplasmic organization of the shoot apical meristem of angiosperms. In *Plasmodesmata: Structure, Function, Role in Cell Communication* (van Bel, A. J. E. and van Kesteren, W. J. P., eds) Dordrecht: Springer, 225-242.

van Loon L. C. (1999). Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In SK Datta, S Muthukrishnan, eds, *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL. 1-19.

Vertucci C. W., Stashnoff C. (1992). The state of water in acclimating vegetative buds from *Malus* and *Amelanchier* and its relationship to winter hardiness. *Physiol. Plant.*, 86: 503-511.

Wang S. Y., Jiao H. J., Faust M. (1991). Changes in metabolic enzyme activities during thidiazuron-induced lateral bud break of apple. *HortScience*, 82: 231-236.

Wang X., Ma Y., Huang C., Wan Q., Li N., Bi Y. (2008). Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a central role in modulating reduced glutathione levels in reed callus under salt stress. *Planta*, 227: 611-623.

Waterkeyn L. (1967). Sur l'existence d'un "stade callosique", presente par la paroi cellulaire, au cours de la cytokinese. *CR Acad. Sci. Paris D.*, 265: 1792-1794.

Young L. C. T., Winneberger J. T., Bennett J. P. (1973). Growth of resting buds. J. Am. Soc. Hort. Sci., 99: 146-149.

Yu L., Lan W., Chao C., Ying Y. (2004). Glutathione levels control glucose-6-phosphate dehydrogenase activity during elicitor induced oxidative stress in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. Plant Sci., 167: 329-335.