



**Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas  
Universidad Nacional de Rosario**



**Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos**

Tesis de Doctorado

***“Caracterización funcional de factores implicados en la protección  
frente al daño por frío en frutos de durazno”***

**Mauro Gismondi**

Licenciado en Biotecnología

Directora

**Dra. Claudia A. Bustamante**

Rosario, Argentina

2018

***“Caracterización funcional de factores implicados en la protección  
frente al daño por frío en frutos de durazno”***

**Mauro Gismondi**

Licenciado en Biotecnología

**Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas**

**Universidad Nacional de Rosario**

La presente Tesis es parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Centro de Estudios fotosintéticos y Bioquímicos (CEFOBI), Departamento Química Biológica, Área Química Biológica, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 01/04/2013 y el 28/03/2018, bajo la dirección de la Dra. Claudia Anabel Bustamante.

Directora Dra. Claudia A. Bustamante .....

Defendida .....

Parte de los resultados obtenidos en la presente tesis se han dado a conocer en las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos científicos:

**Gismondi, M.**, Daurelio, L. D., Monti, L. L., Lara, M. V., Drincovich, M.F. y Bustamante, C.A. In silico characterization of peach heat treatment-responsive gene promoters. *cisAnalyzer*: a novel tool for motif finding, enrichment, cooccurrence, and discovery (enviado).

**Gismondi, M.**, Strologo, L., Gabilondo, J., Budde, C. O., Lara, M. V., Drincovich, M. F. y Bustamante, C. A. (2017) *PpTRAF* y *AtTRAF* pertenecen a una nueva clase de ARN chaperonas con funcionalidad conservada en respuestas a estrés por temperatura. Póster. I Simposio de Genómica Funcional de Plantas. Rosario, Argentina.

**Gismondi, M.**, Strologo, L., Gabilondo, J., Budde, C. O., Lara, M. V., Drincovich, M. F. y Bustamante, C. A. (2016) Functional characterization of peach fruit *PpZAT12* and *Arabidopsis AtZAT12* transcription factors. Póster. Fronteras en Biociencia 2. IBIOBA Max-Planck, Buenos Aires, Argentina.

Strologo, L., **Gismondi, M.**, Gabilondo, J., Budde, C., Lara, M.V., Drincovich, M.F. y Bustamante, C.A. (2016) *AtTRAF*: a novel RNA chaperone involved in temperature stress responses in *Arabidopsis*. Póster. Biocell. LII Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Córdoba, Argentina.

**Gismondi, M.**, Gabilondo, J., Budde, C. O., Lara, M. V., Drincovich, M. F. y Bustamante, C. A. (2015) *PpTRAF* is a heat treatment-induced RNA chaperone with a role against chilling injury in peach fruit. Póster. Biocell. LI SAIB. Mar del Plata, Argentina.

**Gismondi, M.**, Gabilondo, J., Budde, C. O., Lara, M. V., Drincovich, M. F. y Bustamante, C. A. (2014) *PpZAT12* expression in peach fruit: a transcription factor with a role against chilling injury. Póster. Biocell. L SAIB. Rosario, Argentina.

**Gismondi, M.**, Gabilondo, J., Budde, C. O., Lara, M. V., Drincovich, M. F. y Bustamante, C.A. (2014) Caracterización funcional del gen *PpTRAF*: un factor involucrado en la protección frente al daño por frío en duraznos. Póster. Biocell. XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal (RAFV). Mar del Plata, Argentina.

## ***Agradecimientos***

En primer lugar, agradezco a la Dra. Claudia Bustamante por dirigir mi tesis, acompañarme incondicionalmente y brindarme consejos útiles desde mis comienzos. A la Dra. Fabiana Drincovich por permitirme formar parte de este grupo de investigación y dedicarse plenamente con ideas y consejos cada vez que lo necesité. A ambas por confiar en mí, permitirme explorar diversos caminos durante mi doctorado y responder siempre con una sonrisa.

A mis amigos del Lab SS, hacen muy divertidos los d de lab, son los mejores compañeros y recopilé inolvidables momentos durante todo este tiempo. A Agus por su compañía en todo, JP por las mejores ideas y risas, Flaca por sus consejos, a Pablo, LauM, Marianita, LauS, Pitu, Romi, Cami, Gino, Walter, Tati, Flor, Nery, Chivi, Mari, Adri, Sol, Pau, por formar parte de este grupo con tanta buena onda.

A los integrantes del CEFOTI ya que más de uno estuvo presente cuando requerí su ayuda y más especialmente los investigadores del Lab SS, porque siempre respondieron mis dudas, desde el primer día, y por compartir conmigo las horas de trabajo con mucha alegría y risas.

A Marcos, Marty y Gringa por disfrutar conmigo cada vez que se pueda.

A mis viejos, Cami y Jula, y a Pau por acompañarme siempre (Cami por tus dotes artísticos).

Y por último dedico esta tesis a Mai, mi compañera full-time, por comprenderme, ayudarme y compartir conmigo todos los d, y porque te quiero muchísimo.

# Índice

<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>6</b>
<b>1. Introducción general</b> .....	<b>8</b>
1.1. El duraznero, una especie de importancia agronómica .....	9
1.2. El fruto de durazno: descripción botánica.....	10
1.2.1. Desarrollo y maduración .....	11
1.2.1.1. Maduración fisiológica y organoléptica.....	12
1.2.1.2. Cambios asociados a la maduración organoléptica .....	12
1.3. Poscosecha en duraznos.....	13
1.3.1. Daño por frío .....	14
1.3.1.1. Harinosidad.....	14
1.3.1.2. Pardeamiento interno .....	15
1.3.1.3. Enrojecimiento interno.....	16
1.3.2. Estrategias preventivas del daño por frío .....	16
1.4. Investigación en poscosecha y antecedentes de nuestro grupo .....	17
1.4.1. Genoma de duraznero, su investigación en la actualidad .....	17
1.4.2. Presente tesis de doctorado .....	18
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>20</b>
2.1. Objetivo general .....	21
2.2. Objetivos específicos .....	21
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	<b>23</b>
3.1. Caracterización <i>in silico</i> de determinantes moleculares implicados en la protección frente al daño por frío en duraznos .....	23
3.1.1. Construcción de una base de determinantes implicados en la respuesta a tratamiento térmico en duraznos.....	23
3.1.1.1. Asignación de determinantes a genes de duraznero .....	24
3.1.1.2. Recopilación de anotaciones, reportes y datos de expresión en otras frutas y <i>A. thaliana</i> ...	25

3.1.1.3. Conformación de grupos de genes posiblemente coregulados y obtención de sus secuencias regulatorias upstream .....	25
3.1.1.4. Obtención y análisis de los factores de transcripción incluidos en la base de determinantes creada y de sus sitios de unión asociados .....	26
3.1.2. Estudios <i>in silico</i> de elementos <i>cis</i> conocidos en las secuencias regulatorias de los grupos de determinantes conformados.....	26
3.1.3. Búsqueda de factores de transcripción de duraznos y otros frutos, capaces de unir a los motivos identificados. Recopilación de información filogenética y funcional .....	27
3.2. Selección de factores de posible funcionalidad protectora frente al daño por frío, a caracterizar bioinformática y experimentalmente.....	28
3.2.1. Caracterización bioinformática de los factores seleccionados .....	28
3.3. Material biológico.....	29
3.3.1. <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.....	29
3.3.1.1. Variedades y tratamientos poscosecha.....	30
3.3.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo <i>Col-0</i> .....	31
3.3.2.1. Cultivo de plantas en suelo.....	31
3.3.2.2. Cultivo de plantas en placa. Esterilización de semillas.....	31
3.3.3. <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	32
3.3.4. <i>Escherichia coli</i> .....	32
3.3.4.1. Crecimiento de <i>E. coli</i> y medios de cultivo .....	32
3.3.5. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	33
3.3.5.1. Crecimiento de <i>A. tumefaciens</i> y medios de cultivo .....	33
3.4. Reacción de Transcripción Reversa seguida de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-qPCR) .....	33
3.4.1. Estudios de los niveles de ARNms <i>PpTRAF</i> y <i>PpZAT12</i> en <i>P. persica</i> .....	33
3.4.1.1. Toma de muestras en condiciones poscosecha de maduración, tratamiento térmico y refrigeración, de diversas variedades de <i>P. persica</i> .....	33
3.4.1.2. Toma de muestras de diversos órganos de <i>P. persica</i> cv. Dixiland .....	35
3.4.1.3. Extracciones de ARN total de frutos, hojas y flores de <i>P. persica</i> .....	35
3.4.2. Estudios de los niveles de ARNms <i>AtTRAF</i> , <i>AtZAT12</i> y otros transcritos en <i>A. thaliana</i> ..	36
3.4.2.1. Toma de muestras de diversos órganos de <i>A. thaliana</i> .....	36
3.4.2.2. Toma de muestras foliares de <i>A. thaliana</i> bajo estímulos de temperatura.....	36
3.4.2.3. Toma de muestras foliares de genotipos de trabajo de <i>A. thaliana</i> .....	36
3.4.2.4. Extracciones de ARN total de diferentes órganos de <i>A. thaliana</i> .....	37

3.4.3. Determinación de la cantidad y pureza del ARN total obtenido .....	37
3.4.4. Determinación de la calidad del ARN total obtenido .....	38
3.4.5. Eliminación de ADN genómico .....	38
3.4.6. Diseño de cebadores específicos para los diferentes ARNm a analizar mediante RT-qPCR .....	39
3.4.7. Reacción de transcripción reversa .....	40
3.4.8. Reacción de Transcripción Reversa seguida de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-qPCR) .....	41
3.4.9. Determinación de la expresión génica y análisis estadísticos .....	41
3.5. Obtención de constructos recombinantes de interés. Cebadores, clonados y subclonados ..	42
3.5.1. Diseño de cebadores específicos .....	42
3.5.2. Obtención de moldes adecuados para la amplificación de fragmentos de interés .....	42
3.5.2.1. Extracciones de ADN genómico de hojas de <i>P. persica</i> y <i>A. thaliana</i> .....	42
3.5.2.2. Reacción de transcripción reversa para utilizar como molde de PCR para clonados .....	43
3.5.3. Amplificación de fragmentos de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	43
3.5.4. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa .....	44
3.5.5. Vectores de clonado y subclonado .....	44
3.5.6. Reacciones de ligación de insertos en vectores .....	45
3.5.7. Obtención de plásmidos recombinantes y verificación de la presencia de inserto .....	45
3.5.7.1. Selección de transformantes positivos .....	45
3.5.7.2. Identificación de plásmidos recombinantes por PCR colonia .....	45
3.5.7.3. Extracción de ADN plasmídico .....	45
3.5.7.4. Identificación de plásmidos recombinantes por análisis de restricción .....	46
3.5.7.5. Secuenciación de plásmidos recombinantes .....	46
3.5.8. Transformación química de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	46
3.6. Análisis comparativos de la estructura primaria de secuencias codificantes y regulatorias de los genes <i>PpZAT12</i> y <i>PpTRAF</i> provenientes de las variedades en estudio .....	47
3.7. Determinación de la localización subcelular de PpTRAF y AtTRAF .....	47
3.7.1. Preparación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i> GV3101 .....	47
3.7.2. Transformación química de células competentes de <i>A. tumefaciens</i> GV3101 .....	48
3.7.3. Agrotransformación transitoria de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	48

3.7.4. Agrotransformación estable de óvulos de <i>A. thaliana</i> (Floral dip) .....	49
3.7.5. Visualización de proteínas fluorescentes por microscopía .....	49
3.7.6. Extracción de proteínas totales e inmunodetección (Western blot) del producto de fusión .....	50
3.8. Ensayos de complementación funcional de <i>PpTRAF</i> y <i>AtTRAF</i> en cepas especiales de <i>E. coli</i> .....	51
3.8.1. Análisis de supervivencia de las cepas transformadas .....	51
3.8.2. Verificación de la presencia de las proteínas <i>PpTRAF</i> y <i>AtTRAF</i> en las cepas transformadas .....	52
3.9. Obtención de genotipos mutantes de <i>AtTRAF</i> y <i>AtZAT12</i> en <i>A. thaliana</i> .....	52
3.9.1. Líneas mutantes comerciales adquiridas .....	52
3.9.2. Verificación de las mutaciones por inserción en estado de homocigosis .....	53
3.9.2.1. Diseño de oligonucleótidos cebadores y PCR para verificar inserción en homocigosis.....	53
3.9.3. Verificación de los niveles de ARNms <i>AtTRAF</i> y <i>AtZAT12</i> en líneas mutantes obtenidas ..	54
3.10. Obtención de genotipos sobreexpresantes de <i>AtTRAF</i> y <i>AtZAT12</i> en <i>A. thaliana</i> .....	54
3.10.1. Selección de transformantes y verificación del estado de homocigosis .....	55
3.10.2. Verificación de niveles de ARNms <i>AtTRAF</i> , <i>AtZAT12</i> y <i>PpZAT12</i> en las correspondientes líneas sobreexpresantes construidas .....	55
3.11. Caracterización fenotípica de genotipos mutantes y sobreexpresantes de <i>AtTRAF</i> , <i>AtZAT12</i> y <i>PpZAT12</i> .....	55
3.11.1. Evaluación de parámetros de crecimiento cualitativos en condiciones normales.....	55
3.11.1.1. Determinación de área de roseta de genotipos reativos a <i>AtZAT12</i> y <i>PpZAT12</i> .....	56
3.11.2. Ensayos de elongación de raíz primaria de genotipos relativos a <i>AtTRAF</i> en bajas temperaturas y presencia de ABA.....	56
3.11.2.1. Determinación de longitudes y velocidades de elongación radicular y análisis estadísticos.....	56
3.11.3. Ensayo de viabilidad de semillas de genotipos relativos a <i>AtTRAF</i> en bajas temperaturas.....	56
3.11.3.1. Análisis estadísticos .....	57
3.12. Evaluación de determinantes moleculares con expresión génica diferencial en genotipos relativos a <i>AtZAT12</i> y <i>PpZAT12</i> .....	57
3.12.1. Análisis de niveles de transcripto de genes del regulón de <i>AtZAT12</i> , en hojas de roseta adultas de los genotipos en estudio.....	57



3.12.2. Proteómica diferencial de hojas adultas de los genotipos en estudio .....	57
3.12.2.1. Extracción de proteínas solubles totales de hoja y preparación de muestras para LC-MS ..	58
3.12.2.2. Cuantificación de péptidos libre de marcado (LFQ, Label-Free Quantification) mediante Cromatografía líquida acoplada a Espectrometría de masa (LC-MS).....	58
3.12.2.3. Normalización y análisis estadísticos para la obtención de péptidos diferencialmente expresados.....	59
3.12.2.4. Análisis de enriquecimiento de términos GO, recopilación de anotaciones funcionales y contraste de los ZAT12_PEDs identificados con otras bases de datos ómicas .....	59
3.12.3. Delimitación del posible regulón de <i>PpZAT12</i> . Análisis de la información relativa a su expresión en frutos .....	60
<b>4. Caracterización in silico de determinantes moleculares con posible funcionalidad protectora frente al daño por frío en duraznos .....</b>	<b>62</b>
4.1. Introducción y objetivos .....	62
4.2. Objetivos específicos .....	62
4.3. Resultados y discusión.....	63
4.3.1. Construcción de una base de determinantes moleculares con respuesta al tratamiento térmico y posible funcionalidad protectora frente al daño por frío en duraznos .....	63
4.3.1.1. Conformación de grupos de genes de respuesta al tratamiento térmico .....	65
4.3.1.2. Recopilación y análisis de información funcional y de expresión génica relativas a los grupos de determinantes conformados.....	66
4.3.2. Caracterización <i>in silico</i> de secuencias regulatorias de grupos de determinantes conformados en base a la respuesta al tratamiento térmico.....	71
4.3.2.1. Análisis del contexto genómico de los determinantes de la base construida .....	71
4.3.2.2. Recopilación de factores de transcripción con expresión génica diferencial frente a TT y sus sitios de unión asociados.....	72
4.3.2.3. Estudios <i>in silico</i> de presencia y enriquecimiento de elementos <i>cis</i> en secuencias regulatorias de grupos de genes de respuesta al tratamiento térmico .....	73
4.3.2.4. Análisis de enriquecimiento de elementos <i>cis</i> en promotores de los grupos I e I2. Descripción de los factores de transcripción asociados.....	73
4.3.2.5. Análisis de enriquecimiento de elementos <i>cis</i> en promotores de los grupos R y R2. Descripción de los factores de transcripción asociados.....	79
4.4. Conclusiones .....	84
<b>5. PpTRAF y AtTRAF son nuevas ARN chaperonas con roles en respuestas frente a temperatura, incluida la protección frente al daño por frío en duraznos.....</b>	<b>86</b>
5.1. Introducción.....	86

5.1.1. ARN chaperonas .....	86
5.1.2. ARN chaperonas con funciones frente a estímulos ambientales .....	86
5.1.3. Presente capítulo .....	88
5.2. Objetivos específicos .....	88
5.3. Resultados y discusión .....	89
5.3.1. Caracterización bioinformática de los genes <i>PpTRAF</i> y <i>AtTRAF</i> .....	89
5.3.2. Estudios de los niveles de ARNm <i>PpTRAF</i> en <i>P. persica</i> mediante RT-qPCR.....	94
5.3.2.1. Análisis en hojas adultas, flores abiertas y frutos cosechados.....	94
5.3.2.2. Análisis en frutos expuestos a tratamiento térmico .....	95
5.3.2.3. Análisis en frutos de diversas variedades expuestos a refrigeración.....	96
5.3.3. Estudios de los niveles de ARNm <i>AtTRAF</i> en <i>A. thaliana Col-0</i> mediante RT-qPCR.....	97
5.3.3.1. Información de expresión génica disponible <i>in silico</i> para <i>AtTRAF</i> .....	97
5.3.3.2. Análisis en diferentes órganos .....	98
5.3.3.3. Análisis en hojas expuestas a estímulos de temperatura .....	99
5.3.4. Análisis <i>in silico</i> de la región del inicio transcripcional de los genes <i>PpTRAF</i> y <i>AtTRAF</i> ....	100
5.3.4.1. Comparación de secuencias promotoras y codificantes de <i>PpTRAF</i> provenientes de las variedades en estudio .....	103
5.3.5. Ensayos de complementación funcional de <i>PpTRAF</i> y <i>AtTRAF in vivo</i> en cepas de <i>E. coli</i> .....	103
5.3.5.1. <i>E. coli</i> como sistema <i>in vivo</i> y su aclimatación al frío .....	103
5.3.5.2. Ensayos de complementación en <i>E. coli</i> BX04, prueba de aclimatación a bajas temperaturas.....	104
5.3.5.3. Ensayos de antiterminación de la transcripción en <i>E. coli</i> RL211 .....	106
5.3.6. Determinación de la localización subcelular de los productos génicos <i>PpTRAF</i> y <i>AtTRAF</i> .....	109
5.3.7. Caracterización fenotípica de genotipos de <i>A. thaliana</i> relativos a <i>AtTRAF</i> , obtenidos en la presente tesis .....	112
5.3.7.1. Caracterización fenotípica de líneas mutantes y sobreexpresantes de <i>AtTRAF</i> cultivadas en condiciones normales.....	113
5.3.7.2. Ensayo de elongación de raíz primaria de líneas mutante y sobreexpresantes de <i>AtTRAF</i> en condiciones de bajas temperaturas .....	113
5.3.7.3. Ensayo de elongación de raíz primaria de <i>Col-0</i> y <i>KO-AtTRAF-4</i> en presencia de ABA.....	115
5.3.7.4. Ensayo de viabilidad de semillas de líneas mutantes y sobreexpresantes de <i>AtTRAF</i> en condiciones de bajas temperaturas .....	117

5.4. Conclusiones .....	119
<b>6. PpZAT12: un factor de transcripción involucrado en la protección frente al daño por frío en duraznos. Estudios comparativos con AtZAT12 de <i>A. thaliana</i> .....</b>	<b>122</b>
6.1. Introducción.....	122
6.1.1. Información reportada acerca de la caracterización del gen <i>AtZAT12</i> .....	122
6.1.2. Presente capítulo .....	124
6.2. Objetivos específicos .....	125
6.3. Resultados y discusión.....	126
6.3.1. Caracterización bioinformática de <i>PpZAT12</i> en comparación con su ortólogo <i>AtZAT12</i> .....	126
6.3.1.1. PpZAT12 como proteína ZFP de la familia C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> .....	127
6.3.1.2. Predicción de la estructura tridimensional de las proteínas ZAT12.....	131
6.3.2. Estudios de los niveles de ARNm <i>PpZAT12</i> en <i>P. persica</i> mediante RT-qPCR.....	132
6.3.2.1. Análisis en hojas adultas, flores abiertas y frutos cosechados.....	132
6.3.2.2. Análisis en frutos expuestos a tratamiento térmico .....	133
6.3.2.3. Análisis en frutos de diversas variedades expuestos a refrigeración.....	133
6.3.3. Estudios de los niveles de ARNm <i>AtZAT12</i> en <i>A. thaliana Col-0</i> mediante RT-qPCR.....	135
6.3.3.1. Análisis en diferentes órganos .....	135
6.3.3.2. Análisis en hojas expuestas a estímulos de temperatura .....	136
6.3.4. Análisis <i>in silico</i> de la región del inicio transcripcional de los genes <i>PpZAT12</i> y <i>AtZAT12</i> .....	137
6.3.4.1. Comparación de secuencias promotoras y codificantes de <i>PpZAT12</i> , provenientes de las variedades en estudio .....	140
6.3.5. Caracterización fenotípica de genotipos de <i>A. thaliana</i> relativos a <i>AtZAT12</i> y <i>PpZAT12</i> , obtenidos en la presente tesis .....	140
6.3.5.1. Caracterización fenotípica de líneas con pérdida de función de <i>AtZAT12</i> y ganancia de función de <i>AtZAT12</i> y <i>PpZAT12</i> , cultivadas en condiciones normales .....	141
6.3.6. Evaluación de determinantes moleculares con expresión génica diferencial en genotipos relativos a <i>AtZAT12</i> y <i>PpZAT12</i> .....	145
6.3.6.1. Análisis de niveles de transcripto de ARNms afectados en <i>35S::AtZAT12</i> .....	145
6.3.6.2. Proteómica diferencial de hojas adultas en floración de los genotipos en estudio.....	150
6.3.6.3. Recopilaciones y análisis de información funcional sobre los grupos de PEDs relativos a los genotipos de <i>ZAT12</i> .....	153

6.3.6.4. Delimitación del posible regulón de <i>PpZAT12</i> . Análisis de la información relativa a su expresión en frutos.....	160
6.4. Conclusiones .....	163
<b>7. Conclusiones generales.....</b>	<b>166</b>
<b>8. Referencias .....</b>	<b>169</b>
<b>9. Material suplementario .....</b>	<b>202</b>

*Resumen*

## Resumen

Los frutos de duraznero (*Prunus persica* L. Batsch) y de otras especies de la familia *Rosaceae* poseen gran importancia agronómica y nutricional. Debido a que su labilidad aumenta rápidamente a temperatura ambiente, el uso de bajas temperaturas (R) es una práctica indispensable para extender su vida comercial. Sin embargo, la fruta se ve afectada por problemas fisiológicos asociados a la refrigeración, conocidos bajo la denominación de daño por frío (CI, chilling injury) y evidenciados al momento del consumo. La aplicación de tratamientos térmicos (TT), entre otros procedimientos poscosecha, ha sido empleada como estrategia para prevenir los síntomas de este desorden, preservando calidad organoléptica y valor nutricional. Adicionalmente, la gran diversidad varietal y su investigación ofrecen importantes herramientas para enfrentar este tipo de problemas productivos. En la actualidad se desconocen en detalle los mecanismos moleculares asociados al daño por frío y a su protección; y, con el fin de identificar determinantes moleculares involucrados en ambos procesos, nuestro grupo ha empleado diversos enfoques ómicos. Transcriptomas, proteomas (total y de apoplasto), metabolomas y lipidoma se han identificado diferencialmente en frutos cv. Dixiland bajo tratamiento térmico y en frutos expuestos a refrigeración de variedades con contrastante susceptibilidad al CI. De esta manera, variadas moléculas se identificaron como putativas protectoras frente a estos desórdenes, siendo fundamental un análisis funcional de las mismas.

En la presente tesis, se decidió combinar conocimientos y métodos de biología molecular y bioinformática para identificar y validar determinantes implicados en la protección frente a CI, generando nuevas herramientas que faciliten la búsqueda de variedades de durazno que produzcan frutos con menor susceptibilidad a problemas poscosecha relacionados con dicho daño.

Una nueva base de genes de durazno fue creada a partir de las moléculas identificadas por nuestro grupo, con los datos de expresión obtenidos, anotaciones e información derivada de investigaciones con sus ortólogos en otras frutas. Los rasgos de secuencias regulatorias transcripcionales de estos genes de respuesta a TT y/o R fueron analizados en profundidad en cuanto a su contenido, enriquecimiento y arreglo de elementos *cis* mediante un software de diseño propio, con el fin de definir familias de factores de transcripción putativamente implicadas en los procesos bajo estudio. Elementos *cis* conocidos en otras especies vegetales, de respuesta a estímulos de temperatura (entre otros) fueron identificados conservados en grupos de promotores coregulados y subgrupos de genes de interés pudieron definirse, permitiendo

establecer nuevos actores e hipótesis para descifrar mecanismos subyacentes a las respuestas a temperatura durante la poscosecha.

Por otro lado, hemos progresado hacia la caracterización bioinformática y funcional de dos genes reguladores, posiblemente candidatos de la protección frente al daño por frío e identificados previamente. *PpZAT12* codifica para un factor de transcripción con dedos de zinc (ZF) de la familia C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, como el marcador de estrés sistémico *AtZAT12*, de la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. Los niveles del ARNm *PpZAT12* fueron verificados inducidos luego de TT y al aplicar refrigeración, particularmente en frutos de variedades resistentes al CI. Análisis *in silico* de las regiones regulatorias permitieron identificar elementos *cis* clave que condicen con la expresión génica observada, con su participación en múltiples estímulos y a su vez delinear reguladores upstream de ambos transcritos ortólogos, aunque adicionalmente se identificaron diferencias. Líneas transgénicas *35S::AtZAT12*, *35S::PpZAT12* y *35S::PpZAT12/KO-AtZAT12* de *A. thaliana* presentaron crecimiento y desarrollo retardados, rindiendo plantas de menor tamaño, con floración retrasada y otros rasgos fenotípicos interesantes como presencia de múltiples hojas de roseta curvadas. La regulación de posibles genes target de *AtZAT12* en *A. thaliana* fue confirmada en los genotipos mencionados, por parte de los ortólogos *ZAT12*. Adicionalmente, un enfoque proteómico fue aplicado para caracterizar péptidos de presencia diferencial en hojas de plantas en floración de los distintos genotipos e implicados en las diferencias fenotípicas observadas. Finalmente, se analizó y definió comparativamente un regulón putativo de ambas proteínas *ZAT12*. Estos resultados sugieren que el FT *PpZAT12* llevaría a cabo un rol protector frente al CI e incluso podría contribuir a los efectos benéficos del TT en duraznos, exhibiendo funcionalidad/es molecular/es similar/es a aquellas de su ortólogo *AtZAT12*, en *A. thaliana*.

El ARNm *PpTRAF*, que codifica para una proteína de función desconocida con ZFs tipo TRAF (Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor), pertenece a los transcritos diferencialmente inducidos en duraznos luego de TT. Se observaron niveles aumentados del mismo luego del almacenamiento refrigerado y se determinó su presencia en otros órganos de duraznero. La localización subcelular del producto génico *PpTRAF* fue determinada nuclear y citosólica mediante fusión traduccional al reportero fluorescente CFP y agrotransformación transitoria en hojas de *N. benthamiana* y estable en *A. thaliana*. Dos ensayos de complementación *in vivo* en cepas de *E. coli* particulares fueron utilizados para verificar su funcionalidad como ARN chaperona a bajas temperaturas y actividad de anti-terminación de la transcripción, destacando su posible participación en el metabolismo de ARN vegetal. A modo de profundizar estos estudios, el

ortólogo de *PpTRAF* en *A. thaliana*, *AtTRAF*, fue caracterizado comprobándose similitudes importantes en cuanto a su localización y funcionalidad como ARN chaperona, respecto a su ortólogo de duraznos. Genotipos con ganancia y pérdida de función de *AtTRAF* fueron obtenidos y fenotipados en relación a sus respuestas frente estímulos de temperatura y otros de interés. Se verificaron un comportamiento positivo en la velocidad de elongación de raíces y uno negativo en la germinación frente a bajas temperaturas para el genotipo mutante *KO-AtTRAF* respecto a *Col-0*, mientras que las líneas *35S::AtTRAF* respondieron de forma opuesta bajo las mismas condiciones. Adicionalmente, *KO-AtTRAF* demostró un comportamiento similar luego del estímulo por la fitohormona ABA. Estos resultados sugieren que *PpTRAF* y *AtTRAF* poseen una nueva arquitectura con rol ARN chaperona, sumando a la diversidad estructural y de mecanismos de acción de este grupo heterogéneo de proteínas. Los rasgos conservados entre estos ortólogos de *P. persica* y *A. thaliana*, sugieren la importancia de su participación en el metabolismo del ARN en diversas respuestas vegetales y de diferentes órganos a la temperatura, incluidas el daño por frío y su protección en frutos de durazno.

A modo de conclusión general, los resultados obtenidos en la presente tesis sugieren que procesos moleculares conservados pueden desarrollarse en respuesta a estímulos de temperatura en frutos de *P. persica* y diversos órganos de *A. thaliana*, permitiendo a las células aclimatarse y/o resistir en contra de desórdenes agronómicos indeseados como el daño por frío.



## Abstract

Harvested peaches (*Prunus persica* L. Batsch) and several *Rosaceae* fruits are agronomically and nutritionally important food products. As they deteriorate quickly at ambient temperature, refrigeration is needed to prevent the rapid fruit decay and to extend shelf life, allowing transportation and marketing. However, cold storage (CS) can generate chilling injury (CI), a group of physiological disorders which affects fruit quality. A particular symptom of CI disorder is called woolliness, and it is characterized by a lack of juiciness and a mealy texture. Many post-harvest approaches were developed to prevent CI, being heat treatment (HT) prior to CS a proven efficient strategy that does not compromise fruit organoleptical quality. Additionally, the natural diversity and its understanding offer important tools to face these agronomic problems. To address the molecular mechanisms associated to CI and find indicators of tolerance, our group has performed several omics approaches. The differential transcriptome, proteome, metabolome, lipidome and apoplast proteome were determined in HT-treated peaches as well as in CS fruits of cultivars with contrastant susceptibility to CI. Many types of molecules were identified as having putative positive roles against CI in peach, and their functional characterization is of interest.

With this background, we decided to combine bioinformatics and molecular biology approaches in order to identify and validate genes with protective features against CI, aiming to develop new tools to select cultivars with lower levels of CI-susceptibility.

A novel gene database was developed with peach genes previously identified in our lab, grouping expression data, functional annotations and ortholog-derived information in order to begin their characterization. The cistrome of these HT- or CS-responsive genes were deeply explored with an own design software regarding their occurrence, position and enrichment, to create clusters of genes with different requirements at their transcriptional initiation and define important families of transcription factors that could be implied at the molecular level. Several known *cis*-elements were found conserved in clusters of coregulated promoters and new clusters could be defined, suggesting new key players and leading to new hypothesis regarding the importance of certain TF families in the post-harvest temperature responses under study.

On the other hand, we started and progressed towards the bioinformatic and functional characterization of two candidates for CI-protective genes that could act as regulators of different mechanisms involved in gene expression. PpZAT12 is a C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> Zinc Finger (ZF) protein that could fulfill roles as transcription factor (TF), as the reported systemic stress marker AtZAT12 from *A.*

*thaliana*. RT-qPCRs showed that its mRNA levels were induced by HT and CS in peaches of CI-tolerant cultivars. Both *35S::AtZAT12* and *35S::PpZAT12/KO-AtZAT12* *A. thaliana* transgenic lines had impaired growth and development, rendering small plants (compared to *Col-0*) with flowering time delay and with other interesting phenotypic features as curved leaves. Several known targets of *AtZAT12* were confirmed as regulated by both orthologue proteins at the transcriptional level and a proteomic approach was applied to decipher the peptides that could be responsible of the observed phenotypes, sampling at flowering time. We also aimed to define PpZAT12 targets in peaches based on transcriptomic information from *AtZAT12*-overexpressing Arabidopsis plants which had augmented freezing tolerance. These results indicate that the TF PpZAT12 could have a protective role against CI and may also contribute to achieve HT effectiveness in *P. persica*, exhibiting similar molecular functionalities than *AtZAT12* in *A. thaliana* under cold stress.

*PpTRAF* mRNA, encoding a TRAF-type ZF protein with unknown function, belongs to the group of heat-treatment induced identified transcripts in peaches cv. Dixiland. Augmented transcript abundance was also verified in fruits of several cultivars after cold storage and its presence determined in other organs of peach tree. The subcellular localization of PpTRAF protein fused to a fluorescent reporter protein was determined in transient *N. benthamiana* and stable *A. thaliana* systems to be nuclear as well as cytosolic. Moreover, a molecular function as an RNA chaperone under low temperatures and against transcription anti-termination could be experimentally attributed to *PpTRAF* gene product through *in vivo* complementation assays in bacterial cells, suggesting its involvement in different processes of RNA metabolism. In order to deepen these studies, *PpTRAF* orthologue from *A. thaliana*, *AtTRAF*, was experimentally characterized verifying similar functional features and subcellular localization. Gain- and loss-function *AtTRAF* genotypes were obtained and phenotyped, regarding their ability to germinate and to elongate their roots under temperature shifts, as well as under other stimuli. These experiments showed that *AtTRAF* could have particular (positive or negative) roles in different thale cress physiological processes as root elongation and germination under temperature stimuli. Additionally, a similar response was observed for *KO-AtTRAF* when exposed to ABA. Overall, TRAFs belong to a novel class of RNA chaperones with a particular architecture and conserved molecular roles that could be related to temperature-driven responses, from peaches to thale cress.

In conclusion, the results obtained here suggest that conserved molecular processes could act under heat and cold stimuli in *P. persica* fruits and several organs of *A. thaliana*, allowing the plant cells to acclimate and to resist against undesired agronomic disorders, such as chilling injury.

**Abreviaturas**

2D-DIGE-MS/MS	Bidimensional Difference gel electrophoresis seguida de Tandem Mass Spectrometry. Proteómica
bs	Sitio de unión de factor de transcripción (del inglés, binding site)
ADNc	ADN codificante generado por retrotranscripción
CDS	ADNc sin regiones 5' y 3'UTR
CI	Daño por frío (del inglés, Chilling Injury)
d	D
Da (Dalton)	Unidad estándar de masa atómica o molecular
Differential Display (DD)	Técnica transcriptómica para detectar TEDs
EROs	Especies Reactivas del Oxígeno
FT	Factor de Transcripción
h	Horas
KO	Pérdida total de función génica (del inglés, Knock-Out)
LB	Luria-Bertani, medio de cultivo para bacterias
LC-MS	Liquid Chromatography seguida de Mass Spectrometry. Proteómica
MS	Murashige y Skoog, medio de cultivo para plantas
OE	Ganancia de función génica, sobreexpresante (del inglés overexpressing)
pb	Pares de bases de una secuencia nucleotídica
pl	Punto isoeléctrico
PED (en inglés, DEP)	Péptido de expresión diferencial
RT-qPCR	Retrotranscripción seguida de PCR en tiempo real. Transcriptómica
TED (en inglés, DET)	Transcripto de expresión diferencial
TT (HAT o HWT)	Tratamiento térmico por aire (HAT) o agua (HWT)
Western blotting	Técnica proteómica para inmunodetección de péptidos
UTR	Región no traducible del ARNm
Zn	Zinc, ión Zinc, Zn <sup>2+</sup>
ZF	Dedo de Zn (del inglés, Zn finger)

*Introducción general*



## 1. Introducción general

### 1.1. El duraznero, una especie de importancia agronómica

La familia *Rosaceae* posee más de 100 géneros y 3000 especies y es la tercera en importancia económica de regiones templadas (Shulaev y col., 2008). Esto se debe a que múltiples especies de la misma producen frutos con alta popularidad (manzana, pera, durazno, frutilla y cereza), atractivos por su sabor, aroma, color y valor alimenticio. Son importantes componentes de la dieta al ser fuente de minerales, vitaminas, fibras, fitoestrógenos y antioxidantes incluidos flavonoides, fenólicos y glucósidos (Giovannoni, 2004; Reig y col., 2013), con ventajas considerables para la salud (Macheix y col., 1991; Mazur y col., 2000).

El duraznero, *Prunus persica* L. Batsch, pertenece a la clase *Dicotiledóneas*, subclase *Dialipétalas*, serie *Calicifloras*, orden *Rosales*, familia *Rosáceas*, subfamilia *Prunoideas*, género *Prunus* (Monet, 1983). Es una especie originaria de China (Faust y Timon, 1995), perenne, arbórea y leñosa, basitona y de porte globoso, con dimensiones medias entre 4 y 6 metros (Fideghelli, 1987). Aunque puede vivir de 20 a 30 años, las plantas comerciales duran en promedio de 10 a 15 años, al disminuir su productividad. A partir del segundo a tercer año de vida, comienza la producción de frutos. Además, es una especie con muy buena adaptación a una amplia variedad de condiciones climáticas.

Según los datos estadísticos presentados por la FAOSTAT (del inglés, Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://www.fao.org/faostat/en/>), entre los principales productores de duraznos del mundo de los últimos diez años se encuentran China, en primer lugar ( $9,7 \times 10^6$  toneladas anuales), seguido de Italia ( $1,59 \times 10^6$  toneladas anuales), España ( $1,23 \times 10^6$  toneladas anuales) y Estados Unidos ( $1,21 \times 10^6$  toneladas anuales). Argentina se ubica en el undécimo lugar con una producción de  $0,29 \times 10^6$  toneladas anuales (aproximadamente 2 % de la producción mundial), siendo el principal país productor de duraznos y nectarinas del MERCOSUR.

Una ventaja de nuestro país es la riqueza varietal, potenciada debido a los diferentes climas a lo largo de su extensión en latitud. El área principal de producción se encuentra en Mendoza con un 88 % del total, seguida por Buenos Aires, Córdoba, Río Negro, Misiones, Neuquén, Corrientes y Salta (Valentini, 2012). Nuestro país es uno de los principales oferentes del Hemisferio Sur, lo que supone un gran potencial para exportar frutos a mercados del Hemisferio Norte que radica en la contraestación. También existe exportación de duraznos a Brasil, Bolivia y Paraguay. Sin embargo, Argentina carece de tradición exportadora de frutas y hortalizas frescas y

la escasa utilización de tecnologías de poscosecha para mantener la calidad de la fruta dificulta el acceso a mercados externos. En este contexto, el manejo poscosecha toma un rol fundamental, ya que resulta imprescindible para acceder a países distantes.

Más allá de ser una especie cultivada por aproximadamente 3000 años, sólo durante las últimas décadas se comenzaron programas de mejoramiento, destinados a satisfacer las necesidades de productores, distribuidores y las preferencias variables de los consumidores (Byrne y col., 2012). En la actualidad existen más de mil variedades comerciales, con frutos altamente variables en cuanto a sabores, perfumes, texturas y distinta relación dulzura/acidez. La extensa variabilidad de duraznos contrasta con su restringida diversidad genética, probablemente como consecuencia de la autocompatibilidad (The International Peach Genome, 2013).

### 1.2. El fruto de durazno: descripción botánica

El durazno es una **drupa**: simple, indehisciente, con mesocarpio carnoso y endocarpio leñoso, generalmente uniseminado. El peso de estos frutos puede variar desde 80 gramos hasta 680 gramos, sin embargo los estándares comerciales son desde 180 gramos hasta 230 gramos (Bassi y Monet, 2008). En cuanto a su morfología interna, de afuera hacia adentro se distinguen tres regiones: **epicarpio, mesocarpio y endocarpio** (fig. 1.1) (Budde, 2008). El epicarpio deriva de la epidermis inferior de la hoja carpelar y puede ser pubescente o glabro (denominándose durazno o nectarina, respectivamente; Fideghelli, 1987). El mesocarpio deriva del mesófilo carpelar, es la parte carnosa o pulpa del fruto y se compone de parénquima. Si bien es muy rígido y resistente a la presión en etapas de inmadurez, durante la maduración organoléptica va disminuyendo en firmeza y adquiriendo las cualidades que lo hacen comestible. Finalmente, la parte más interna es el endocarpio o carozo, derivado de la epidermis superior de la hoja carpelar y de consistencia leñosa o lignificada para proteger a la semilla en su interior (Kader y Mitchell, 1989).



**Figura 1.1 Apariencia externa e interna (corte longitudinal) de un fruto de *P. persica*.** Se indican sus regiones de afuera hacia adentro: epicarpio, mesocarpio y endocarpio.

La gran diversidad varietal provee frutos de formas redondeadas o elongadas con un surco longitudinal más o menos marcado (fig. 1.2). Se encuentran diversos colores de epicarpio (verde o

amarillo con tonos más rojizos) y de pulpa (desde blanco hasta rojo oscuro, pasando por amarillo y con diferentes tonalidades). La expresión del color rojo de la piel es compleja y depende de la exposición a la luz, el clima, la posición de la fruta en la copa y la poda (Lewallen y Marini, 2003). Por otro lado, el epicarpio también presenta variaciones en sus vellosidades y diversas texturas pueden observarse en la pulpa. Finalmente, se distinguen diferentes grados de adherencia del mesocarpio al carozo, denominándose priscos cuando los anteriores están separados.



Figura 1.2 Diversidad natural de frutos de duraznero (tomado de Monti, 2016).

### 1.2.1. Desarrollo y maduración

El desarrollo del fruto implica la transformación del ovario fertilizado en un órgano frutal con características únicas, especiales para posibilitar su propósito evolutivo: proteger a la semilla que contienen y facilitar su dispersión. La fructificación es un proceso complejo, de múltiples etapas e involucra el crecimiento del fruto como resultado de la acción conjunta de división y elongación celular, la lignificación del endocarpio y la acumulación de diversas sustancias que le permiten cumplir su rol biológico (Budde, 2008; Dardick y col., 2010; Lombardo y col., 2011; Botton y col., 2016).

La maduración es un proceso fisiológico específico del fruto como órgano vegetal, mediante el cual éste sufre cambios físicos y químicos que lo transforman hasta adquirir las cualidades organolépticas de firmeza, color, sabor y aroma, que lo hacen apto y atractivo para su consumo. Para los frutos carnosos como el durazno, la característica distintiva es la adquisición de pulpa comestible que atrae animales consumidores y posibilita la dispersión de las semillas (Monselise, 1986).

En los años recientes, variados esfuerzos se realizaron para caracterizar los mecanismos regulatorios subyacentes a los cambios hormonales, metabolómicos, transcriptómicos y proteómicos que suceden durante el desarrollo y la maduración de frutos carnosos de la familia *Rosaceae* (Bonghi y col., 2011; Lombardo y col., 2011). Sin embargo, actualmente continúa siendo necesario profundizar el conocimiento acerca de sus particulares bases genéticas y epigenéticas (Karlova y col., 2014; Farinati y col., 2017).

### 1.2.1.1. Maduración fisiológica y organoléptica

En fisiología de poscosecha, se definen **maduración fisiológica** (maturity en inglés) y **maduración organoléptica** (ripening en inglés) como dos etapas diferentes que componen el proceso de maduración general del fruto. Inicialmente, sucede la maduración fisiológica en el árbol y la misma culmina con una disminución de la velocidad de crecimiento, determinándose el cese de la expansión celular y de la acumulación de materia seca (Zucconi, 1986). El fruto con madurez fisiológica adquirió su tamaño máximo y podrá continuar su ontogenia aún separado de la planta en la cosecha (Watada y col., 1984; Budde, 2008). Seguidamente, el fruto sufre la maduración organoléptica, que se evidencia por una sucesión de cambios en composición, textura, color, sabor y aroma de los frutos (Watada y col., 1984; Li y col., 2010). La fruta que alcanzó la madurez organoléptica posee todas las cualidades que la hacen apta y atractiva para el consumo (Zucconi, 1986; Budde, 2008).

### 1.2.1.2. Cambios asociados a la maduración organoléptica

El durazno es un fruto climatérico y como tal, presenta un pico respiratorio y la **producción autocatalítica de etileno** (Et), fitohormona que permite su maduración aún separado de la planta (Pech y col., 1994; Kader y col., 2002; Li y col., 2010). Se ha demostrado que el inicio de la maduración organoléptica está asociado no sólo con un aumento en la biosíntesis de Et y la activación de sus vías de señalización (a nivel de expresión génica y funcionalidad molecular), sino además con el incremento en la sensibilidad del tejido frutal a esta hormona (Wills y col., 1998; Budde y col., 2006; Li y col., 2010). Adicionalmente, el Et participa en la respuesta al estrés, siendo fundamental en la vida poscosecha de los frutos (Giovannoni, 2004).

A pesar de que esta especie ha evolucionado a la abscisión natural, la interrupción del suministro de agua y nutrientes hacia los frutos cuando se desprenden del árbol, los deja dependientes de sus propias reservas (Yamaki y col., 1995). Un **aumento en la tasa respiratoria** y la degradación de sustancias orgánicas (principalmente azúcares y ácidos orgánicos) son comunes en duraznos en maduración debido a que provee de energía a las células frutales (Kader y Mitchell, 1989; Tucker, 1993; Wu y col., 2003). Por otro lado, la tasa respiratoria puede verse afectada por estímulos de temperatura (Machuca y col., 2010).

Durante la maduración organoléptica se producen numerosos procesos en simultáneo, tanto de degradación como de síntesis y acumulación (Wills y col. 1998). Además de la oxidación de compuestos y la producción de O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O propias de la respiración y de los procesos relativos al rol del Et, se destacan: la degradación de clorofilas (Cunha y col., 2007), de diversas sustancias



complejas generando metabolitos importantes para el desarrollo del sabor (Tucker, 1993; Borsani y col., 2009; Lombardo y col., 2011; Monti y col., 2016), de componentes de la pared celular (PC) así como la solubilización de sus materiales que conllevan al **ablandamiento característico** (Li y col., 2010) y la disminución de la acidez total titulable (Altube y col., 2001); asimismo, la acumulación de pigmentos carotenoides, xantofilas y antocianinas que hacen al color de las regiones de la fruta (Tsuda, 2008), producción de compuestos volátiles como furanos, lactonas, monoterpenos, hexanal y acetato de etilo que proporcionan el aroma (Xi y col., 2011; Brandi y col., 2011; Maulén y col., 2012), entre otros.

El ablandamiento de la pulpa durante la maduración consiste en alteraciones texturales que afectan a los factores que mantienen firmeza del fruto: paredes celulares, tamaño y forma celulares y grado de adhesión intercelular dependiente de la laminilla media (Toivonen y Brummell, 2008). Factores enzimáticos y no enzimáticos contribuyen a la caída de la firmeza. Entre los primeros se incluyen aquellos encargados de la **degradación de la pared celular**, ampliamente estudiados en numerosas frutas. De-esterificación y depolimerización de celulosas, galactanos, hemicelulosas y pectinas, seguidas de la solubilización de sus residuos fueron extensivamente descritas (Brummell, 2006), así como la participación de enzimas pectinmetilesterasas (PME), poligalacturonasas (PG),  $\beta$ -galactosidasas, endo- y exo-glucanasas (EG), xiloglucano-endotransglucosilasas (XET), xilosidasas (Xyl), pectato liasas (PL), entre otras (Li y col., 2010). Las expansinas (Exp) son factores no enzimáticos con efectos directos sobre la estructura de la PC y las depolimerizaciones mencionadas, posiblemente facilitando/impidiendo el acceso de las enzimas mencionadas (Brummell y Harpster, 2001).

Finalmente, es interesante destacar que se puede observar diferente orden temporal de los eventos subyacentes al ablandamiento en variedades distintas (Brummell, 2006) y que la amplia diversidad varietal se ve reflejada en el contenido de metabolitos en un preciso estadio así como también en la evolución de la maduración organoléptica (Monti y col., 2016).

### 1.3. Poscosecha en duraznos

Como se ha mencionado, el climaterio permite extender la vida comercial de los duraznos el máximo de d posible: se cosechan con madurez fisiológica y luego continúan su ontogenia hasta la madurez de consumo durante su manipulación poscosecha (almacenamiento, transporte y comercialización). Sumado a los procesos biológicos internos variedad-dependientes, factores externos, incluidas las condiciones ambientales y las prácticas relativas a cultivo, cosecha y poscosecha, determinan la vida de estantería y la calidad organoléptica de la fruta. Las últimas

están profundamente influidas por las características del **sistema de producción frutihortícola**, en el que intervienen productores, distribuidores y consumidores con necesidades diferentes según la región y la tecnología disponible para enfrentar los problemas de cada etapa productiva.

Debido al rápido aumento de la labilidad de los duraznos cuando son almacenados a temperatura ambiente, la **tecnología de poscosecha** se vale de métodos que permitan retrasar la maduración y evitar su deterioro, garantizando su llegada al consumidor y manteniendo su calidad organoléptica y valor nutricional (Budde, 2008; Pavez y col., 2013). La **refrigeración** es la principal herramienta utilizada para estos fines durante almacenaje, transporte y comercialización. Los frutos se incuban en cámaras a 0 °C y con 85 a 90 % de humedad relativa, logrando mantener una buena calidad y valor nutritivo desde 2 a 4 semanas. Las bajas temperaturas retardan la maduración, reduciendo actividades metabólicas como respiración y consumo de reservas (de la fruta y de posibles patógenos), y pérdida de agua por transpiración (Lurie y Crisosto, 2005).

### 1.3.1. Daño por frío

Dependiendo de la temperatura y duración del almacenamiento refrigerado, así como también de las condiciones precosecha, algunas variedades de duraznero se ven afectadas más que otras por una serie de desórdenes fisiológicos genéricamente englobados en la denominación de **daño por frío (chilling injury, CI)**. Estas afecciones, que constituyen uno de los principales limitantes de la vida comercial de los duraznos, comprometen su calidad como alimento y agravando la problemática, se desarrollan durante la maduración post-refrigeración, son evidenciables al momento del consumo y difícilmente predecibles (Lurie y Crisosto, 2005).

#### 1.3.1.1. Harinosidad

La harinosidad es un trastorno textural de la fruta que se manifiesta principalmente como una pérdida de la jugosidad que deja a la pulpa pastosa y seca y sin resistencia al penetómetro (instrumento para medir firmeza) (fig. 1.3). No es posible detectarla en los frutos desde el exterior sin abrirlos y, al hacerlo, la falta de jugosidad produce una importante pérdida en el sabor, generando insatisfacción en el consumidor (Brummell y col., 2004).



**Figura 1.3 Harinosidad en duraznos** (INTA-Alto Valle, Revista: Rompecabezas Tecnológico N° 42).

La mayoría de los reportes sobre las bases moleculares de la harinosidad la proponen debida a una maduración organoléptica alterada siendo la misma posterior a la refrigeración (Gonzalez-Agüero y col., 2008; Pavez y col., 2013). Se propuso un desbalance en el metabolismo de pared celular (Gonzalez-Agüero y col., 2008; Tanou y col., 2017) que genera aumento de pectinas no depolimerizadas, contribuyendo a formar geles junto a iones  $\text{Ca}^{2+}$ , por unión de agua libre (Dawson y col., 1992, Lurie y Crisosto., 2005). La pérdida de jugo en frutos harinosos se debería a la retención de agua, no a deshidratación (Brummell y col., 2004, Fruk y col., 2014).

Adicionalmente, se reportaron aumentos en la expresión de enzimas de respuesta a estrés oxidativo y cambios en el estado redox celular, así como disminuciones en la expresión y actividad de genes involucrados en la producción de energía, biosíntesis de Et y defensa, que justifican la maduración alterada de la fruta (Pavez y col., 2013; Tanou y col., 2017). Pons y col. (2014), proponen un diferente programa de respuesta al frío por parte de la fruta sensible, participación menos efectiva de regulones conocidos (ICE1, CBF, HOS9) y positiva de genes involucrados en la respuesta a deshidratación/estrés osmótico, ABA, Et y auxinas. Cabe la posibilidad de que estos estudios no sean suficientes para pensar una visión global de la base molecular de la harinosidad, sí una recopilación de mecanismos que se ponen en juego en esos varietales en particular.

#### 1.3.1.2. Pardeamiento interno

El pardeamiento interno de los frutos de durazno, en primera instancia, se observa como leves puntuaciones marrones en la pulpa. Con el tiempo, los tejidos dañados se tornan más marrones y pueden comprometer la totalidad de la pulpa (fig. 1.4). El incremento en la permeabilidad de las membranas debido a las bajas temperaturas, permite que la enzima plastídica polifenol oxidasa (PPO) entre en contacto con sus sustratos (compuestos fenólicos presentes en las vacuolas) y catalice su oxidación en presencia de oxígeno (Kader y Chordas, 1984; Zawistowski y col., 1991). Lin y col. (2016) sugieren que las peroxidases (POD) y lipooxigenasas (LOX), que afectan la permeabilidad de las membranas, también contribuirían al desarrollo del pardeamiento. Wang y col. (2017) reportaron niveles aumentados de transcriptos *PPO* y la movilización de ARNms *PODs* y *LOXs* frente a las bajas temperaturas.



Figura 1.4 Pardeamiento interno en duraznos (INTA-Alto Valle, Revista: Rompecabezas Tecnológico N° 42).

### 1.3.1.3. Enrojecimiento interno

Un desorden fisiológico muy frecuente en la pulpa del durazno, alrededor del carozo, es el enrojecimiento interno. Puede presentarse como líneas que se extienden desde el endocarpio o en toda el área central. Si bien no afecta al sabor de los frutos, es causa de rechazo por razones de apariencia (fig. 1.5). Algunas variedades presentan una coloración excesiva en condiciones de almacenamiento a bajas temperaturas, mientras que otras alcanzan tonos rosados solamente (Lurie y Crisosto, 2005). Tanou y col. (2017) proponen un aumento de antocianinas y la inducción de una leucoantocianidina-dioxigenasa (enzima clave en su vía de síntesis) como un mecanismo causal del pardeamiento y/o del enrojecimiento.



Figura 1.5 Enrojecimiento en pulpa y harinosidad en duraznos (INTA-AltoV Revista: Rompecabezas Tecnológico N° 42).

### 1.3.2. Estrategias preventivas del daño por frío

En pos de reducir las pérdidas económicas que supone el daño por frío, han surgido numerosas estrategias, previas o simultáneas a la refrigeración, exitosas en la protección de la fruta frente al CI. Entre ellas se pueden mencionar: selección de genotipos apropiados, manejo nutricional e hídrico de los cultivos, elección correcta de la época de cosecha y la aplicación de distintos tratamientos, previos o durante el almacenamiento (Lurie y Crisosto, 2005). Se han utilizado con éxito almacenamientos en atmósferas controladas, acondicionamientos y tratamientos térmicos y agregados de/sumersión en diferentes compuestos químicos (Lurie y Crisosto, 2005; Budde y col., 2002, 2006; Wang y col., 2006; Lara y col., 2009, 2011; Tanou y col., 2017; Wang y col., 2017). En particular, se ha demostrado que el **tratamiento térmico** previo a la refrigeración es capaz de contrarrestar al daño por frío en frutos de variadas especies vegetales, preservando la apariencia y las propiedades nutricionales (Lurie, 1998; Budde y col., 2002, 2006; Polenta y col., 2007; Pedreschi y Lurie, 2015). A pesar de que este tratamiento retrasa la maduración y disminuye la producción de Et, la misma se recupera al volver a temperatura ambiente, con pequeños cambios en los procesos bioquímicos y adquisición de rasgos positivos como aumento en el contenido de fructosa (Lara y col., 2009).

#### 1.4. Investigación en poscosecha y antecedentes de nuestro grupo

Con el fin de lograr una solución de mayor alcance al problema del daño por frío en los órganos frutales, es de especial interés entender sus bases genéticas y bioquímicas, y de los tratamientos que lo contrarrestan. Un problema radica en separar las respuestas de protección de aquellas relativas al daño, al momento de identificar los actores moleculares involucrados. Se han aplicado técnicas ómicas luego del almacenaje refrigerado en variedades o subpoblaciones con diferente tolerancia al CI (Ogundiwin y col., 2008; Vizoso y col., 2009; Pons y col., 2014), en condiciones inductoras de CI (Zhang y col., 2010; Pons y col., 2015) y luego de aplicar estrategias preventivas (Pedreschi y Lurie, 2015; Wang y col., 2017; Tanou y col., 2017), entre otros.

Nuestro grupo ha realizado relevantes aportes en cuanto a los procesos de desarrollo, maduración y protección frente al daño por frío en duraznos. Tomando la variedad Dixiland como modelo, se analizaron las redes metabólicas en el mesocarpio del fruto durante el desarrollo (Lombardo y col., 2011) y los complejos procesos bioquímicos y proteómicos durante la maduración organoléptica (Borsani y col., 2009; Monti y col., 2016). Por otro lado, se evaluaron las modificaciones bioquímicas y proteómicas (Lara y col., 2009), transcriptómicas (Lauxmann y col., 2012), metabolómicas (Lauxmann y col., 2014) y de la matriz extracelular (Bustamante y col., 2012), luego de aplicar tratamiento térmico (3 d a 39 °C) a frutos de durazno cv. Dixiland. Posteriormente, se identificaron variedades comerciales con susceptibilidad contrastante frente al CI, que se analizaron en su respuesta al frío prolongado y maduración post-refrigeración a nivel metabólico (Bustamante y col., 2016), lipidómico (Bustamante y col., 2017) y en cuanto al metabolismo de pared celular (Genero y col., 2016). De esta manera, lograron identificarse numerosas moléculas de diversas cualidades químicas, posiblemente implicadas en la protección frente al CI en duraznos, siendo fundamental su caracterización funcional para profundizar en el conocimiento de sus beneficios moleculares.

##### 1.4.1. Genoma de duraznero, su investigación en la actualidad

Dentro del género *Prunus*, *P. persica* presenta diversas ventajas fisiológicas y moleculares, incluyendo autocompatibilidad y diploidía, fase juvenil corta, proximidad taxonómica a otras especies importantes y genoma secuenciado (doble haploide Lovell) y de tamaño pequeño (265 Mb), convirtiendo a esta especie en adecuado modelo del género e incluso de la familia (Shulaev y col., 2008; Arús y col., 2012; The International Peach Genome, 2013; Verde y col., 2017).

Se han descrito y mapeado genes relacionados a la producción, la respuesta a estrés y la calidad del fruto, revelando que muchas características morfológicas y de calidad tienen una base

genética simple (Horn y col., 2005). Como se ha visto en otras especies de dicotiledóneas, un 5,5 % de los cerca de 27000 genes anotados en el genoma codifica para factores de transcripción (Bianchi y col., 2015). Estudios transcriptómicos se realizaron en diferentes especies de *Prunus* y principalmente en duraznero, incluyendo desde EST profilings a microarreglos y a los recientemente utilizados enfoques de RNA-Seq (Wang y col., 2013; Rubio y col., 2015; Wang y col., 2017). Las investigaciones se centran en genes relacionados a rasgos agronómicos de interés incluyendo: control del tiempo de floración, dormancia, desarrollo y maduración del fruto, requerimientos de frío, diversidad y aclimatación varietal. La disponibilidad de genomas secuenciados ofrece nuevas oportunidades para estudios funcionales y su ulterior aplicación a programas de mejoramiento (Bianchi y col., 2015).

Actualmente, se ha observado un aumento en la utilización de tecnologías moleculares en la investigación en la familia *Rosaceae*, generándose un gran volumen, aunque justificado, de datos de información genómica (secuencias, anotaciones, QTLs, SNPs -PeachVar-DB, Cirilli y col., 2017), transcriptómica, proteómica y metabolómica, para asistir y agilizar a programas de mejoramiento. Importantes proyectos de investigación internacionales se han enfocado en el desarrollo de nuevas herramientas para dilucidar las bases genéticas de los rasgos importantes de calidad de los frutos, incluyendo RosBREED y FruitBreedomics (Iezzoni y col., 2010, Laurens y col., 2012), que comienzan a sumar validez a la opinión de los consumidores.

#### **1.4.2. Presente tesis de doctorado**

En este contexto, se enmarca el presente trabajo de tesis que pretende, mediante diversas técnicas de biología molecular y bioinformática, profundizar en el conocimiento de mecanismos moleculares subyacentes a la protección frente al CI en duraznos, generando nuevas herramientas que faciliten la búsqueda de variedades de durazno menos susceptibles a las bajas temperaturas.

En primer lugar, resultó de interés nuclear la información obtenida por nuestro grupo, en una base de determinantes identificados, facilitando su disponibilidad a futuro para la selección de factores que intervienen en vida de estantería, maduración organoléptica, respuesta a refrigeración, CI y tratamientos preventivos y su contraste con otras investigaciones en duraznos y otras frutas. Los mismos fueron clasificados en cuanto a su expresión génica y, por último, se procedió a la caracterización de los requisitos moleculares necesarios para su inicio transcripcional (utilizando un software de diseño propio), determinando nuevos clusters de genes con elementos *cis* en común y familias de factores de transcripción con posibles roles en la protección frente al CI.

Por otra parte, se progresó hacia la caracterización funcional de dos factores codificantes

de proteínas con ZFs; con funciones regulatorias en diferentes niveles de la expresión génica y posible rol protector frente al Cl. Ambos se identificaron previamente como inducidos frente a tratamiento térmico (Lauxmann y col., 2012) y fueron seleccionados en base a bibliografía o por sus anotaciones funcionales. *PpZAT12* es un factor de transcripción C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> ortólogo del marcador de estrés sistémico *AtZAT12* de *A. thaliana*, que posee un regulón de genes para la tolerancia estrés oxidativo y al frío. *PpTRAF* es una proteína de función desconocida, con ZFs tipo TRAF en tándem.

*Objetivos*



## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

Caracterizar funcionalmente factores implicados en la protección frente al daño por frío en frutos de durazno.

### 2.2. Objetivos específicos

Construir una base de determinantes moleculares con posible funcionalidad protectora frente al daño por frío y realizar su caracterización *in silico* para iniciar su validación funcional.

Analizar los niveles transcripcionales de los determinantes génicos seleccionados en distintos tejidos de *P. persica*, y durante la maduración organoléptica, la refrigeración y el tratamiento térmico de duraznos con sensibilidad al frío contrastante.

Realizar ensayos *in vivo* en sistemas heterólogos, que contribuyan a dilucidar la funcionalidad molecular y el rol frente a estímulos de temperatura de los factores bajo estudio.

*Materiales y métodos*

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Caracterización *in silico* de determinantes moleculares implicados en la protección frente al daño por frío en duraznos

##### 3.1.1. Construcción de una base de determinantes implicados en la respuesta a tratamiento térmico en duraznos

Los artículos de Lara y col. (2009), Lauxmann y col. (2012 y 2014), Bustamante y col. (2012) y Genero y col. (2016) así como la tesina de Gismondi (2013) aplicaron diversas técnicas ómicas que reportan la identificación y el análisis de expresión génica de variados determinantes posiblemente implicados en la protección frente al CI en duraznos. Los mismos utilizan enfoques basados en tratamiento térmico como estrategia preventiva del CI (en su mayoría) así como de la respuesta a refrigeración de variedades con diferente sensibilidad a estos trastornos. Debido a la caracterización deseada, a nivel génico, se desconsideraron metabolitos y actividades enzimáticas, para trabajar a partir de transcritos y péptidos identificados. La tabla 3.1 describe artículos incluidos, variedades de trabajo y tipo de determinantes identificados en cada uno de ellos.

**Tabla 3.1 Artículos seleccionados para construir la base de determinantes moleculares**

Referencia	Moléculas y Métodos	Variedad(es)	Principales descubrimientos
Lara y col., 2009	Transcriptos (RT-qPCR) Péptidos (Western blot, 2D-DIGE-MS/MS) Metabolitos y Actividades enzimáticas	DX	Aumento de proteínas de estrés/defensa y disminución de PPO luego de TT
Lauxmann y col., 2012	Transcriptos (Differential Display y RT-qPCR)	DX	127 transcritos diferencialmente expresados (47 % inducidos y 36 % reprimidos) luego de TT
Bustamante y col., 2012	Transcriptos (RT-qPCR) Péptidos (Western blot, 2D-DIGE-MS/MS)	DX	Disminución de transcritos de enzimas de pared celular y de PpDUF642 luego de TT
Gismondi, 2013	Transcriptos (RT-qPCR)	SL y FD	Transcriptos diferencialmente expresados en variedades con susceptibilidad a CI contrastante
Lauxmann y col., 2014	Transcriptos (RT-qPCR) Metabolitos y Actividades enzimáticas	DX	Aumento de azúcares y azúcares-alcoholes y modificación de aminoácidos precursores de fenilpropanoides luego de TT
Genero y col., 2016	Transcriptos (RT-qPCR) Péptidos (Western blot)	EL, R2 y FD	Transcripto <i>PpXyl</i> correlaciona negativamente con harinosidad y otros ARNms de enzimas de pared celular se movilizan por R

R, refrigeración; TT, tratamiento térmico; CI, daño por frío; EL y SL, variedades menos y R2, FD y DX, más sensibles al CI

Es destacable que otros grupos han abordado este enfoque para frutos de durazno, aunque son pocos y no han reportado resultados masivos (de todas formas, su información fue considerada en etapas siguientes).

### 3.1.1.1. Asignación de determinantes a genes de duraznero

Para llevar a cabo la asignación de los determinantes, a partir de los identificadores o secuencias provistos por las publicaciones correspondientes o servidores ([http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/ChillPeachDB/est\\_summary.php?brief=1](http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/ChillPeachDB/est_summary.php?brief=1)), se procedió con diferentes métodos como se indica en la tabla 3.2, dependiendo de su naturaleza molecular. Fueron denominados TEDs o PEDs por ser transcritos o péptidos con expresión génica diferencial bajo las condiciones estudiadas. Siempre fue necesario recurrir a la versión actual del genoma de duraznero (Verde y col., 2017), actualmente disponible en los sitios web GDR (Genome Database of Rosaceae, <http://www.rosaceae.org/>; Jung y col., 2014) y Phytozome v12.1.5 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>; Goodstein y col., 2012). Las bases de datos de trabajo fueron obtenidas a través de la plataforma Biomart (accesible desde Phytozome) y formateadas para su uso mediante el comando `makeblastdb` (Tao, 2010). Se utilizó el algoritmo `blast` de NCBI y el mismo se ejecutó de manera autónoma desde la consola Linux (Tao, 2010).

**Tabla 3.2 Estrategias utilizadas para la asignación de códigos de acceso**

Molécula	Método/s experimental/es	Estrategia de asignación a identificadores génico/s
Fragmentos de ADNc, TEDs	Differential Display RT-qPCR	<i>blastn</i> vs. bases de datos de ADNcs, CDSs, UTRs y genes <i>blastx</i> vs. bases de datos de péptidos
Péptidos, PEDs	2D-DIGE-MS/MS	<i>blastp</i> contra bases de datos de péptidos Verificación de PMs y pls teóricos y experimentales

ADNc, ADN codificante con UTRs; CDS, ADN codificante sin UTRs; UTR, región no traducida; TED, transcripto de expresión diferencial; PED, péptido de expresión diferencial

La calidad de los alineamientos obtenidos fue determinante a la hora de la asignación, teniendo en cuenta los parámetros valor E, cobertura e identidad. Cuando fue posible, se determinó la variante transcripcional particular a la que el TED o PED alinea. Una minoría de los determinantes no se asignó por problemas ya sea en la calidad de sus secuencias y/o por tratarse de genes no anotados en el genoma de duraznero. Seguidamente, se mencionarán casos posibles durante la asignación realizada. Un fragmento de ADNc secuenciado puede pertenecer a una y solo una de las variantes transcripcionales de un gen y esto detectarse mediante el `blastn`, o puede que la secuencia identificada sea común a ellas y que la estrategia no permita la asignación específica. Otro caso es aquel en que el péptido identificado mediante 2D-DIGE-MS/MS pertenezca a un spot del gel 2D con ciertos pl y PM que asistan al `blastp` para identificar una

variante por sobre otra. Por último, se completó la base de determinantes asignados con anotaciones funcionales y otros rasgos genómicos, mediante Biomart (Phytozome).

### **3.1.1.2. Recopilación de anotaciones, reportes y datos de expresión en otras frutas y *A. thaliana***

En la publicación de Gismondi y col. (enviado), se desarrollaron nuevas y extensas bases de genes con expresión reportada en frutos de otras especies y sus ortólogos en duraznero; simplemente detectados y/o con expresión finamente analizada en las etapas de desarrollo, vida de estantería, maduración organoléptica (DB1), refrigeración (DB2), condiciones generadoras de trastornos relativos al CI (DB3), tratamientos térmicos y acondicionamientos (DB4). Las mismas fueron consultadas con la base creada como input, de manera de contrastar la información obtenida en nuestro laboratorio con lo reportado para otras frutas y en los estímulos pre y poscosecha mencionados. Mencionamos Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>, Oliveros (2007-2015)) la herramienta para asistir este y otros objetivos de la presente tesis.

Por otro lado, se obtuvieron ortólogos en la especie *A. thaliana*. Estos accesos permitieron obtener anotaciones más curadas (respecto a aquellas de *P. persica*, en sus versiones genómicas tempranas) acerca de los procesos biológicos que ocupan los ortólogos de *A. thaliana* de los genes de nuestra base. Para ello se obtuvieron: términos GO y se evaluó su enriquecimiento (SEA, Singular Enrichment Analysis) en AgriGO (<http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/>; Tian y col., 2017), anotaciones de vías de MapMan (Thimm y col., 2004), datos de expresión de ExPath 2.0 (<http://expath.itps.ncku.edu.tw/>; Chien y col., 2015) y ColdArrayDB (<http://cold.stanford.edu/cgi-bin/data.cgi>; Vogel y col., 2005) y pertenencia a regulones (Boyce y col., 2003; Pons y col., 2014).

### **3.1.1.3. Conformación de grupos de genes posiblemente coregulados y obtención de sus secuencias regulatorias upstream**

La expresión génica evaluada por los diferentes artículos fue considerada en detalle para armar grupos de determinantes con tendencias comunes frente a los estímulos poscosecha impuestos a la fruta. Nos concentramos en las comparaciones de muestras de duración equivalente: TT vs C3, ambos con 3 d de duración. Debido a la falta de datos más finos en cuanto a la expresión temporal, la posibilidad de que efectivamente sean grupos de genes coregulados se cree disminuida. Sin embargo, consideramos importante su caracterización *in silico* ya que la misma es base de futuros trabajos.

Conformados los grupos y con el fin de realizar los estudios propuestos, se obtuvieron las regiones regulatorias upstream de los genes de duraznero de interés (Biomart, Phytozome). Se

definió tomar secuencias de 500 pb upstream a partir del codón de inicio traduccional (incluido 5' UTR) para caracterizar exhaustivamente la región de inicio transcripcional.

Para evaluar el enriquecimiento de los elementos *cis* en los grupos formados, se descargaron las secuencias regulatorias de 500 pb de sets de genes controles para cada grupo (equivalentes en cantidad pero con genes tomados al azar, no coregulados) y del set completo de genes (26869 transcritos primarios) del genoma de *P. persica*. El último permitirá comparar el enriquecimiento de cada motivo encontrado con su ocurrencia en el genoma, mientras que los sets particulares construidos al azar actuarán como controles de que el enriquecimiento solo se deba a la relación biológica que existiría entre estos promotores posiblemente coregulados.

#### **3.1.1.4. Obtención y análisis de los factores de transcripción incluidos en la base de determinantes creada y de sus sitios de unión asociados**

La presencia de determinantes con funcionalidad de factor de transcripción (FT) propone la búsqueda directa de los sitios de unión asociados, aunque estos sean predichos, en los promotores de los grupos conformados. Esto es debido a que la presencia de esos FTs directamente señala su posible funcionalidad en la respuesta al tratamiento térmico. Nos valimos de las bases de datos PlantPAN (<http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw/TFsearch.php>) y PlantTFDB ([http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/help\\_bind\\_motif.php](http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/help_bind_motif.php)) para confirmar su inclusión como FTs y proponer elementos *cis* asociados a ellos (derivados de datos experimentales para ortólogos), de utilidad para nuestro análisis.

#### **3.1.2. Estudios *in silico* de elementos *cis* conocidos en las secuencias regulatorias de los grupos de determinantes conformados**

En Gismondi y col. (enviado) se desarrolló el programa ***cisAnalyzer***, basado en los lenguajes Perl y R, que permite realizar búsquedas, analizar enriquecimiento y co-ocurrencia de motivos en grupos de secuencias biológicas, de tipo nucleotídicas o peptídicas. Los elementos *cis* utilizados en este trabajo fueron los mencionados en 3.1.1.4 así como también aquellos pertenecientes a la base de motivos PAsPdb (Plant Abiotic Stress- and Phytohormone-related motifs database) asociada a ***cisAnalyzer*** y los mismos corresponden a sitios de unión de FTs comprobados experimentalmente en diversas especies vegetales.

Finalmente, se procedió como se describe en el tutorial de ***cisAnalyzer***, resumido en los siguientes pasos: se colocó cada archivo multifasta de secuencias target de búsqueda (uno por grupo) en la carpeta indicada (MyTargets; Gismondi y col., enviado), se eligió trabajar con la base

PASPdb completa y se realizaron los análisis en sí. Búsquedas similares se llevaron a cabo en sets control y en el genoma de duraznero.

El análisis estadístico para evaluar enriquecimiento en los grupos conformados se llevó a cabo mediante la prueba  $\chi^2$  (chi-cuadrado) en el programa SigmaPlot 12.0, dada la necesidad de probar si la pertenencia de un gen a un grupo conformado se relaciona con la presencia de un dado motivo en su promotor. Se dispusieron los datos en tablas de contingencia y se realizaron las pruebas con las frecuencias absolutas de promotores sin o con al menos una aparición de un dado motivo. Se enfrentaron los grupos de interés y los sets controles construidos al azar vs el genoma de *P. persica*. Se consideraron los valores de *p*-value menores a 0,05 para asignar enriquecimiento.

### **3.1.3. Búsqueda de factores de transcripción de duraznos y otros frutos, capaces de unir a los motivos identificados. Recopilación de información filogenética y funcional**

Luego de los análisis mencionados y a partir de las referencias que provee el programa *cisAnalyzer* y la base de datos asociada PASPdb (Gismondi y col., enviado), fue posible identificar aquellos genes codificantes de FTs demostrados de interaccionar con los motivos encontrados. Luego, con la ayuda de las bases PlantPAN y PlantTFDB y de la herramienta de obtención de ortólogos de Biomart (Phytozome), se recopiló información acerca de la funcionalidad y la expresión génica de estos FTs en condiciones poscosecha de interés. Debido a la capacidad de los distintos miembros de una familia de FTs de interaccionar con elementos *cis* y a la falta de reportes, se amplió la búsqueda utilizando las familias completas. Se consultaron particularmente las bases de datos construidas en Gismondi y col. (enviado), que permiten obtener información gen-específica.

Por otro lado, se recurrió a análisis filogenéticos en pos de avanzar en la dilucidación de FTs de duraznos relacionados a los elementos *cis* identificados. Para las familias analizadas, se recopilaron identificadores a partir de reportes de PASP en *A. thaliana*, se obtuvieron ortólogos proteicos en duraznos en Biomart (Phytozome), se descargaron secuencias aminoacídicas, se alinearon mediante MUSCLE (Edgar, 2004) y se infirieron árboles filogenéticos mediante método de máxima probabilidad (MEGA6; Tamura y col., 2013) basado en modelos de sustitución de aminoácidos particulares para cada grupo de secuencias (establecidos previamente a partir de análisis de los alineamientos). La significancia estadística de cada rama se evaluó por análisis de bootstrap con 500 repeticiones.

### 3.2. Selección de factores de posible funcionalidad protectora frente al daño por frío, a caracterizar bioinformática y experimentalmente

La creación de la base de determinantes posiblemente protectores frente al CI y su caracterización con la literatura e *in silico* tuvo como objetivos acelerar la recopilación de información a nivel de genes, primer paso en su análisis funcional.

Prosiguiendo con los objetivos de la presente tesis, se seleccionaron dos factores con ZFs y posibles roles regulatorios de la expresión génica, a partir del trabajo de Lauxmann y col. (2012). El mismo reporta los resultados obtenidos luego de la aplicación de la técnica de Differential Display en duraznos expuestos a tratamiento térmico, contribuyendo a la identificación de 127 unigenes diferencialmente expresados a nivel de transcripto. Adicionalmente, en la decisión intervinieron: la información obtenida en el capítulo 1 de la presente tesis (que nuclea información genómica, de expresión y de ortólogos) y la disponibilidad de herramientas de laboratorio para su evaluación experimental. Los factores elegidos resultaron *PpZAT12* (ppa011762m.g / Prupe.2G230800) y *PpTRAF* (ppa011708m.g / Prupe.1G538600), siendo el primero un FT C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> cuyo ortólogo en *A. thaliana*, *AtZAT12*, es un marcador de estrés sistémico y el segundo de ellos, una proteína de funcionalidad desconocida en plantas, con ZFs tipo TRAF en tándem.

#### 3.2.1. Caracterización bioinformática de los factores seleccionados

Entre las herramientas utilizadas para la caracterización bioinformática de los factores *PpZAT12* y *PpTRAF* se deben incluir las bases de datos genómicas GDR (Genome Database of Rosaceae, <http://www.rosaceae.org/>; Jung y col., 2014), Phytozome (<http://www.phytozome.net/>; Goodstein y col., 2012) y, al recurrir a la especie modelo clásica en dicotiledóneas (incluso para realizar estudios con ortólogos), TAIR (The Arabidopsis Information Resource, <http://www.arabidopsis.org/>; Lamesch y col., 2011). *AtZAT12* (At5g59820) es el ortólogo para *PpZAT12* y *AtTRAF* (At1g09920), para *PpTRAF*. Las mencionadas bases genómicas proveyeron las secuencias de genes, transcriptos, proteínas, regiones no traducibles, intrones, regiones upstream y downstream a los loci de interés, e información de sintenia respecto a ortólogos pertenecientes a especies relacionadas.

El servidor Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>; Sievers y col., 2011) y MUSCLE (Edgar, 2004) permitieron realizar alineamientos de secuencias, y se infirieron árboles filogenéticos con el método de máxima probabilidad (MEGA6; Tamura y col., 2013).

Las bases de datos y sus herramientas de escaneo y búsqueda, InterPro 66.0 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>; Mitchell y col., 2015), HMMER (<http://hmmer.org/>; Finn y col.,



2011) y PFAM 31.0 (<http://pfam.xfam.org/>, Finn y col., 2016), junto con herramientas del ExpASY (<https://www.expasy.org/proteomics>) se utilizaron en la predicción de arquitecturas, parámetros fisicoquímicos y modificaciones postraduccionales en los productos génicos bajo estudio. WoLF PSORT ([http://www.genscript.com/psort/wolf\\_psort.html](http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html); Horton y col., 2007), SUBA3 (<http://suba3.plantenergy.uwa.edu.au/>; Tanz y col., 2013), CELLO2GO (<http://cello.life.nctu.edu.tw/cello2go/>, Yu y col., 2014) y Plant-mPloc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>, Chou y Shen, 2010) se usaron para predicciones de localización subcelular.

Por otro lado, PDB (Protein Data Bank, <http://www.wwpdb.org/>), HHPRED (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/#/tools/hhpred>, Zimmerman y col., 2017), Modeller 9.17 (<https://salilab.org/modeller/>, Webb y Sali, 2014), SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>, Biasini y col., 2014), I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>, Yang y col., 2015), se consultaron a la hora de obtener alineamientos estructurales y modelados de la proteínas en estudio. Adicionalmente, PlantTFDB 4.0 (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>, Jin y col., 2017), PlnTFDB (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/>, Pérez-Rodríguez y col., 2010) y PlantPAN 2.0 (<http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw/>, Chow y col., 2016) así como la publicación de Bianchi y col. (2015) se consultaron al estudiar familias de FTs de *P. persica* y *A. thaliana*.

Para recopilar datos de expresión génica se recurrió a ExPath (<http://expath.itps.ncku.edu.tw/>; Chien y col., 2015), BAR (Bio-Analytic Resource for Plant Biology; <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>; Waese y col., 2017) y pep2pro (<http://fgcz-pep2pro.uzh.ch/index.php>; Baerenfaller y col., 2011).

Finalmente, se utilizaron PlantPAN 2.0 (Chow y col., 2016) y cisAnalyzer, la herramienta desarrollada en Gismondi y col. (enviado), junto a sus asociadas bases de motivos, para realizar búsquedas *in silico* de elementos *cis* en regiones regulatorias.

### 3.3. Material biológico

#### 3.3.1. *Prunus persica* (L.) Batsch

El material de trabajo utilizado perteneciente a la especie *Prunus persica* (L.) Batsch, consistió de hojas, flores de la variedad Dixiland (DX) y frutos de durazno de las variedades Flordaking (FD), Dixiland, Rojo 2 (R2) y Elegant Lady (EL), cosechados durante las temporadas 2007-2008, 2008-2009, 2010-2011 y 2013-2014. Las muestras son provenientes de un lote experimental (33° 44' 12,1'' de latitud Sur y 59° 47' 48,0'' de longitud Oeste) de la Estación Experimental (EEA) San Pedro del INTA. Esta plantación se estableció como tal en el año 1989. En

la figura 3.1 se puede visualizar la misma, en estadios de plena floración.



**Figura 3.1** Plantación de *Prunus persica* cv "Dixiland" en EEA San Pedro. Se observan plantas en el estadio de plena floración y la distancia promedio entre ellas es de 5m x 5m.

### 3.3.1.1. Variedades y tratamientos poscosecha

Las variedades elegidas presentan distinta susceptibilidad al daño por frío, variable evaluada a través de medidas de jugosidad realizadas sobre frutos maduros, previamente expuestos o no a tratamiento refrigerado por 21 d (Genero y col., 2016). Los resultados fueron validados en más de una temporada de cosecha. De acuerdo a las mencionadas mediciones, Flordaking (FD) fue evaluada como la variedad que posee mayor pérdida de jugosidad luego del almacenamiento a bajas temperaturas (por ende, la consideraremos como la más susceptible a harinosidad), Rojo2 (R2) y Dixiland (DX) se clasificaron como variedades intermedias y la restante Elegant Lady (EL) se categorizó como la menos susceptible a este trastorno de CI, al comprobarse que la refrigeración afecta poco su jugosidad. La tabla 3.3 detalla las características agronómicas particulares específicas de cada variedad en estudio.

**Tabla 3.3 Variedades de duraznero en estudio**

Variedad	Origen	Cosecha	Rasgos del fruto			
			Calibre	Color de fondo de epidermis	Color de pulpa	Carozo
EL	Grant Merrill, California, EEUU	10 al 25/01	Medio a grande	Amarillo con sobrecolor rojo en un 70 a 90 %	Amarillo	Libre (durazno prisco)
DX	Depto. De Agricultura (USDA), Fort Valley, Georgia, EEUU	08 al 22/01	Grande	Amarillo cubierto con sobrecolor rojo en 70-90 % de la superficie	Amarillo	Libre (durazno prisco)
R2	Zaiger's Genetics, California, EEUU	12 al 25/11	Medio a chico	Amarillo con sobrecolor rojo en 80 % de la superficie	Amarillo	Parcialmente libre
FD	Universidad de Florida, Gainesville, EEUU	04 al 15/11	Medio	Amarillo cubierto con sobrecolor rojo en 40-60 % de la superficie	Amarillo	Semilibre

### 3.3.2. *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Col-0*

Se planteó profundizar el estudio funcional de los genes *PpTRAF* y *PpZAT12* en la especie modelo *Arabidopsis thaliana* (que posee los genes ortólogos correspondientes). Diversas líneas genotípicas de *A. thaliana* fueron seleccionadas y obtenidas para la caracterización funcional en comparación a la línea salvaje *Col-0* (Columbia-0). Las líneas mutantes con inserciones de ADN-T en sus genomas, fueron adquiridas de la colección Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC, <https://abrc.osu.edu>). La tabla 3.4 lista las diferentes líneas a evaluar.

**Tabla 3.4 Líneas mutantes de *A. thaliana* adquiridas**

Locus	Línea	Ecotipo	Polimorfismo	Región de inserción	Denominación
<i>AtTRAF</i>	SALK_125714	<i>Col-0</i>	Inserción de ADN-T	Primer intrón	<i>KO-AtTRAF-4</i>
<i>AtZAT12</i>	CS352165	<i>Col-0</i>		Exón único	<i>KO-AtZAT12</i>

Las líneas transgénicas sobreexpresantes de *AtTRAF*, obtenidas por el método Floral dip, se denominaron *35S::AtTRAF-2*, *35S::AtTRAF-5* y *35S::AtTRAF-8*. Por otro lado, las líneas con ganancia de función de *AtZAT12* se llamaron *35S::AtZAT12/Col-0* mientras que aquellas portadoras de altos niveles de *PpZAT12*, *35S::PpZAT12/Col-0* y *35S::PpZAT12/KO-AtZAT12*.

#### 3.3.2.1. Cultivo de plantas en suelo

Las semillas salvajes y mutantes fueron depositadas sobre tierra estéril con agregado de vermiculita. Las macetas se ubicaron en bandejas y posteriormente, se realizó la estratificación cubriendo las macetas con Saran Wrap (papel film de cocina) para evitar la pérdida de humedad y luego papel aluminio, para mantenerlas en oscuridad, e incubándolas en una cámara refrigerada a 4 °C por 72 h. Este proceso permitió que las semillas abandonen los períodos de dormancia y germinen eficazmente y de manera sincronizada. A continuación, las bandejas se trasladaron a una cámara de cultivo operando bajo fotoperíodo luz/oscuridad de 16 h/8 h, 70 % de humedad relativa y con un flujo de luz de 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ . La temperatura de crecimiento normal fue de 24 °C. Las macetas se irrigaron dos veces por semana mediante inundación moderada de las bandejas. Este tipo de riego inferior permite evitar humedad excesiva durante germinación y crecimiento.

#### 3.3.2.2. Cultivo de plantas en placa. Esterilización de semillas

Para llevar a cabo ensayos fenotípicos, semillas de *A. thaliana* de las líneas en estudio fueron esterilizadas en flujo laminar bajo el siguiente protocolo. En primer lugar, las mismas fueron incubadas con una solución de etanol 50 % (v/v) suplementada con Tritón 0,5 % (v/v) durante 3 min. Luego, fueron lavadas con etanol comercial y finalmente secadas en papel de filtro

estéril. Una vez esterilizadas, las semillas fueron sembradas con palillo estéril en placas de cultivo con medio MS (Murashige & Skoog) 1X pH=5,7 (ajustado con KOH) (Phytotechlab) y 0,8 % (p/v) de agar. Las placas fueron cerradas con cinta 3M (Micropore™) para preservarlas de contaminaciones. Estratificación y crecimiento se realizaron como se mencionó anteriormente para el crecimiento de plantas en suelo.

### 3.3.3. *Nicotiana benthamiana*

Se emplearon semillas salvajes de la especie *Nicotiana benthamiana*. Para su cultivo en suelo, se distribuyeron semillas en macetas con tierra estéril. No se taparon con tierra adicional y las bandejas con macetas se ubicaron en una cámara de cultivo operando bajo un fotoperíodo luz/oscuridad de 16 h/8 h, 70 % de humedad relativa y con flujo de luz de 120  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ . La temperatura de crecimiento normal fue de 24 °C. Las macetas fueron irrigadas dos veces por semana mediante inundación moderada de las bandejas. Las plantas estuvieron listas para realizar transformaciones transitorias luego de tres a cuatro semanas de crecimiento.

### 3.3.4. *Escherichia coli*

Con el fin de cumplir con diferentes objetivos, las diversas construcciones plasmídicas obtenidas en la presente tesis debieron ser transformadas en cepas bacterianas particulares. Las últimas se adquirieron comercialmente o fueron cedidas por investigadores. La tabla 3.5 detalla las características principales de las mismas y los ensayos experimentales en los que se utilizaron.

**Tabla 3.5 Cepas bacterianas de *E. coli* utilizadas**

Cepa	Características	Ensayo
DH5 $\alpha$	F- <i>endA1 thi-1 recA1 relA1 deoR hsdR17 supE44 gyrA96</i> $\phi 80\text{d}lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169$	Clonados
BX04	$\Delta cspABEG kan^r$	Complementación funcional en frío
RL211	$Cm^S$ ( <i>trpL</i> terminator upstream al gen <i>cat</i> )	Prueba de actividad helicasa

#### 3.3.4.1. Crecimiento de *E. coli* y medios de cultivo

Se empleó medio de cultivo Luria Bertani (LB) líquido: 1 % (p/v) triptona, 0,5 % (p/v) extracto de levadura, 1 % (p/v) NaCl. Para obtener el medio sólido (LB agar), se adicionó 1,5 % (p/v) de agar al medio líquido. La temperatura óptima de crecimiento de bacterias *E. coli* fue 37 °C y, en el caso de cultivos líquidos, la agitación fue realizada a 200 rpm. Según sea necesario, el medio fue suplementado con los antibióticos correspondientes.

### 3.3.5. *Agrobacterium tumefaciens*

Se empleó la cepa GV3101 (pMP90) de *A. tumefaciens* que posee resistencia genómica a rifampicina y plasmídica (plásmido helper, plásmido Ti desarmado) a tetraciclina. La misma es compatible con vectores binarios que posean resistencia a kanamicina o cloranfenicol. Estas bacterias se utilizaron como vehículos para transformaciones de *A. thaliana* y *N. benthamiana*.

#### 3.3.5.1. Crecimiento de *A. tumefaciens* y medios de cultivo

Se empleó medio de cultivo Luria Bertani (LB) líquido y se adicionó agar para obtener el medio sólido (LB agar). En todos los casos, los inóculos iniciales se llevaron a cabo con ansa estéril. La temperatura óptima de crecimiento de bacterias *A. tumefaciens* fue 28 °C y, para cultivos líquidos, la agitación de 150 rpm. En todos los casos, el medio fue suplementado con 100 µg/ml rifampicina, 5 µg/ml tetraciclina y otro agente seleccionador plasmídico cuando fuera necesario.

### 3.4. Reacción de Transcripción Reversa seguida de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)

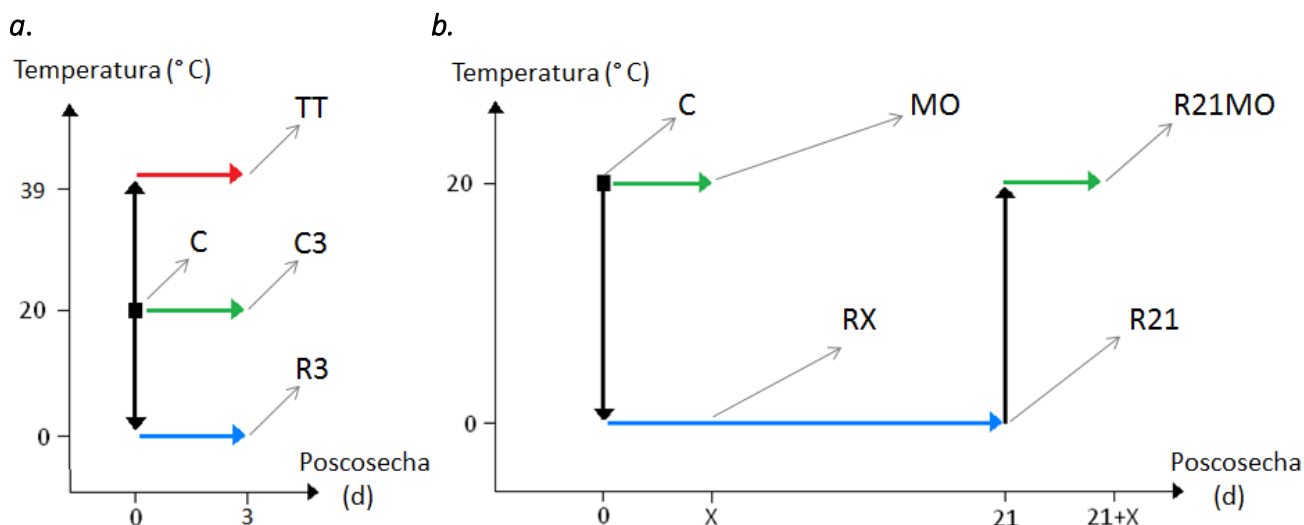
Con el fin de obtener información a nivel de transcripto para cada uno de los ARNms en estudio e incluso para otros de interés, se procedió a realizar diversos experimentos de RT-qPCR.

#### 3.4.1. Estudios de los niveles de ARNms *PpTRAF* y *PpZAT12* en *P. persica*

##### 3.4.1.1. Toma de muestras en condiciones poscosecha de maduración, tratamiento térmico y refrigeración, de diversas variedades de *P. persica*

Frutos de las variedades seleccionadas fueron cosechados aproximadamente a los 93 d luego de la floración, alcanzada la madurez fisiológica (valores de firmeza cercanos a 50 N) y seleccionados manualmente por uniformidad de coloración, tamaño y firmeza de su pulpa. En el caso de la variedad Dixiland, los frutos fueron separados en los siguientes grupos: C (Cosecha), C3 (3 d de almacenamiento a 20 °C), TT (3 d de almacenamiento a 39 °C, tratamiento térmico) y R3 (3 d de almacenamiento a 0 °C). Para FD, R2 y EL, los grupos fueron denominados: C (Cosecha), MO (X d de almacenamiento a 20 °C hasta alcanzada la madurez organoléptica), RX (X d de almacenamiento a 0 °C), R21 (21 d de almacenamiento a 0 °C) y R21MO (X d de almacenamiento a 20 °C previa refrigeración por 21 d a 0 °C). La determinación de la llegada a madurez organoléptica condice con el ablandamiento propio de esta etapa del desarrollo del fruto (decae la firmeza a valores cercanos a 10 N). Las cámaras usadas para el almacenamiento a diferentes temperaturas aseguraron condiciones de humedad relativa de 85-90 %. Al finalizar cada tratamiento aplicado, se recolectaron muestras consistentes en porciones de mesocarpio y se congelaron inmediatamente en N<sub>2</sub>(l) para almacenarse a -80 °C hasta su posterior utilización. La figura 3.2 muestra esquemas

de los tratamientos poscosecha aplicados y la tabla 3.6, detalla cada condición que ha sido muestreada.



**Figura 3.2 Esquema de tratamientos y toma de muestras en condiciones poscosecha de duraznos cvs. DX, EL, R2 y FD. a)** Tratamiento térmico y refrigeración en DX. **b)** Refrigeración corta y prolongada en EL, R2 y FD. Los grupos analizados fueron: C (Cosecha), C3 (frutos almacenados por 3 d a 20 °C para DX), MO (frutos almacenados X=4-6 d a 20 °C para las demás variedades, hasta alcanzar la madurez organoléptica), R3 o RX (frutos almacenados por 3 d para DX y X=4-6 d para las demás variedades a 0 °C), R21 (frutos almacenados por 21 d a 0 °C) y R21MO (frutos que alcanzan la madurez organoléptica luego de la refrigeración a 0 °C por 21 d). Las flechas grises indican el momento de toma de muestras, transcurridos los d correspondientes para cada tratamiento.

**Tabla 3.6 Condiciones poscosecha muestreadas**

Variedad(es)	Temporadas	Condición poscosecha	Descripción
DX	2007-2008 2008-2009	C	Duraznos cosechados alcanzada la <b>madurez fisiológica</b>
		C3	Duraznos cosechados y almacenados durante 3 d a 20 °C. <b>Vida de estantería</b>
		TT	Duraznos cosechados y almacenados durante 3 d a 39 °C. <b>Tratamiento térmico</b>
		R3	Duraznos cosechados y almacenados durante 3 d a 0 °C. <b>Refrigeración corta</b>
FD, R2, y EL	2010-2011 2013-2014	C	Duraznos cosechados alcanzada la <b>madurez fisiológica</b>
		MO	Duraznos cosechados y almacenados durante X d a 20 °C hasta <b>madurez organoléptica</b>
		RX	Duraznos cosechados y almacenados durante X d a 0 °C. <b>Refrigeración corta</b>
		R21	Duraznos cosechados y almacenados durante 21 d a 0 °C. <b>Refrigeración larga</b>
		R21MO	Duraznos cosechados, almacenados durante 21 d a 0 °C y luego <b>refrigerados</b> por X d a 20 °C hasta la <b>madurez organoléptica</b>

#### 3.4.1.2. Toma de muestras de diversos órganos de *P. persica* cv. Dixiland

Los ARNms *PpTRAF* y *PpZAT12* se evaluaron adicionalmente en cuanto a su abundancia relativa, en mesocarpo de frutos cosechados, flores abiertas y hojas adultas de duraznero. La unidad experimental consistió en pools de muestras provenientes de tres individuos.

#### 3.4.1.3. Extracciones de ARN total de frutos, hojas y flores de *P. persica*

Se utilizó el método descrito por Meisel y col. (2005) reportado para utilizarse sobre frutos de durazno. Para los tejidos foliar y floral, se utilizó la misma metodología escalada para realizarse a partir de diferentes masas de muestra de partida. Adicionalmente, dependiendo del experimento, las unidades experimentales fueron frutos o pools de tres frutos, hojas y flores.

En cuanto al procedimiento, los diferentes tejidos se pulverizaron a homogeneidad en presencia de N<sub>2</sub>(l). El pulverizado fue pesado para iniciar las extracciones a partir de 3 g de mesocarpio de durazno (o pool de tres duraznos) y 100 mg de pool de hoja o flor.

En el caso de la extracción a partir de frutos, se transfirió a un tubo SS34 conteniendo 10 ml de buffer de extracción (2 % (p/v) CTAB (Bromuro de Cetil Trimetil Amonio), 2 % (p/v) PVP (Polivinil pirrolidona), 100 mM Tris-HCl pH=8, 25 mM EDTA, 2 M NaCl, 2 % (v/v) β-mercaptoetanol y cantidad suficiente de H<sub>2</sub>O libre de ARNasas (tratada con 0,1 % (v/v) DEPC), precalentado a 65 °C. Se incubó 15 min a 65 °C mientras se realizaban agitaciones cada 5 min. Finalizada la incubación, se agregaron 10 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente. Se centrifugó 20 min a 12000 g y 25 °C en centrífuga Sorvall™. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo, sin arrastrar interfase. La misma fue re-extraída con igual volumen de cloroformo y transferida a un nuevo tubo.

Se inició una primera precipitación agregando 1/4 de volumen de 10 M LiCl a la fase acuosa, dejando incubar durante toda la noche a 4 °C. El día siguiente se centrifugó la preparación en Sorvall™ por 40 min a 12000 g y 4 °C. Se eliminó el sobrenadante dejando volumen suficiente para la resuspensión del precipitado en un tubo de 1,5 ml. Se centrifugó 10 min a 14000 g y 4 °C en microcentrífuga, se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido a temperatura ambiente en 500 µl de buffer SSE (1 M NaCl, 0,5 % (p/v) SDS, 10 mM Tris-HCl pH=8, 1 mM EDTA).

Posteriormente, se realizó una nueva extracción orgánica agregando 500 µl de cloroformo, centrifugando a 4 °C por 10 min a 14000 g y recuperando la fase acuosa. Se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto frío y se incubó 1 h a -80 °C para precipitar el ARN. Luego se centrifugó a 4 °C por 20 min a 14000 g, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 ml de etanol 70 % (v/v) frío. Se centrifugó por 10 min a 14000 g y 4 °C, descartándose el

sobrenadante y secando el precipitado 30 min al vacío (Centrivap, Labcono). El precipitado de ARN se resuspendió en 30  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de ARNasas y almacenó a -80 °C hasta su uso.

### 3.4.2. Estudios de los niveles de ARNms *AtTRAF*, *AtZAT12* y otros transcritos en *A. thaliana*

#### 3.4.2.1. Toma de muestras de diversos órganos de *A. thaliana*

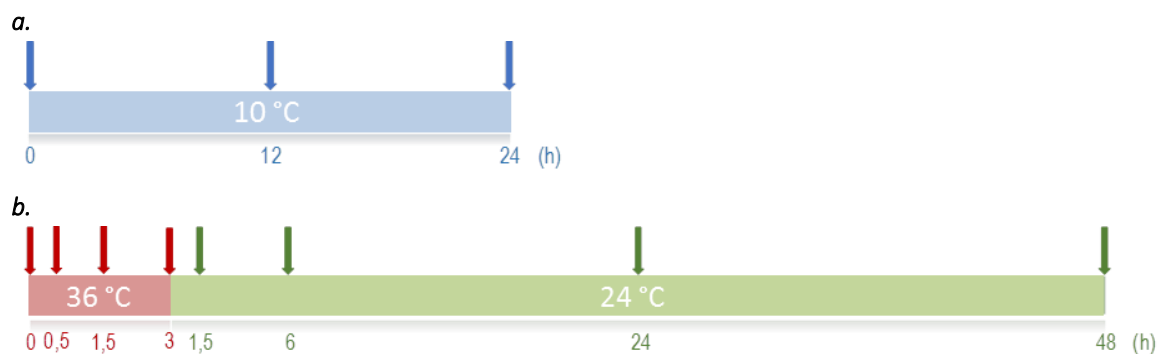
A partir de plantas de 30 d cultivadas en suelo y en condiciones normales de temperatura (24 °C), los órganos muestreados fueron raíces, hojas de roseta, silicuas verdes, flores “cerradas” (sin pétalos visibles) y “abiertas” (flores con pétalos expandidos). Cada una de tres réplicas biológicas evaluadas consistió en un pool de órganos tomado a partir de tres individuos diferentes.

#### 3.4.2.2. Toma de muestras foliares de *A. thaliana* bajo estímulos de temperatura

Para analizar los niveles de ARNm de interés frente a bajas temperaturas, plantas de 35 d cultivadas en suelo fueron expuestas a 10 °C durante 24 h (fotoperíodo 16 h / 8 h; flujo de luz de 70  $\mu$ E/m<sup>2</sup>s). Se tomaron muestras de hoja de roseta a las 0, 12 y 24 h de exposición (fig. 3.3a).

Con el fin de aplicar un tratamiento de altas temperaturas, plántulas de 11 d crecidas en placas de cultivo con MS-agar, se sometieron a 36 °C en oscuridad durante 3 h y luego retornaron a las condiciones normales de crecimiento (24 °C) durante 48 h para permitir su recuperación (Kilian y col., 2007). La figura 3.3b representa la toma de muestras de hoja de roseta: a tiempo de exposición 0, 0,5, 1,5 y 3 h (en rojo); y 1,5, 6, 24 y 48 h de recuperación a 24 °C (en verde).

En ambos casos, se tomaron tres réplicas biológicas de diferentes individuos, en tubos eppendorf estériles y las mismas se almacenaron a - 80 °C hasta su utilización.



**Figura 3.3 Esquemas de tratamientos y toma de muestras foliares de *A. thaliana* en condiciones de estrés por temperatura. a)** Exposición de plantas de 35 d a 10 °C por 24 h, tomas de muestra de hoja de roseta a 0, 12 y 24 h. **b)** Exposición de plántulas de 11 d a 36 °C por 3 h en oscuridad, luego recuperación a 24 °C durante 48 h en fotoperíodo normal. Tomas de muestra de hojas a 0, 0,5, 1,5 y 3 h de calor; 1,5, 6, 24 y 48 h de recuperación a 24 °C. Las flechas indican el muestreo realizado para ambos tratamientos.

#### 3.4.2.3. Toma de muestras foliares de genotipos de trabajo de *A. thaliana*

Construidos los genotipos de interés, fue necesario evaluar los efectos de estas modificaciones genotípicas sobre los ARNms en estudio. Para ello, se realizaron extracciones de



ARN total provenientes de hojas de roseta adultas de diferentes individuos, potenciales mutantes y sobreexpresantes y se analizaron sus niveles en relación al genotipo salvaje *Col-0*.

Por otro lado, resultó de interés caracterizar el efecto de la ganancia de función de los genes *ZAT12* ortólogos sobre la abundancia de ciertos transcritos, previamente reportados como modificados frente a cambios genéticos y fenotípicos similares (Vogel y col., 2005). Se recurrió a extracciones de ARN total de pools de tres hojas de roseta de diferentes individuos con 30 d, para cada genotipo analizado.

#### **3.4.2.4. Extracciones de ARN total de diferentes órganos de *A. thaliana***

Para llevar a cabo todos los experimentos de RT-qPCR a partir de los diferentes tratamientos mencionados y órganos a evaluar (excepto silicuas verdes), el ARN total se aisló a partir de 10 a 100 mg de tejido utilizando el reactivo de Trizol (Roche). Dicho tejido fue pulverizado en un mortero con N<sub>2</sub>(l) y a continuación se le agregó 1 ml de reactivo Trizol (Roche). Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 2 - 3 min. Luego de este tiempo se les adicionaron 0,2 ml de cloroformo y fueron mezcladas de forma vigorosa durante 15 seg. Posteriormente, se centrifugaron durante 10 min a 14000 rpm a 4 °C. El sobrenadante resultante fue transferido cuidadosamente a un nuevo tubo eppendorf en el que el ARN fue precipitado mediante la adición de igual volumen de isopropanol y posterior incubación a -20 °C durante al menos 20 min. Se procedió a centrifugar las muestras a 4 °C durante 15 min a 14000 rpm. Luego, se realizaron dos lavados del mismo con 800 µl de etanol al 70 % (V/V) en agua destilada con 0,01 % (v/v) de DEPC (inhibidor de enzimas ARNasas), los cuales fueron seguidos por centrifugaciones de 5 min a 7500 rpm. Una vez recuperado el ARN precipitado, el mismo fue secado a temperatura ambiente; y finalmente, se resuspendió en 50 µl de H<sub>2</sub>O DEPC, mezclando suavemente. Las muestras fueron incubadas a 55 °C durante 10 - 15 min hasta resuspensión total.

La excepción fue silicuas verdes, utilizándose el protocolo de Oñate-Sánchez y col. (2008).

#### **3.4.3. Determinación de la cantidad y pureza del ARN total obtenido**

Para todos los casos, la cantidad y pureza del ARN extraído se determinaron espectrofotométricamente de acuerdo con el método descrito por Sambrook y col. (1989). Se realizaron diluciones 1:200 de las muestras de ARN en H<sub>2</sub>O DEPC y, en un espectrofotómetro Power Wave XS (BIO-TEK Instruments) con paso óptico de 0,5 cm, se midieron las absorbancias a  $\lambda=260$  y 280 nm utilizando el programa KC Junior. Luego se estimó la pureza calculando la relación  $Abs_{260}/Abs_{280}$ . Valores entre 1,7 y 2,1 indican una pureza apropiada de la preparación de ARN total respecto al contenido de proteínas. Finalmente, se realizaron los cálculos necesarios para estimar

la cantidad de ARN en cada muestra, considerando que 1 unidad de absorbancia a  $\lambda=260$  nm corresponde a 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ARN simple hebra.

#### 3.4.4. Determinación de la calidad del ARN total obtenido

Se determinó la integridad del ARN obtenido mediante electroforesis en geles de agarosa 1 % (p/v) en buffer de corrida TBE 0,5X (44 mM Tris-HCl pH=8, 36 mM ácido bórico, 50 mM EDTA) en presencia de SyberSafe a una concentración final de 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Las muestras se mezclaron en relación 4:1 con buffer de siembra 5X (0,25 % (p/v) xilencianol, 0,25 % (p/v) azul de bromofenol, 30 % (v/v) glicerol). Se sembró adicionalmente el marcador de tamaño molecular ADN del fago  $\lambda$  (Thermo) digerido con *EcoRI* y *HindIII* (Promega), de concentración conocida. La corrida electroforética se realizó a una intensidad constante de 70 mA. Los geles fueron visualizados en transiluminador UV (longitud de onda de trabajo: 302 nm, equipo BioChemSystem, UVP Bioimaging Systems) y fotografiados utilizando una cámara Hamamatsu 1394-C8484-51-03G.

#### 3.4.5. Eliminación de ADN genómico

Antes de proceder con la retrotranscripción, fue necesario eliminar el ADN genómico de las extracciones de ARN, evidenciable por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y en el gel de integridad. Se trataron 2  $\mu\text{g}$  de ARN total con 1  $\mu\text{l}$  de DNAsa I (Promega), 0,25  $\mu\text{l}$  de RNAsin (inhibidor de ARNasas, Promega) y  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC hasta volumen final de 20  $\mu\text{l}$ , por 30 min a 37 °C.

Posteriormente, se verificó la efectividad del tratamiento con DNAsa I, llevando a cabo (PCR) con el siguiente protocolo. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 15  $\mu\text{l}$  con buffer Taq Pegasus 1X (provisto por el fabricante de la enzima, EMBIOTEC); 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2 mM dNTPs; 2,5 U ADN polimerasa Taq Pegasus (EMBIOTEC), 1  $\mu\text{l}$  de cada muestra de ARN total tratado con DNAsa I y 0,5  $\mu\text{M}$  de oligonucleótidos cebadores de *PpDNAREp* o *UBQ10*, normalizadores utilizados para las RT-qPCR de duraznero o *A. thaliana*, respectivamente (ver tablas 3.7 y 3.8). Se realizaron los correspondientes controles de la reacción de amplificación: negativo en el que no se incluyó molde y positivo con ADNc previamente obtenido cuya amplificación con estos cebadores se conocía efectiva. Se utilizó un termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems), comenzando con una etapa de desnaturalización de 5 min a 94 °C; luego 40 ciclos del siguiente protocolo: 30 s de desnaturalización a 94 °C, 45 s a la temperatura de hibridación 56 °C, 1 min de extensión a 72 °C; y una etapa de extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 2 % (p/v) en SyberSafe, sembrando 7  $\mu\text{l}$  de cada reacción.

Por otro lado, se verificó la mantención de la integridad del ARN total luego del tratamiento con DNasa I, mediante electroforesis en geles de agarosa 1 % (p/v) en SyberSafe.

### 3.4.6. Diseño de cebadores específicos para los diferentes ARNm a analizar mediante RT-qPCR

Trabajando con los accesos génicos de *PpTRAF*, *PpZAT12* y sus ortólogos en *A. thaliana* en la base de datos Phytozome, se obtuvieron sus secuencias génicas y transcripcionales. Se diseñaron pares de oligonucleótidos cebadores para la amplificación de fragmentos, de al menos 110 y no más de 270 pb, de cada transcripto a evaluar. Esto se llevó a cabo utilizando el programa Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) (Rozen y Skaletsky, 2000), al que se le proveyeron características especiales de los cebadores para este tipo de técnica. Adicionalmente, se consideró la posibilidad de evitar la amplificación de fragmentos a partir de ADN genómico contaminante, diseñando sitios de hibridación en uniones exón-intrón siempre que se pudiera y aumentar su especificidad al dirigirlos a 3' UTR de los transcriptos.

Para los experimentos de RT-qPCR en muestras de duraznero, se utilizó como gen normalizador al denominado *PpDNArep*, homólogo a *rad50* de *A. thaliana* y seleccionado por Lauxmann y col. (2012). Se comprobó mediante RT-qPCR que sus niveles de expresión no variaran en las muestras analizadas de las diferentes variedades (Genero y col., 2016). En la tabla 3.7 se detallan las secuencias de oligonucleótidos utilizados y la longitud de los amplicones esperados.

**Tabla 3.7 Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-qPCR de *P. persica***

Transcripto		Cebador		Tamaño (pb)
		Directo	Reverso	
<b><i>PpTRAF</i></b>	ppa011706m Prupe.1G538600.1	5'-CGGACGGAACTTTGTCATCA-3'	5'-TGCTCTCTTTGGGGACCTTG-3'	152
<b><i>PpZAT12</i></b>	ppa011762m Prupe.2G230800.1	5'-GTCACATGAGGAGGCACAGA-3'	5'-ACCCTCCTACCGCTATTTCGT3'	151
<b><i>PpDNArep</i></b>	ppa001176m Prupe.1G165000.1	5'-TGAGCCTCTTCCAAATGCTT-3'	5'-ACGGTGGCACAGTCTAAAGG-3'	141

La tabla 3.8 permite visualizar los cebadores utilizados para las diversas RT-qPCRs en muestras de *A. thaliana*. Solo los cebadores de *PpZAT12* (tabla 3.7) se utilizaron en muestras de *A. thaliana*, al tratarse de genotipos transgénicos que presentaban su expresión (junto a *Col-0* y líneas relativas a *AtZAT12*). A partir del trabajo de Vogel y col. (2005), se seleccionaron posibles blancos de *AtZAT12* para evaluar sus niveles de ARNm en genotipos relativos a *ZAT12*. El normalizador utilizado fue *UBQ10*, comprobada su estabilidad en las muestras analizadas.

Tabla 3.8 Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-qPCR en *A. thaliana*

Transcripto		Cebador		Tamaño (pb)
		Directo	Reverso	
<i>AtTRAF</i>	At1g09920.1	qAtTRAff 5'- CCGAGCATCAGGAAGTATGTG -3'	qAtTRAfr 5'- TCTTCGTCTTCTCCCGTTTC -3'	170
<i>AtZAT12</i>	At5g59820.1	qAtZAT12f 5'- GAAAACGTCGTCGCATCCTT -3'	qAtZAt12r 5'- CAGATCCAAACAAGCCACTCTC -3'	199
<i>UBQ10</i>	At4g05320.1	UBQF 5'- AAGCAGCTTGAGGATGGAC -3'	UBQR 5'- AGATAACAGGAACGGAAACATAGT -3'	221
<i>AZI3</i>	At4g12490.1	5'- GGTGTATGTGCGAATGTGCTAAG -3'	5'- AACTGTGTGCGTCGTATGTG -3'	264
<i>SOC1</i>	At2g45660.1	5'- ATGAATTCGCCAGCTCCAAT -3'	5'- GCTTCATATTTCAAATGCTGCA -3'	118
<i>PAP1</i>	At1g56650.1	5'- CATAGGCTTCTAGGGAATAGGTG -3'	5'- TAGGAATGGGCGTAATGTCTC -3'	157
<i>DWF1</i>	At3g19820.1	5'- TCTCTCTTCTTAACGCCACTC -3'	5'- AGCCAAATTCGATACACCTCC -3'	148
<i>ACO1</i>	At2g19590.1	5'- GAACTCAGCAAGACGATGGA -3'	5'- GTGGGCATTCTGGGTATTTAG -3'	175
<i>NAP</i>	At1g69490.1	5'- CGGTTCCATGAGGTTAGATG -3'	5'- CAGTTCTTCTCTGCTTCGT -3'	152
<i>PMEI</i>	At5g20740.1	5'- ATGGGTTTCTAGGGATGGAC -3'	5'- ATGTACGTCGTGGGGTTTG -3'	140

### 3.4.7. Reacción de transcripción reversa

Las reacciones de transcripción reversa se realizaron con el fin de obtener la primera hebra de ADNc a partir del ARN total obtenido por extracción, para cada condición estudiada. En tubos de 1,5 ml se agregaron: el volumen de solución de ARN conteniendo 3 µg (para extracciones de *P. persica*) o 1 µg de ARN total (para *A. thaliana*) y 2 µg de oligo(dT), completando hasta un volumen final de 15 µl con H<sub>2</sub>O DEPC. Se incubó la mezcla por 5 min a 70 °C (desnaturalización del ARN total), se transfirió rápidamente a hielo y se agregaron 10 µl de buffer de reacción 1 mM dNTPs, buffer Mo-MLV 1X (Promega), 28 U RNAsin (inhibidor de ARNasas) y 200 U Mo-MLV (transcriptasa reversa) en H<sub>2</sub>O DEPC para completar volumen final de 25 µl. Se incubó la preparación 2 h a 42 °C para efectivizar la síntesis de ADNc. Finalmente, se inactivó la enzima indubando 10 min a 70 °C.

Los productos de ADNc se diluyeron convenientemente y se analizaron mediante PCR utilizando oligonucleótidos cebadores específicos para el gen *PpDNAREp* (posteriormente utilizado como normalizador). En cada tubo de PCR, se colocaron buffer GoTaq 1X (Promega), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de una mezcla equimolar de dNTPs, 2 µM de cada cebador para el gen *PpDNAREp*, 0,04 U/µl GoTaq ADN polimerasa (Promega), 0,8 µl del ADNc correspondiente en dilución al quinto y H<sub>2</sub>O destilada estéril hasta completar un volumen final de 20 µl. Cada reacción de PCR consistió

en una desnaturalización inicial de 2 min a 94 °C, seguida de 40 ciclos de: 10 s 96 °C (desnaturalización), 15 s 58 °C (hibridación de cebadores) y 1 min 72 °C (elongación) y un ciclo de extensión final de 4 min a 72 °C. Se realizaron los correspondientes controles de la reacción de amplificación: negativo en el que no se incluyó molde de ADNc y positivo para el cual el molde utilizado consistió en un ADNc previamente obtenido cuya amplificación con estos cebadores se conocía efectiva. Para finalizar, se verificó la obtención de productos amplificados mediante electroforesis en agarosa 2 % (p/v) en SyberSafe.

#### **3.4.8. Reacción de Transcripción Reversa seguida de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)**

Se llevaron a cabo seis reacciones de amplificación (tres con cebadores para normalizador y otras tres con cebadores para gen de interés) por cada molde de retrotranscripción, es decir, cada réplica biológica. Las reacciones de RT-qPCR se desarrollaron en un termociclador con sistema de detección Mx3005P QPCR (Agilent technologies, Stratagene, programa MxPro QPCR versión 4.10) y utilizando el colorante fluorescente SyberGreen I (Invitrogen). El volumen final de 20 µl contenía: buffer GoTaq 1X (Promega), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs en mezcla equimolar, 0,5 µM de cada uno de los oligonucleótidos cebadores (ver tablas 3.7 y 3.8), 0,8 U GoTaq ADN polimerasa, 1 µl de una dilución al quinto del ADNc correspondiente a cada muestra analizada (obtenido a partir de las reacciones de transcripción reversa mencionadas previamente en sección 3.4.7) y H<sub>2</sub>O destilada estéril hasta completar volumen final. Cada reacción de PCR consistió en una desnaturalización inicial de 2 min a 94 °C, seguida de 40 ciclos de 4 etapas: 10 s a 96 °C (desnaturalización), 15 s a 58 °C (hibridación de cebadores), 1 min a 72 °C (elongación) y 1 s a 77 °C (lectura de fluorescencia). Por último, se realizó una etapa de elongación final de 10 min a 72 °C.

Se determinaron las curvas de fusión para cada reacción de PCR midiendo la disminución de fluorescencia de los productos obtenidos respecto al aumento de temperatura (de 65 a 95 °C). La especificidad de las reacciones de PCR fue confirmada mediante el análisis de las curvas de fusión utilizando el software provisto por el equipo y, adicionalmente, mediante la verificación de tamaño de los amplicones obtenidos en electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) en SyberSafe.

#### **3.4.9. Determinación de la expresión génica y análisis estadísticos**

El cálculo de la expresión génica relativa de cada transcripto se llevó a cabo mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001). Los datos obtenidos se evaluaron a través de análisis de la variancia (ANOVA) o pruebas *t* de Student y las diferencias significativas mínimas se calcularon por los tests de Fisher y Bonferroni ( $\alpha = 0,05$ ) usando el programa SigmaPlot 12.0.

### 3.5. Obtención de constructos recombinantes de interés. Cebadores, clonados y subclonados

#### 3.5.1. Diseño de cebadores específicos

Según el experimento a realizar, se diseñaron pares de cebadores para las amplificaciones necesarias (tabla 3.9). Con el fin de aprovechar la manipulación molecular de ADN recombinante con enzimas de restricción y dependiendo de los vectores de llegada de cada ensayo así como también de la presencia de motivos de corte en las secuencias, se incluyeron sitios específicos flanqueantes a los cebadores.

**Tabla 3.9 Oligonucleótidos cebadores utilizados para clonados**

Amplicón	Cebador		Tamaño (pb)	Ensayo
	Directo	Reverso		
<i>PpTRAF</i> <i>SacI BamHI</i>	5'-GAGCTCTATGGCTGTTGCATCT-3'	5'-GGGATCCCTAATGCACTACTTG-3'	617	Complementaciones funcionales en <i>E. coli</i>
<i>AtTRAF</i> <i>SacI EcoRI</i>	5'- GAGCTCAATGGAGACTGCGACT -3'	5'- CGAATTCCTCTACTCAGGCTT -3'	596	
<i>CspA</i> <i>SacI HindIII</i>	5'- GAGCTCCGGTAAAATGACTGG -3'	5'- AAGCTTACAGGCTGGTTACGTTGC -3'	218	
<i>PpTRAF</i> <i>SacI NcoI</i>	5'-GAGCTCTATGGCTGTTGCATCT-3'	5'-CCATGGAATGCACTACTTGATTG-3'	615	
<i>PpTRAF</i> <i>SpeI NcoI</i>	5'-ACTAGTATGGCTGTTGCATCT-3'	5'-CCATGGAATGCACTACTTGATTG-3'	615	Localización subcelular
<i>AtTRAF</i> <i>SpeI NcoI</i>	5'- ACTAGTATGGAGACTGCGACT -3'	5'- CCATGGACTCAGGCTTCCTC -3'	590	
<i>AtTRAF</i> <i>XbaI EcoRI</i>	5'- TCTAGAGATGGAGACTGCGACT -3'	5'- CGAATTCCTCTACTCAGGCTT -3'	596	Transformaciones vegetales (Floral dip)
<i>AtZAT12</i> <i>BamHI PstI</i>	5'- GGATCCCAGAAGAAAAATGGTTG -3'	5'- CTGCAGGAAAAATTCAAAGAATGAG -3'	572	
<i>PpZAT12</i> <i>BamHI Sall</i>	5'-GGATCCATATGACCATGAAGAGG-3'	5'-GTCGACTTAGGAAAACCCAACAAG-3'	608	
<i>proPpTRAF</i> <i>MunI SmaI</i>	5'-CAATTGCATCAAATAGTCCATAC-3'	5'-CCCGGGTTATAGTTGCTCCTTC-3'	1280	Análisis de secuencias entre variedades
<i>proPpZAT12</i> <i>SacI KpnI</i>	5'-GAGCTCGAATTAAGAGTTTGTAG-3'	5'-GGTACCGGGAGAGTAGCATCAAG-3'	1861	

#### 3.5.2. Obtención de moldes adecuados para la amplificación de fragmentos de interés

##### 3.5.2.1. Extracciones de ADN genómico de hojas de *P. persica* y *A. thaliana*

Se utilizó el método de Bromuro de Cetil Trietil Amonio (CTAB) modificado (Alaei y col., 2009). Así, se homogeneizaron 500 mg de hojas en N<sub>2</sub>(l) hasta obtener un polvo fino, transfiriéndose luego a un tubo de 1,5 ml. Se agregaron 600 µl de buffer de lisis (100 mM Tris-HCl pH=8, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2 % (p/v) CTAB, 1 % (v/v) β-mercaptoetanol). Se homogeneizaron por 2 min los restos de hoja con el buffer de lisis agregado y posteriormente se realizaron 2 ciclos de 30 s de agitación y centrifugación para coleccionar el material. A continuación se incubó a 65 °C durante 15 min. Finalizada la incubación, se agregaron 200 µl de la mezcla cloroformo: alcohol

isoamílico (24:1 v/v) invirtiendo suavemente durante 2 min para que el material entre en contacto con los solventes orgánicos. Luego de una centrifugación de 10 min a 11600 *g*, se transfirió la fase superior a un tubo de 1,5 ml nuevo. La precipitación del ADN se realizó con 800 µl de isopropanol, incubando a -20 °C al menos 1 h. El pellet obtenido luego de centrifugar 15 min a 11600 *g*, se lavó con etanol 70 % (v/v), seguido de una centrifugación a velocidad máxima durante 15 min. El sobrenadante se descartó y se volvió a centrifugar 1 min a velocidad máxima. Finalmente el pellet fue secado al vacío y resuspendido en H<sub>2</sub>O libre de ADNAsas autoclavada.

Se determinó la integridad del ADN genómico obtenido mediante electroforesis en geles de agarosa 1 % (p/v) en SyberSafe.

### **3.5.2.2. Reacción de transcripción reversa para utilizar como molde de PCR para clonados**

Cuando fue necesaria, la reacción de transcripción reversa se realizó con el fin de obtener la primera hebra de ADNc a partir de ARN total. En un tubo de 1,5 ml se agregaron: el volumen de solución de ARN conteniendo 1 ó 3 µg de ARN, 1 µl de mezcla equimolar de dNTPs y 1 µl (2 µg) de oligo(dT), alcanzando hasta un volumen final de 13 µl con H<sub>2</sub>O DEPC. Se incubó la mezcla por 5 min a 65 °C, se transfirió rápidamente a hielo y se agregaron 4 µl de buffer First-Strand 5X (Invitrogen) y 2 µl DTT 0,1 M (Invitrogen). Se incubó 2 min a 42 °C para seguidamente agregar 1 µl (200 U/µl) Superscript II Reverse Transcriptase (transcriptasa reversa) completando el volumen final de 20 µl. Luego se incubó la preparación 50 min a 42 °C para hacer efectiva la síntesis de ADNc.

Finalmente, se inactivó la enzima calentando la mezcla por 15 min a 70 °C. El ADNc obtenido se diluyó al décimo en H<sub>2</sub>O DEPC para ser utilizado como molde en la siguiente PCR.

### **3.5.3. Amplificación de fragmentos de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Debido a la diversidad de fragmentos a generar, distintos moldes, reactivos y condiciones de amplificación fueron utilizados para llevar a cabo los clonados.

Para estrategias de clonado TA, cada reacción se realizó agregando buffer GoTaq 1X (Promega), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de una mezcla equimolar de dNTPs, 2 µM de cada cebador, 0,04 U/µl GoTaq ADN polimerasa (Promega), 0,025 U/µl Pfu ADN polimerasa (Promega), 0,8 µl de molde y H<sub>2</sub>O destilada estéril hasta volumen final de 20 µl. Para estrategias con extremos romos, cada reacción consistió en la mezcla de buffer Phusion 1X (Finnzymes, Thermo), 200 µM de solución equimolar de dNTPs, 2 µM de cada cebador, 0,01 U/µl Phusion ADN polimerasa (Finnzymes, Thermo), 1 µl de molde y H<sub>2</sub>O destilada estéril hasta volumen final de 20 µl.

En cuanto a los protocolos de temperatura utilizados, en general se procedió a la desnaturalización inicial de los moldes aplicando 2 min a 94 °C para ADNc o 5 min a 95 °C al utilizar

ADN genómico. En el caso de utilizar la enzima Phusion, este paso se llevó a cabo a 98 °C por 30 s. Luego, la etapa de ciclado consistió en la repetición de: 30 s de desnaturalización a 96 °C o 15 s a 98 °C al utilizar Phusion, 45 s a la temperatura de hibridación de cebadores (variable según el par de oligonucleótidos) y la elongación de los productos a 72 °C por tiempo dependiente de la longitud de los amplicones (generalmente 1 min por 1 kb de largo). Finalmente y en todos los casos, se aplicó un ciclo de extensión final variable de 5 a 10 min a 72 °C.

Una vez culminada la reacción de PCR y con el fin de verificar la obtención del producto esperado, se llevaron a cabo electroforesis en geles de agarosa 1-2 % (p/v) en SyberSafe.

### 3.5.4. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Cuando fue necesario, el fragmento de interés se recuperó de un gel de agarosa cortando la banda correspondiente. Luego, el mismo se purificó utilizando el GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. El éxito de la purificación se verificó y su concentración se estimó sembrando el producto obtenido en un gel de agarosa 1-2 % (p/v) en presencia de SyberSafe y el marcador de peso molecular correspondiente.

### 3.5.5. Vectores de clonado y subclonado

Cuando la estrategia elegida fue clonado TA, se utilizó el vector pGEM-T Easy (Promega; *bla+*, 3018 pb, *ori* f1, *lacZ* (SMC), *amp<sup>r</sup>*), plásmido linealizado con *EcoRV* y con timidinas agregadas en los extremos 3'. Alternativamente, el vector plasmídico pBluescript II SK(-) (pBIISK; 2958 pb, *ori* f1, *lacZ* (SMC), *amp<sup>r</sup>*), linealizado con *EcoRV* o *SmaI* fue usado para clonados con extremos romos.

Según el propósito, fue necesario emplear diversos vectores de llegada, con sus características para los amplicones de interés. Se detallan en la tabla 3.10.

**Tabla 3.10 Vectores de subclonado**

Amplicones				Ensayo	Vector de llegada	Características
<i>CspA</i> <i>SacI</i> <i>HindIII</i>	<i>AtTRAF</i> <i>SacI</i> <i>EcoRI</i>	<i>PpTRAF</i> <i>SacI</i> <i>BamHI</i>	<i>PpTRAF</i> <i>SacI NcoI</i> <b>CFP</b> <i>NcoI PstI</i>	Complementaciones funcionales en <i>E. coli</i>	<b>pBluescript II SK(-)</b> <i>amp<sup>R</sup></i>	Vector inducible Promotor <i>plac</i>
<i>AtTRAF</i> <i>SpeI NcoI</i>		<i>PpTRAF</i> <i>SpeI NcoI</i>		Localización subcelular	<b>pAN119 ER-cb</b> <i>bar<sup>R</sup></i> (Nelson y col., 2007)	Vector binario para fusión a CFP Promotor CaMV d35S Terminador 3'ocs
<i>PpZAT12</i> <i>BamHI Sall</i>	<i>AtTRAF</i> <i>XbaI EcoRI</i>	<i>AtZAT12</i> <i>BamHI PstI</i>		Transformaciones vegetales (Floral dip)	<b>pGREENII</b> <i>kan<sup>R</sup></i>	Vector binario Promotor CaMV 35S Terminador 3'ocs
<i>proPpZAT12</i> <i>SacI KpnI</i>		<i>proPpTRAF</i> <i>MunI SmaI</i>		Clonado. Análisis de secuencias entre variedades	<b>pBluescript II SK(-)</b> <i>amp<sup>R</sup></i>	Vector inducible Promotor <i>plac</i> (no utilizadas para esta finalidad)



### 3.5.6. Reacciones de ligación de insertos en vectores

Las reacciones de ligación se realizaron utilizando para cada una: buffer de ligación 1X (Promega), 50 ng del vector de clonado, 1 µl (3 U) de la enzima T4 ADN ligasa (Promega) y volumen de solución del fragmento de ADN a clonar tal que la relación molecular inserto/vector fuese 3/1 ó 6/1 (para pGEM-T Easy y pBlISK(-), respectivamente). Las diferentes mezclas se incubaron durante una noche a temperatura ambiente. Finalmente, se almacenaron a -20 °C.

### 3.5.7. Obtención de plásmidos recombinantes y verificación de la presencia de inserto

#### 3.5.7.1. Selección de transformantes positivos

Al utilizar como vectores para clonado a los plásmidos pGEM-T Easy y pBluescript II SK(-), la selección de transformantes positivos se realizó por comparación visual de colonias blancas y azules, siendo las primeras las candidatas a poseer las construcciones recombinantes. Para todos los vectores de llegada, se utilizó el antibiótico correspondiente como marcador de selección.

#### 3.5.7.2. Identificación de plásmidos recombinantes por PCR colonia

Las colonias blancas fueron sometidas a reacciones en cadena de la polimerasa (PCR por su denominación en inglés). Especialmente, se llevaron a cabo reacciones de PCR colonia. Cada reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl conteniendo buffer Taq 1X (Invitrogen), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de una mezcla equimolar de dNTPs, 2 µM de cada cebador, 0,0065 U/µl Taq ADN polimerasa (Invitrogen) y H<sub>2</sub>O destilada estéril en cantidad suficiente para completar 19 µl. Finalmente, se agregó un inóculo de cada colonia (tomado con palillo estéril) a 10-50 µl de H<sub>2</sub>O estéril para luego adicionar 1 µl de esta suspensión como molde.

Cada reacción de PCR consistió en una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguida de 40 ciclos de: 30 s a 95 °C (desnaturalización), 15 s a la temperatura específica de hibridación del correspondiente par de cebadores y una etapa de elongación a 72 °C cuyo tiempo depende del largo del fragmento (1 min cada 1 kb de longitud). Finalmente, un ciclo de extensión final de 5 min a 72 °C. Se realizaron los correspondientes controles de la reacción de amplificación. Los resultados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

#### 3.5.7.3. Extracción de ADN plasmídico

La preparación de ADN plasmídico se llevó a cabo utilizando columnas QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Las colonias blancas se utilizaron para inocular 3 ml de LB en presencia de 100 µg/ml ampicilina y los cultivos se incubaron durante toda la noche a 37 °C.

El día siguiente, se centrifugó cada cultivo durante 3 min a 2000 g. El pellet se resuspendió en 100 µl de solución de lisis 1 (25 mM Tris-HCl pH=8, 10 mM EDTA, 50 mM glucosa). Se agitó

vigorosamente, se transfirió a un baño de hielo en el que se incubó 5 min, se agregaron 200 µl de solución de lisis 2 (0,2 N NaOH, 1 % (p/v) SDS) y se mezcló suavemente por inversión. Luego, se agregaron 150 µl de solución de lisis 3 (3 M KAc, 1,15 M HAc), se agitó vigorosamente, se incubó por 5 min en hielo, se centrifugó durante 5 min a máxima velocidad y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1,5 ml estéril conteniendo 500 µl de 6 M KI y 40 µl de 3 M NaAc pH=5,5. Luego, se transfirió todo el volumen a una columna QIAprep y se centrifugó durante 1 min a máxima velocidad. Se descartó el eluido y se lavó la columna con 750 µl de etanol al 80 % (v/v). Por último, se agregaron 50-100 µl de H<sub>2</sub>O PCR y se centrifugó 1 min a máxima velocidad.

Finalmente, las extracciones fueron verificadas y la concentración de los plásmidos estimada por electroforesis en gel de agarosa 1-2 % (p/v) en presencia de SyberSafe.

#### **3.5.7.4. Identificación de plásmidos recombinantes por análisis de restricción**

Se extrajeron plásmidos de los clones positivos. Adicionalmente, los mismos fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes, de acuerdo al diseño particular de la construcción en cuestión. Cada reacción de digestión se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante (Promega). Los productos de restricción se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1-2 % (p/v) en buffer de corrida TBE en presencia de SyberSafe.

#### **3.5.7.5. Secuenciación de plásmidos recombinantes**

El ADN plasmídico, verificado por restricción y PCR colonia, fue secuenciado a través del servicio Macrogen Inc. (Korea) mediante el método que utiliza el terminador Big Dye TM con el secuenciador 3730XL DNAanalyser. Según el caso, se utilizaron cebadores universales (para pGEM-T Easy, T7 promoter y SP6; para pBluescript II SK(-), T7 promoter y T3) o específicos de los fragmentos clonados. Con la finalidad de verificar la arquitectura del plásmido recombinante, se introdujeron la secuencia teórica junto a las secuencias obtenidas por secuenciación en el software SeqMan (DNASTAR, Lasergene) que permite su ensamblado y la visualización de cromatogramas. Una vez obtenido y verificado a nivel de secuencia el plásmido deseado, se almacenaron gliceroles de la cepa portadora del mismo para conservar la construcción recombinante (20 % (v/v) de glicerol).

#### **3.5.8. Transformación química de células competentes de *E. coli* DH5α**

Las células competentes de *E. coli* DH5α fueron obtenidas de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook y Russell (2001) utilizando cloruro de calcio. Se inoculan 3 ml de medio LB líquido con colonias de *E. coli* desde placa y se incuban ON a 37 °C con agitación de 200 rpm. Al día siguiente se practica una dilución 1/100 tomando una alícuota del cultivo saturado. Se dejan

crecer las bacterias (a 37 °C, 200 rpm) hasta alcanzar una DO cercana a 0,5. Luego, se centrifuga 1 ml de cultivo bacteriano por 5 min a 5000 rpm, se descarta el sobrenadante y se lava el pellet con 500 µl de 0,1 M CaCl<sub>2</sub> mediante resuspensión suave. Se centrifuga nuevamente 5 min a 5000 rpm, se elimina el sobrenadante y se resuspende suavemente con 100 µl de 0,1 M CaCl<sub>2</sub> en hielo. De esta manera, se logra obtener bacterias competentes propensas para transformación química con CaCl<sub>2</sub>. Para la transformación en sí, se mezclan las células competentes con cantidad variable de plásmido o mezcla de ligación y se procede a incubar: 1 h en hielo, 90 s a 42 °C, 2 min en hielo y al menos 1 h a 37 °C luego de adicionar 1 ml de LB líquido estéril. Finalmente, se centrifugan las células 5 min a 5000 rpm y se siembran con espátula de Drigalski en placa de LB agar suplementada para selección de transformantes. La placa se incubó durante toda la noche a 37 °C.

### **3.6. Análisis comparativos de la estructura primaria de secuencias codificantes y regulatorias de los genes *PpZAT12* y *PpTRAF* provenientes de las variedades en estudio**

Al resultar de interés conocer la variabilidad a nivel de secuencia genómica entre los cultivares en estudio y para los loci de trabajo de la presente tesis, se procedió al clonado, secuenciación y comparación de ADN codificantes y secuencias upstream regulatorias a partir de muestras provenientes de los mismos. Inicialmente, se analizó la calidad de las secuencias obtenidas en el software SeqMan (DNASTAR, Lasergene) respecto a la secuencia teórica esperada (cabe destacarse que el genoma de duraznero fue secuenciado a partir de ADN genómico de la variedad Lovell). Luego, se procedió al alineamiento en Clustal Omega (Sievers y col., 2011).

### **3.7. Determinación de la localización subcelular de *PpTRAF* y *AtTRAF***

Es de interés profundizar en la funcionalidad de las proteínas desconocidas *PpTRAF* y *AtTRAF*, por lo que consideramos determinar su localización subcelular. Se procedió a subclonar los ADNc codificantes de *PpTRAF* y *AtTRAF*, carentes del codón de terminación traduccional, para lograr la fusión al reportero fluorescente CFP en el vector binario ER-cb (CD3-954, Nelson y col., 2007). Por otro lado, se utilizó como control de localización de CFP, el mismo vector ER-cb modificado para producir el marcador fluorescente sin péptidos que afecten su localización. Luego de verificarse la obtención de los plásmidos recombinantes deseados (*ER-cb-PpTRAF*, *ER-cb-AtTRAF* y *ER-cb modificado*), se aislaron y transformaron a células de *A. tumefaciens* GV3101.

#### **3.7.1. Preparación de células competentes de *A. tumefaciens* GV3101**

Se partió de una colonia aislada de *A. tumefaciens* cepa GV3101 (disponible en el laboratorio) y se inició con ésta un cultivo en 5 ml de medio LB suplementado con 100 µg/µl rifampicina, 5 µg/µl tetraciclina. El cultivo se incubó a 28 °C con agitación de 150 rpm durante toda

la noche. Se inocularon 3 ml de cultivo saturado en 200 ml de LB fresco suplementado con los mismos antibióticos. Se incubó este cultivo por 4 h a 28 °C y 150 rpm. Se centrifugó el cultivo 20 min a 4200 rpm y 4 °C. Luego de descartar el sobrenadante, se resuspendieron las células en 10 ml de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH=8, 1 mM EDTA) preenfriado estéril. Se centrifugó la suspensión 20 min a 4200 rpm y 4 °C. Se resuspendió el pellet celular en 5 ml LB líquido estéril y se alicuotaron 250 µl de suspensión en diferentes tubos para almacenarlos a -80 °C.

### 3.7.2. Transformación química de células competentes de *A. tumefaciens* GV3101

Se procedió a transformar los plásmidos ER-cb modificado, ER-cb-*PpTRAF*, ER-cb-*AtTRAF* y ER-yb (CD3-953), utilizado como co-marcador, en células competentes de *A. tumefaciens* GV3101 para la posterior agroinfiltración de plantas. Las células competentes se incubaron con 4 µg de cada plásmido durante 5 min en hielo, 5 min en N<sub>2</sub>(l) y 5 min a 37 °C. Luego se agregó 1 ml de LB fresco y se incubó al menos 1 h a 30 °C para permitir la recuperación de transformantes. Se centrifugaron las células a 6000 rpm, se retiró el sobrenadante y se sembraron en placas de LB agar con 100 µg/µl rifampicina, 5 µg/µl tetraciclina y 50 µg/µl kanamicina (marcador de selección). Las placas se incubaron 2 d a 28 °C hasta aparición de colonias transformantes. En todos los casos, se efectuó PCR colonia para comprobar la presencia de los plásmidos de interés en *A. tumefaciens* GV3101. Se almacenaron a -80 °C, glicerolos de las cepas construidas.

### 3.7.3. Agrotransformación transitoria de hojas de *Nicotiana benthamiana*

El presente método permite la expresión de proteínas de forma transitoria mediante infiltración de diferentes suspensiones celulares de *A. tumefaciens*, una por construcción deseada, en hojas de *N. benthamiana*. Se realizó de acuerdo a las especificaciones de Voinett y col. (2003).

Se prepararon cultivos de 3 ml de *A. tumefaciens* GV3101 portadoras de las construcciones de interés (LB fresco con los antibióticos rifampicina, tetraciclina y kanamicina) y se dejaron crecer por 24 ó 48 h a 28 °C y 150 rpm. Al día siguiente se practicaron diluciones 1/100 de los diferentes cultivos saturados en 100 ml de medio LB fresco, suplementado con antibióticos. Luego de 16 h a 28 °C y 150 rpm, se centrifugaron los cultivos por 5 min a 3500 rpm y se resuspendieron en 1 ml de buffer de resuspensión RB (10 mM MES pH=5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 µM acetosiringona en DMSO). Posteriormente, se armó cantidad suficiente de resuspensión celular en buffer RB tal que su DO<sub>600nm</sub> sea de 0,5 y según la cantidad de hojas a infiltrar, se adicionó 0,1 µM acetosiringona y se incubó con agitación lenta a temperatura ambiente y en oscuridad por al menos 2 h.

Transcurrida la incubación, se prepararon mezclas de *A. tumefaciens*/ER-cb sin péptido señal, *A. tumefaciens*/ER-cb-*PpTRAF* o *A. tumefaciens*/ER-cb-*AtTRAF* con cantidades equivalentes

de *A. tumefaciens*/ER-yb (coinfiltración). Luego, se recolectó cada mezcla en jeringas de 1 ml sin aguja y se coinfiltraron hojas verdes y desarrolladas de *N. benthamiana* de aproximadamente 1 mes de cultivo. La infiltración se realizó ejerciendo presión en la cara abaxial con la jeringa e inyectando suavemente la suspensión, verificando su movimiento a través del tejido foliar.

Las plantas transformadas fueron mantenidas en cámara a 24 °C y regadas normalmente. A partir de 48 h después de la agroinfiltración, se puso a punto la observación de la expresión de las proteínas de interés, por detección de las señales fluorescentes correspondientes. Las muestras de hojas enteras, sin daños debidos a la infiltración, se montaron en portaobjetos con 10 % (v/v) glicerol, tal que se visualice la cara abaxial infiltrada.

#### **3.7.4. Agrotransformación estable de óvulos de *A. thaliana* (Floral dip)**

A modo de proveer otro sistema biológico a las observaciones recopiladas en la especie *N. benthamiana*, se procedió a sumar evidencias con los constructos de interés, en la especie modelo *A. thaliana* mediante transformación estable por el método de Floral dip (Clough y Bent, 1998). Los plásmidos binarios utilizados se pueden observar en la tabla 3.10. Se inocularon con ansa 5 ml de medio LB suplementado con rifampicina, tetraciclina y kanamicina con las cepas de *A. tumefaciens* GV3101 de interés. Se incubaron a 28 °C en agitación a 180 rpm, hasta saturación. A partir de estos pre-inóculos saturados, se realizó una dilución 1/100 a volumen final 100 ml y se creció a 28 °C y 180 rpm hasta alcanzar  $DO_{600nm}=0,8-1$ . Se centrifugaron las células a 4500 rpm a 4 °C durante 20 min y se resuspendieron en medio de infiltración (5 % (p/v) sacarosa y 0,05 % (v/v) Silwet-L77) a  $DO_{600nm}=0,5$  final. Se sumergieron por completo flores cerradas en solución de infiltración durante 1 min. Las macetas se colocaron horizontales en una bandeja cubierta con Saran Wrap y se las mantuvo en cámara a 24 °C durante 2 d. Seguido, se continuó con el crecimiento normal hasta cosechar semillas.

La obtención de líneas transgénicas de interés se realizó sembrando las semillas obtenidas y seleccionando individuos transformantes por su crecimiento en el herbicida glufosinato (5 mg/L). Con diferentes plantas resistentes en estado de heterocigosis de la primera generación, se procedió a observar señales fluorescentes en distintos órganos.

#### **3.7.5. Visualización de proteínas fluorescentes por microscopía**

Las muestras de hojas de *N. benthamiana* sin transformar y con expresión transitoria, así como también plántulas de *A. thaliana* control y transformantes, se montaron en portaobjetos en fresco y se analizaron en dos sistemas de microscopía. Se utilizó un microscopio confocal invertido con sistema motorizado y óptica DIC/Nomarski, Nikon Modelo Eclipse TE-2000-E2, de óptica

corregida al infinito. Una combinación determinada de canal de excitación y filtros para visualizar los fluoróforos CFP (excitación a 457,9 nm y emisión a 550±30 nm) e YFP (514,5 nm y 515±30 nm, respectivamente) fue seteada para las observaciones. Adicionalmente, se realizaron visualizaciones mediante Microscopía Confocal de Barrido Laser (LSCM, del inglés Laser Scanning Confocal Microscopy), en un microscopio ZEISS LSM880. En este caso, CFP se excitó a 458 nm (línea del láser ión de Argón) y la fluorescencia fue detectada a 465 nm - 570 nm mientras que YFP, utilizando la línea 514 nm del laser y de 524 nm - 570 nm, respectivamente. Análisis posteriores de las imágenes obtenidas se realizacon en los softwares de los fabricantes (EZ-C1 FreeViewer, Nikon Corporation; ZEN 2012, Carl Zeiss Microscopy) y utilizando el software FIJI (Schindelin y col., 2012).

### **3.7.6. Extracción de proteínas totales e inmunodetección (Western blot) del producto de fusión**

Con el fin de detectar específicamente las proteínas recombinantes inducidas, se llevaron a cabo inmunodetecciones con anticuerpos primarios anti-CFP, cedidos por las Dras. Cintia Arias y Mariana Saigo de nuestro laboratorio. Se realizaron extracciones de proteínas solubles totales, a partir de muestras de hojas de *N. benthamiana* transformadas y no transformadas (sección 3.12.2.1). Las muestras de proteínas totales fueron cuantificadas espectrofotométricamente por el método de Bradford (1976) utilizando el reactivo Protein Assay (Biorad) y BSA como testigo. Luego, 15 ug de cada muestra fueron expuestos a electroforesis desnaturalizante con SDS.

Una vez culminada la electroforesis SDS-PAGE (incluido el marcador de peso molecular: PageRuler Prestained 10-180 kDa Protein Ladder, Thermo Scientific) se procedió a realizar electrotransferencia de proteínas separadas por tamaño molecular a membranas de nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham). Esto se llevó a cabo utilizando la celda Trans-Blot SD Semi-Dry de Biorad durante 20 min a 20 V. La membrana luego se bloqueó por 1 h con 5 % (p/v) leche en polvo descremada en buffer TBS (10 mM Tris-HCl pH=7,5, 150 mM NaCl) y se incubó con el anticuerpo primario específico durante toda la noche, con agitación suave y temperaturas cercanas a 4 °C. Posteriormente, se retiraron los anticuerpos y se lavó la membrana tres veces con TBS durante 10 min. Se incubó 1 h con anticuerpo secundario (anti IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina, Sigma) y se repitieron 3 veces los lavados con TBS.

Finalmente, la membrana se reveló incubando con 20 µl de 50 mg/ml NBT y 10 µl 50 mg/ml de BCIP en 10 ml de buffer sustrato (100 mM Tris-HCl pH=9,5, 100 mM NaCl y 5 mM MgCl<sub>2</sub>). La reacción se desarrolló en oscuridad hasta aparición de bandas púrpuras y se detuvo por lavados sucesivos con agua destilada. La membrana se secó a temperatura ambiente y se fotografió.

### 3.8. Ensayos de complementación funcional de *PpTRAF* y *AtTRAF* en cepas especiales de *E. coli*

Se realizaron ensayos de complementación en células de *E. coli* especiales para evaluar el posible rol *in vivo* de los ADN codificantes *PpTRAF* y *AtTRAF*. Se utilizaron las cepas RL211 (cedida por el Dr. R. Landick, Landick y col., 1990) para probar la actividad helicasa y BX04 (cedida por los Dres. M. Inouye y S. Phadtare) para evaluar actividad ARN chaperona en frío. La cepa RL211 permite evaluar la antiterminación de la transcripción del gen *cat*, indispensable para la resistencia de la misma al cloranfenicol. Por otro lado, las células BX04 mutantes (Xia y col., 2001) carecen de la funcionalidad de cuatro proteínas de choque por frío (*Csp*) lo que genera su sensibilidad al frío.

Se procedió a subclonar en fase los insertos correspondientes a *CspA* (control positivo del ensayo, provisto por los Dres. M. Inouye y S. Phadtare), *PpTRAF* y *AtTRAF* en pBIISK(-). Una vez realizadas las verificaciones correspondientes, los plásmidos recombinantes (control positivo, control negativo -pBIISK(-) vacío-, *PpTRAF*, *PpTRAF-CFP* y *AtTRAF*) se introdujeron en las cepas de trabajo RL211 y BX04 por transformación química. Se verificó la construcción de las cepas complementadas por PCR colonia.

#### 3.8.1. Análisis de supervivencia de las cepas transformadas

Las bacterias transformadas fueron cultivadas a saturación en LB líquido con los correspondientes antibióticos para permitir la presencia del plásmido recombinante (ampicilina) y el crecimiento de la cepa en el caso de BX04 (kanamicina). Luego, cada cepa construida se llevó a  $DO_{600nm}=1$ . Seguido, se realizaron diluciones seriadas al décimo y finalmente se inocularon “puntos” de 5  $\mu$ l de cultivo ordenadamente en placas con LB agar. Para las cepas derivadas de RL211, el ensayo fue realizado en placas suplementadas con ampicilina, 0,5-1 mM IPTG, con y sin cloranfenicol, que se dejaron crecer a 37 °C. En cambio, para aquellas con origen en BX04, se utilizaron placas con kanamicina, ampicilina y 0,5-1 mM IPTG, expuestas a 37 °C (control) y 18 °C.

El crecimiento de los spots fue inspeccionado diariamente. Los resultados del ensayo en la cepa RL211 se obtuvieron el día después de la inoculación, mientras que el crecimiento a 18 °C necesario para el ensayo en BX04 es lentificado sustancialmente extiéndose a 3-17 d.

Adicionalmente, la cepa mutante BX04 permite evaluar la complementación en frío al poseer un defecto reportado en la división celular en bajas temperaturas, pudiéndose observar células bacterianas alargadas al microscopio de campo claro. Por ello, se visualizaron células BX04/pBIISK(-), BX04-pBIISK(-)-*CspA*, BX04-pBIISK(-)-*PpTRAF*, BX04-pBIISK(-)-*AtTRAF* y de la cepa mutante, crecidas en medio LB líquido por 5 d a 18 °C o por 16 h a 37 °C (controles). Se centrifugó 1 ml de cultivo saturado durante 4 min a 4000 rpm y se resuspendieron las células suavemente en

buffer PBS estéril (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,4) para colocar 5 µl de esta suspensión sobre portaobjetos. Finalmente se compararon cualitativamente. Un caso especial fue la complementación con el producto de fusión BX04-pBIISK(-)-PpTRAF-CFP, para el cual se procedió como se describió y luego se inmunodetectó la fusión esperada y se visualizaron células por microscopia de fluorescencia (secciones 3.7.5 y 3.7.6).

Los ensayos se repitieron para verificar nuevamente los resultados obtenidos.

### **3.8.2. Verificación de la presencia de las proteínas PpTRAF y AtTRAF en las cepas transformadas**

A modo de visualizar la traducción de las proteínas PpTRAF y AtTRAF en el sistema bacteriano de los ensayos, nos propusimos evaluar su expresión diferencial en las cepas construidas RL211-pBIISK-AtTRAF y RL211/ y BX04/pBIISK-PpTRAF respecto a controles negativo y positivo mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Se tomaron 500 µl de cada cultivo DO<sub>600nm</sub>=1 de trabajo para el ensayo en placa, se pelletearon 5 min a 5000 rpm y se resuspendieron en buffer de lisis celular (100 mM Tris-HCl pH=8, 200 µM inhibidor de proteasas PMSF). Se centrifugaron las muestras 10 min a velocidad máxima y se cuantificaron espectrofotométricamente por el método de Bradford (1976) utilizando el reactivo Protein Assay (Biorad) y albúmina sérica bovina como testigo.

Las electroforesis se llevaron a cabo utilizando la celda mini-PROTEAN III de Biorad y el sistema discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970). Las concentraciones finales de acrilamida para los geles fueron 15 % (p/v) para el gel de separación y 5 % (p/v) para el gel de concentración. Las muestras comprendiendo 20 µg de proteínas totales fueron diluidas 1/5 en buffer de siembra (60 mM Tris-HCl pH=6,8, 25 % (v/v) glicerol, 2 % (p/v) SDS, 0,5 % (v/v) 2-mercaptoetanol y 0,1 % (p/v) azul de bromofenol) y se calentaron a 100 °C durante 5 min antes de ser sembradas en el gel. Se utilizó un marcador de peso molecular de bajo rango (Low range, Biorad). La corrida electroforética se realizó a voltaje constante de 110 mV y fue inspeccionada gracias al colorante de frente. Las proteínas fueron reveladas por tinción con azul de Coomassie (Smith, 1984) o transferidas a una membrana de nitrocelulosa para Western blotting.

### **3.9. Obtención de genotipos mutantes de AtTRAF y AtZAT12 en A. thaliana**

#### **3.9.1. Líneas mutantes comerciales adquiridas**

Para la caracterización funcional de AtTRAF y AtZAT12, un recurso al que se recurrió fue explorar la disponibilidad de líneas comerciales mutantes en la colección Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC, <https://abrc.osu.edu>). Se seleccionaron las líneas SALK\_125714, mutante



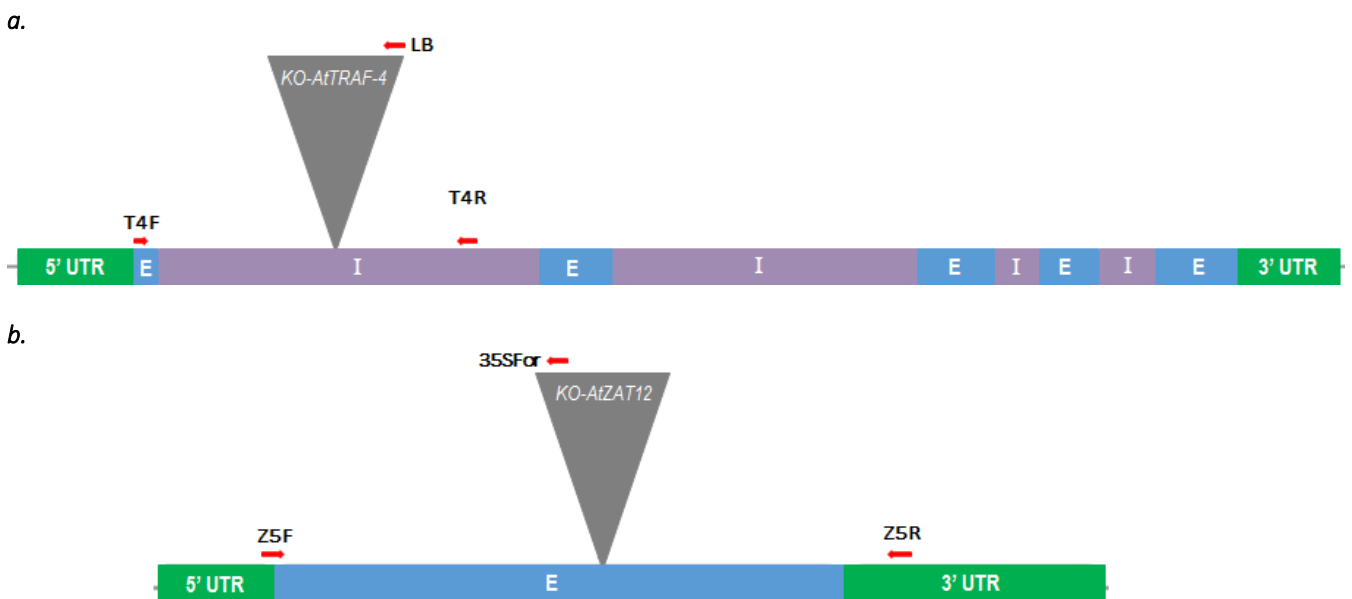
por inserción de ADN-T en el primer intrón del gen *AtTRAF* (de aquí en más llamada *KO-AtTRAF-4*) y la línea CS352165, con inserción en el único exón de *AtZAT12* (de aquí en más, *KO-AtZAT12*).

### 3.9.2. Verificación de las mutaciones por inserción en estado de homocigosis

Las semillas adquiridas comercialmente fueron cultivadas con el fin de corroborar la inserción de ADN-Ts en estado de homocigosis. La masa correspondiente a 100 mg de hoja fresca de diferentes individuos de ambas líneas de trabajo fue utilizada para extracciones de ADN genómico (ver sección 3.5.2.1) y posterior chequeo por PCR.

#### 3.9.2.1. Diseño de oligonucleótidos cebadores y PCR para verificar inserción en homocigosis

Según las indicaciones incluidas en la adquisición comercial de semillas mutantes en ABRC, para cada gen de interés, un individuo podría poseer la inserción de ADN-T en uno, ninguno o ambos loci de su genoma diploide. Por ello y para las dos líneas adquiridas, se diseñaron cebadores que flanquean al lugar reportado de inserción del ADN-T. Por otro lado, se utilizaron cebadores universales como LB que hibrida sobre el Borde Izquierdo del ADN-T de la línea SALK de *AtTRAF* y 35SFor, para el mismo fin en la línea GABI-KAT de *AtZAT12*. La figura 3.4 y la tabla 3.11 muestran la ubicación de las inserciones así como especifican secuencias y combinaciones de cebadores para las reacciones de PCR (1 y 2) realizadas y los tamaños esperados.



**Figura 3.4** Esquemas de las regiones génicas de *AtTRAF* (a; 2387 pb) y *AtZAT12* (b; 816 pb). Se visualizan las inserciones de ADN-T esperadas y los cebadores diseñados para la verificación de homocigosis, incluidos aquellos que hibridan en el mismo ADN-T (LB y 35SFor).

**Tabla 3.11 Oligonucleótidos utilizados para verificar homocigosis en inserciones**

Línea	Reacción	Cebador Directo	Cebador Reverso	Amplicón (pb)
<i>KO-AtTRAF-4</i> SALK_125714	1	T4F 5'-TCTAGAGATGGAGACTGCGACT-3'	T4R 5'-CAAAAATTTCCAGCCTCAGC-3'	625
	2	LB 5'-GTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC-3'		358
<i>KO-AtZAT12</i> CS352165	1	Z5F (AtZAT12 BamHI) 5'-GGATCCCAGAAGAAAATGGTTG-3'	Z5R (AtZAT12 PstI) 5'-CTGCAGGAAAAATTCAAAGAATGAG-3'	572
	2		35SFor 5'-GAGGAGCATCGTGAAAAAGA-3'	533

Las mencionadas extracciones de ADN genómico a partir de hojas de diferentes individuos de cada línea, se utilizaron como molde de reacciones de PCR equivalentes a las descritas. Temperatura de hibridación y tiempo de extensión a 72 °C se eligieron según el par de cebadores y el amplicón particular. Se incluyeron dos combinaciones de cebadores para caracterizar individuos de cada línea. Un resultado positivo de la reacción 1, indica la presencia de al menos un alelo salvaje sin inserción de ADN-T (correspondiendo a genotipo salvaje o heterocigota). Para evitar falsos negativos, se utilizaron como molde diluciones seriadas de las muestras de ADN genómico obtenidas. Por otro lado, la reacción 2 permite evaluar la presencia de ADN-T en el ADN genómico. Conjuntamente, los resultados de las reacciones 1 y 2, visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa 2 % (p/v), hace posible la identificación de individuos homocigotas.

### 3.9.3. Verificación de los niveles de ARNms *AtTRAF* y *AtZAT12* en líneas mutantes obtenidas

Obtenidos individuos homocigotas en la inserción de ADN-T para ambas líneas, se prosiguió a corroborar el efecto de la inserción genómica sobre los niveles de los transcritos *AtTRAF* y *AtZAT12*. Se realizaron reacciones RT-qPCR como se describió anteriormente, utilizando muestras de hojas adultas de las líneas a caracterizar. Los cebadores utilizados se listan en la tabla 3.8.

### 3.10. Obtención de genotipos sobreexpresantes de *AtTRAF* y *AtZAT12* en *A. thaliana*

Con el fin de generar líneas estables con ganancia de función de *AtTRAF*, *AtZAT12* y *PpZAT12*, se realizó la transformación de óvulos de *A. thaliana* mediada por *A. tumefaciens* GV3101 utilizando la técnica de Floral dip (Clough y Bent, 1998). Los plásmidos binarios utilizados contienen los ADNcs mencionados y poseen su base en pGREENII (tabla 3.10). El protocolo de transformación se puede observar en la sección 3.8.4.

### **3.10.1. Selección de transformantes y verificación del estado de homocigosis**

La obtención de líneas transgénicas sobreexpresantes de *AtTRAF*, *AtZAT12* y *PpZAT12* se realizó seleccionando individuos transformantes por su crecimiento en kanamicina. El estado de homocigosis completa se logró llevando a cabo la selección hasta la tercera generación.

La descendencia obtenida luego de la agrotransformación (T1), fue sembrada en placas de MS-agar con el marcador de selección *in planta* kanamicina, junto a semillas *Col-0* como control. Se identificaron transformantes y fueron trasplantados a nueva(s) placa(s) con antibiótico, para finalmente ser depositadas en tierra donde completaron su ciclo de vida. Las semillas T2 obtenidas de diferentes plantas T1 (distintos eventos de inserción), se expusieron a la misma selección, verificando que la descendencia de cada transformante T1 sea 3:1 en cuanto a la resistencia. Las transformantes T2, de genotipo heterocigota u homocigota para la inserción, se cultivaron hasta madurez y se corroboró el fenotipo de su descendencia T3, seleccionando para trabajos futuros aquellas líneas con una descendencia 100 % resistente al antibiótico, posibilitando la presencia del ADN-T completo integrado en su genoma con la construcción de sobreexpresión deseada.

### **3.10.2. Verificación de niveles de ARNms *AtTRAF*, *AtZAT12* y *PpZAT12* en las correspondientes líneas sobreexpresantes construidas**

Para corroborar la sobreexpresión de los transcriptos de interés en las líneas sobreexpresantes homocigotas, se verificaron sus niveles de ARNm llevando a cabo reacciones de RT-qPCR como se describió previamente, sobre muestras de hojas adultas de las líneas a caracterizar, cultivadas en condiciones normales. Los cebadores y accesos génicos se listan en las tablas 3.8 y 3.9 mientras que el método experimental de RT-qPCR se detalla en la sección 3.4.

### **3.11. Caracterización fenotípica de genotipos mutantes y sobreexpresantes de *AtTRAF*, *AtZAT12* y *PpZAT12***

#### **3.11.1. Evaluación de parámetros de crecimiento cualitativos en condiciones normales**

Desde los inicios de su selección y al proseguir con ella hasta homocigosis, las diferentes líneas transgénicas obtenidas en el presente trabajo fueron evaluadas en cuanto a crecimiento, desarrollo y morfología de sus órganos respecto a plantas *Col-0* cultivadas en paralelo. Esto permitió definir características particulares que identifican a los genotipos de trabajo, asistiendo a la misma selección y generando nuevas hipótesis acerca de los efectos de la ausencia o ganancia de función de los genes en estudio. Se registraron las observaciones fotográficamente.

### **3.11.1.1. Determinación de área de roseta de genotipos reactivos a *AtZAT12* y *PpZAT12***

Se procedió como se indica en el trabajo de Casadevall y col. (2013). Para la cuantificación de área de roseta de los genotipos asociados a los genes *ZAT12*, se obtuvieron fotografías calibradas de rosetas de los genotipos de interés.

Las mediciones se llevaron a cabo en el software ImageJ (Schneider y col., 2012). Los datos obtenidos se analizaron a través de pruebas *t* de Student utilizando el programa SigmaPlot 12.0.

### **3.11.2. Ensayos de elongación de raíz primaria de genotipos relativos a *AtTRAF* en bajas temperaturas y presencia de ABA**

Una vez esterilizadas, semillas *Col-0* y de líneas mutantes y sobreexpresantes de *AtTRAF*, fueron sembradas en MS-agar y estratificadas por tres d. Se transfirieron a condiciones normales de crecimiento y fueron cultivadas por cuatro d adicionales. Luego, al menos 30 plántulas de cada genotipo fueron transferidas cuidadosamente, con palillo estéril y en posición vertical a nuevas placas de cultivo (20 ml de MS-agar). Las mismas se incubaron de manera vertical en la condición control (24 °C, sin tratamiento), en tratamiento con bajas temperaturas (10 °C, luz de 70  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ) o en placas con MS-agar suplementado con 1 ó 5  $\mu\text{M}$  ácido abscísico (ABA) (mantenidas a 24 °C) (Li y col., 2017). Se realizaron medidas día a día de la elongación radicular durante 4 d para las placas mantenidas a 24 °C y durante 11 d para aquellas incubadas a 10 °C, debido a la lentificación de su crecimiento. Finalmente, se adquirieron imágenes de las placas y luego, utilizando el software ImageJ (Schneider y col., 2012), se midieron las longitudes de raíz primaria de cada planta tomando como referencia las marcas realizadas.

#### **3.11.2.1. Determinación de longitudes y velocidades de elongación radicular y análisis estadísticos**

Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante un análisis de la varianza a un factor (ANOVA) y pruebas *t* de Student y las diferencias significativas mínimas se calcularon por los tests de Fisher y Bonferroni ( $\alpha = 0,05$ ) usando el programa SigmaPlot 12.0.

### **3.11.3. Ensayo de viabilidad de semillas de genotipos relativos a *AtTRAF* en bajas temperaturas**

En placas de cultivo conteniendo 20 ml de MS-agar se sembraron con palillo estéril y en una disposición uniforme, 100 semillas estériles de *A. thaliana* de los distintos genotipos en estudio (se sembraron pooles de semillas cosechados a partir de diferentes individuos). Se estratificaron por 3 d y fueron expuestas a luz de 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  a 24 °C por 1 h. Luego, se retornó a régimen de oscuridad para permitir la germinación y elongación de hipocótilos durante 4 d a 24 °C en el caso del grupo control, o a 10 °C para el grupo en tratamiento. Finalmente, se contaron las

semillas germinadas (hipocotilos) para cada genotipo en cada condición y se realizó un cálculo de frecuencia de germinación:

$$f_{\text{germinación}} = \frac{\text{semillas germinadas}}{\text{total semillas sembradas}}$$

El experimento se repitió en tres oportunidades a partir de las cuales se pudieron promediar las diferentes frecuencias obtenidas para cada genotipo, en cada condición. Adicionalmente, se realizaron estudios con más de una cosecha de los genotipos de interés.

### 3.11.3.1. Análisis estadísticos

Para comparar las frecuencias de germinación entre genotipos se realizaron pruebas *t* de Student con un  $\alpha=0,05$ , utilizando el programa SigmaPlot 12.0.

### 3.12. Evaluación de determinantes moleculares con expresión génica diferencial en genotipos relativos a *AtZAT12* y *PpZAT12*

Con el fin de explorar las diferencias moleculares entre las plantas mutantes y sobreexpresantes de los genes *ZAT12* ortólogos, elegimos trabajar con hojas de roseta adultas de los diferentes genotipos. Seguidamente se realizaron RT-qPCRs sobre genes elegidos, reportados de estar afectados sus niveles de ARNm en sobreexpresantes de *AtZAT12*. Por otro lado, aplicamos un enfoque proteómico para dilucidar las diferencias entre genotipos a nivel peptídico.

#### 3.12.1. Análisis de niveles de transcripto de genes del regulón de *AtZAT12*, en hojas de roseta adultas de los genotipos en estudio

Rizhsky y col., (2004), Vogel y col. (2005) y Davletova y col. (2005b), determinaron el transcriptoma de plántulas del genotipo *35S::AtZAT12* (con 15, 10 y 5 d de edad, respectivamente), identificando numerosos ARNms con expresión modificada por la ganancia de función de *AtZAT12*.

Se decidió evaluar los niveles de ARNm de un grupo de genes incluidos en los sets anteriores, en los genotipos relativos a genes *ZAT12*. Esta elección se basó en la información de expresión en frío y de genotipos relacionados a los factores CBFs, recopilada en la bibliografía citada. Experimentalmente, se procedió mediante RT-qPCR y los transcriptos analizados fueron *AZ13*, *DWF1*, *SOC1*, *NAM*, *PAP1*, *ACO1* y *PMEI* (ver sección 3.4 y tabla 3.8 por códigos y cebadores).

#### 3.12.2. Proteómica diferencial de hojas adultas de los genotipos en estudio

Para explorar las diferencias moleculares a nivel peptídico (proteínas solubles) en las plantas mutantes y sobreexpresantes de los genes *ZAT12* ortólogos, nos propusimos un enfoque proteómico en muestras de hojas de roseta adultas, sin embargo, decidimos tomar muestras de los diferentes genotipos en un mismo estadio de desarrollo: la culminación del desarrollo

vegetativo y el comienzo del proceso de floración (evidenciado por la elongación del tallo floral). Como se describe en resultados, los genotipos sobreexpresantes de *AtZAT12* o *PpZAT12* poseen un retraso importante en desarrollo y floración respecto a *KO-AtZAT12* y el genotipo salvaje *Col-0*.

La toma de muestras se realizó de manera similar a como se describe en la sección 3.4.2.3: se conformaron pools de tres hojas de roseta (las mayores en tamaño) de diferentes individuos en floración, para cada genotipo analizado. Los genotipos de trabajo fueron: *Col-0* (floración aproximada a los 21 d), *KO-AtZAT12* (22 d), *35S::AtZAT12/Col-0* (35 d), *35S::PpZAT12/Col-0* (54 d) y *35S::PpZAT12/KO-AtZAT12* (55 d).

#### **3.12.2.1. Extracción de proteínas solubles totales de hoja y preparación de muestras para LC-MS**

Inicialmente, se conformaron pools de hojas de los genotipos *Col-0*, *KO-AtZAT12*, *35S::AtZAT12/Col-0* y *35S::PpZAT12/KO-AtZAT12*. Se prepararon tres réplicas biológicas, provenientes de hojas de roseta de diferentes individuos. 100 mg de cada pool fue pulverizado en  $N_2(l)$  y homogeneizado en frío con la adición de 1 V de buffer de extracción (50 mM Tris-HCl pH=7, 1 mM EDTA, 0,5 % (v/v) Tritón X-100, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 5 % (p/v) glicerol, 2 mM  $MgCl_2$ , 0,2 mM PMSF y 1 % PVPP). El homogenado se incubó 30 min en hielo y luego se centrifugó a 4 °C durante 20 min a 20000 rpm. El sobrenadante fue transferido a un tubo eppendorf y las proteínas se cuantificaron espectrofotométricamente por el método de Bradford (1976) utilizando el reactivo Protein Assay (Biorad) y albúmina sérica bovina como testigo. Luego, 10  $\mu$ g de cada muestra fueron verificados en electroforesis desnaturizantes en presencia de SDS.

Sobre alícuotas de 60  $\mu$ g de proteínas solubles totales de cada réplica, se realizaron tratamientos de reducción (10 mM DTT, 60 min a 56°C) y alquilación (20 mM iodoacetamida 60 min a temperatura ambiente y en oscuridad). Se precipitaron las proteínas de cada muestra mediante un tratamiento con 1/5 V de 100 % (p/v) TCA durante 2 h a -20 °C seguido de una centrifugación a velocidad máxima por 10 min. Se descartaron sobrenadantes y los pellets remanentes se lavaron con acetona fría 3 veces y se dejó evaporar la acetona residual por 5 min.

#### **3.12.2.2. Cuantificación de péptidos libre de marcado (LFQ, Label-Free Quantification) mediante Cromatografía líquida acoplada a Espectrometría de masa (LC-MS)**

Los pellets obtenidos para las réplicas consideradas fueron enviados al servicio del Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría MALDI-TOF (CEQUIBIEM), Departamento de química biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Se digirieron las muestras con tripsina y se analizaron por LC-MS/MS. Se inyectaron en un cromatógrafo líquido nanoHPLC con columna de fase reversa (Thermo Scientific, modelo EASY-nLC

1000) acoplado a un espectrómetro de masa ESI-Q-Orbitrap con una celda de HCD (High Collision Dissociation), un analizador Orbitrap (Thermo Scientific, modelo Q-Exactive) y un ionizador de Electro Spray (Thermo Scientific, modelo EASY-SPRAY).

Mediante el programa ProteomeDiscoverer (Thermo Scientific) los datos espectrales fueron transformados, cuantificados (en base a áreas espectrales) e identificados. El motor de búsqueda de este programa utilizó la base de *A. thaliana* de Uniprot (actualizada en 10/2016) y fue seteado con parámetros acordes a la preparación de muestras realizada. Se obtuvieron proteínas con los péptidos secuenciados y se recopiló sus datos de PM y pl.

### **3.12.2.3. Normalización y análisis estadísticos para la obtención de péptidos diferencialmente expresados**

Por medio del programa Perseus (Tyanova y col., 2016), los datos proteómicos derivados de ProteomeDiscoverer fueron normalizados y analizados estadísticamente considerando los triplicados de cada muestra/genotipo y aplicando un *t*-test para las siguientes comparaciones: *KO-AtZAT12* vs. *Col-0*, *35S::AtZAT12/Col-0* vs. *Col-0*, *35S::PpZAT12/KO-AtZAT12* vs. *KO-AtZAT12*, *35S::PpZAT12/KO-AtZAT12* vs. *Col-0*, *35S::AtZAT12/Col-0* vs. *KO-AtZAT12* y *35S::PpZAT12/KO-AtZAT12* vs. *35S::AtZAT12/Col-0*. La razón de cambio en el nivel de cada péptido fue reportada como el promedio aritmético del logaritmo en base dos ( $\log_2$  fold change) para cada triplicado.

Se determinaron así los péptidos estadística ( $p < 0.05$ ) y diferencialmente ( $\log_2$  fold change  $> 2$  ó  $< -2$ ) expresados en genotipos relativos a genes *ZAT12* (PEDs) en al menos una de las primeras cuatro comparaciones realizadas. La información correspondiente a las últimas dos comparaciones, se incorporó a los péptidos anteriores.

Del total de PEDs, se obtuvieron subsets *KO-AtZAT12\_PEDs*, *35S::AtZAT12\_PEDs* y *35S::PpZAT12\_PEDs* (incluyendo las comparaciones *35S::PpZAT12/KO-AtZAT12* vs. *KO-AtZAT12* y *35S::PpZAT12/KO-AtZAT12* vs. *Col-0* que además no estén afectados en *KO-AtZAT12* vs. *Col-0*).

### **3.12.2.4. Análisis de enriquecimiento de términos GO, recopilación de anotaciones funcionales y contraste de los ZAT12\_PEDs identificados con otras bases de datos ómicas**

Para caracterizar los diferentes grupos de PEDs, se obtuvieron anotaciones de vías de MapMan (Thimm y col., 2004), y se analizó el enriquecimiento de GOs (SEA, Singular Enrichment Analysis) en AgriGO (<http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/>; Tian y col., 2017).

Adicionalmente, se consultaron la base PPDB (Plant Proteome DataBase; <http://pespdb.tc.cornell.edu/>; Sun y col., 2008a) en búsqueda de información proteómica en *A. thaliana* y publicaciones con proteomas diferenciales frente al estímulo de bajas temperaturas

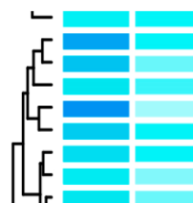
(Kawamura y Uemura, 2003; Amme y col., 2006; Goulas y col., 2006; Minami y col., 2009; Li y col., 2011; Li y col., 2012; Takahashi y col., 2016). De manera adicional, se recopiló información de pertenencia a regulones de frío (Boyce y col., 2003; Pons y col., 2014) y de expresión a nivel de transcripto relativa a los mencionados enfoques transcriptómicos de genotipos *35S::ZAT12* y en genotipos salvajes en condiciones de estrés por frío, incluidos ExPath 2.0 (<http://expath.itps.ncku.edu.tw/>; Chien y col., 2015) y ColdArrayDB (<http://cold.stanford.edu/cgi-bin/data.cgi>; Vogel y col., 2005). Estos datos fueron muy útiles a la hora de contrastar nuestra información con la reportada en las mencionadas condiciones.

### **3.12.3. Delimitación del posible regulón de *PpZAT12*. Análisis de la información relativa a su expresión en frutos**

Con el interés de ahondar en el conocimiento de los genes blanco de *PpZAT12* en duraznero y en la conservación de las redes génicas del mismo respecto a *AtZAT12*, nos propusimos identificar ortólogos a los determinantes con expresión modificada a nivel transcripcional y/o traduccional en los genotipos transgénicos con *PpZAT12*. Contrastamos este set de genes con las bases de genes de frutos (Gismondi y col., enviado) y con la base de determinantes construida en la presente tesis (ver capítulo 4), para conocer cuáles poseen expresión en poscosecha en frutos.



*Caracterización in silico de determinantes moleculares  
con posible funcionalidad protectora frente  
al daño por frío en duraznos*



## **4. Caracterización in silico de determinantes moleculares con posible funcionalidad protectora frente al daño por frío en duraznos**

### **4.1. Introducción y objetivos**

El presente trabajo es parte de una línea de investigación cuyo propósito es identificar y caracterizar determinantes moleculares involucrados en la protección frente al CI en duraznos y en el futuro, generar herramientas para identificar variedades con menor susceptibilidad. Con estos fines, se aplicaron en nuestro laboratorio diversas técnicas ómicas con variados enfoques, que proveyeron múltiples evidencias moleculares de los procesos subyacentes a las condiciones poscosecha y al tratamiento térmico, estrategia exitosa en la prevención de los trastornos asociados al CI en duraznos.

En este contexto se enmarca el comienzo de la presente tesis. Para avanzar en la búsqueda de evidencias funcionales, relativas a los determinantes detectados, ha sido de interés recopilar anotaciones y reportes existentes en frutas y otros organismos modelo, contrastar la información de expresión obtenida y profundizar en su conocimiento sumando información *in silico*.

Considerando que los efectos benéficos del tratamiento térmico frente al daño por frío podrían deberse (entre otros) a la modificación de las tasas de transcripción de los genes identificados, un aspecto de interés sobre el cual ahondar es el conocimiento de los requisitos moleculares que poseen para su expresión génica a este nivel. Para ello, este trabajo propone un análisis *in silico* de las secuencias upstream de genes con expresión génica diferencial frente al tratamiento térmico en duraznos. Estos estudios comprenden detección y análisis de la presencia de motivos lineales en las mencionadas secuencias, que podrían suponer sitios de unión funcionales para FTs de durazno, con roles de importancia en los procesos biológicos de interés.

### **4.2. Objetivos específicos**

Construir una base de determinantes moleculares con respuesta al tratamiento térmico y posible funcionalidad protectora frente al daño por frío en duraznos

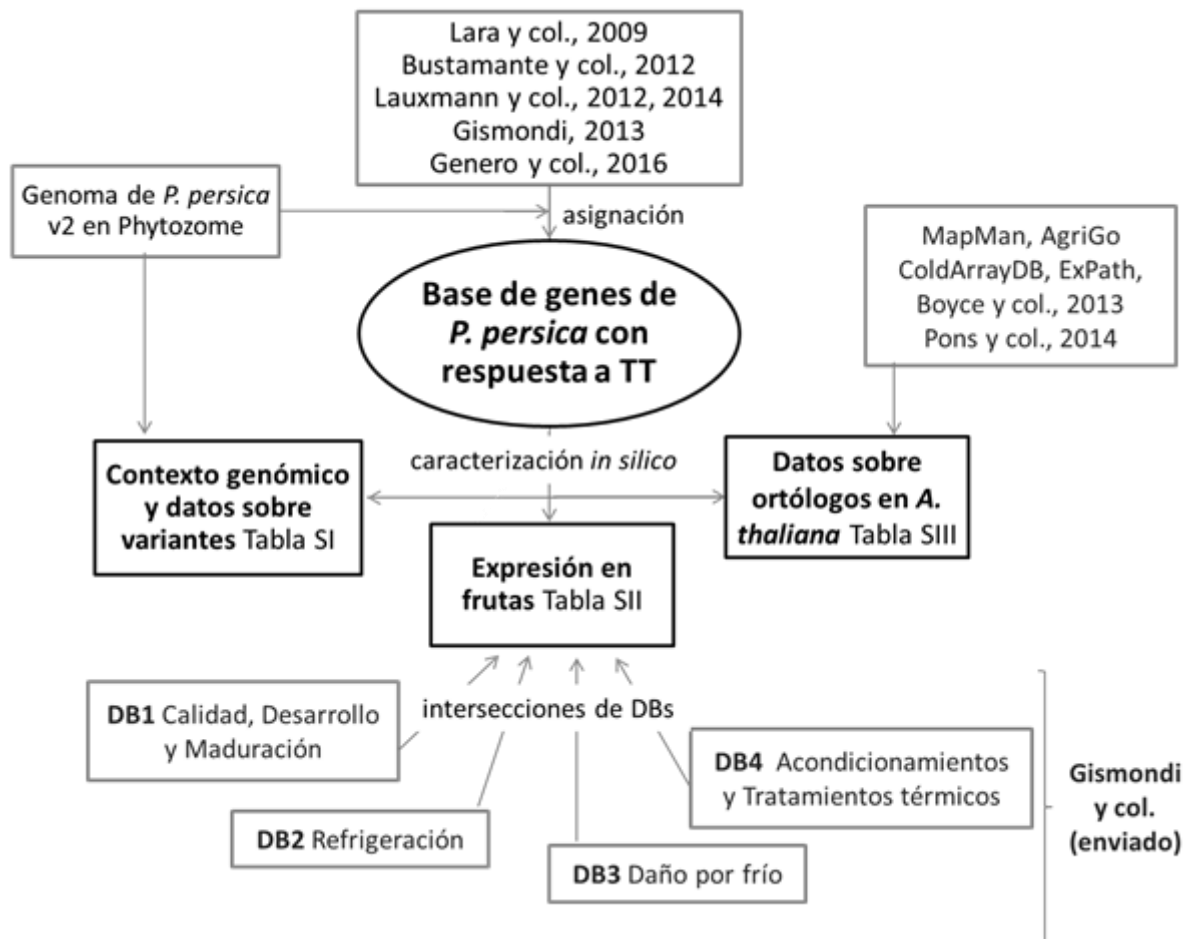
Recopilar información genómica, funcional y de expresión génica relativa a los determinantes incluidos en la base construida

Caracterizar *in silico* las secuencias regulatorias de grupos de determinantes conformados en base a su respuesta al tratamiento térmico

### 4.3. Resultados y discusión

#### 4.3.1. Construcción de una base de determinantes moleculares con respuesta al tratamiento térmico y posible funcionalidad protectora frente al daño por frío en duraznos

Con las mencionadas evidencias, se decidió en este trabajo crear una base de datos con los determinantes identificados luego de aplicar tratamiento térmico en duraznos en nuestro laboratorio. Los pasos seguidos para su obtención se resumen en la figura 4.1.



**Figura 4.1** Esquema de los pasos seguidos para la obtención de la base de determinantes de respuesta a TT. La misma incluye la información directa de los mismos y, en diferentes tablas, datos sobre sus ortólogos en otras frutas y en *A. thaliana*. TT, tratamiento térmico; DB, base de datos.

Primeramente, se recopilaban los trabajos de interés de nuestro grupo (ver tabla 3.1): Lara y col. (2009); Lauxmann y col. (2012 y 2014), Bustamante y col. (2012), Gismondi (2013) y Genero y col. (2016). Nomenclatura e información de secuencia de los determinantes identificados en los mencionados artículos junto a su expresión génica evaluada, se recopilaron en un nuevo archivo.

El siguiente paso consistió en la asignación de esos determinantes a al menos un identificador genómico y transcripcional correspondiente a la versión actual del genoma de duraznero (Phytozome, Goodstein y col., 2012; Verde y col., 2017). Como se describe en la sección

3.1.1, la misma se llevó a cabo dependiendo de la naturaleza de los determinantes y mediante el algoritmo blast aplicado de manera autónoma desde consola. Finalizado este proceso, la adquisición de descripciones y anotaciones funcionales, asociadas a los identificadores obtenidos de duraznero, fue el primer paso hacia el conocimiento de los roles moleculares detectados como involucrados en la respuesta molecular al TT preventivo del CI. La **tabla suplementaria SI** (fig. 4.1) posee la asignación, las anotaciones y los datos genómicos mencionados, incluyendo: codones de inicio y stop traducionales alternativos, diferencias entre variantes transcripcionales, genes adyacentes y distancias a ellos. Lo último se debe a la importancia actual que adquirieron los contextos genómicos en el estudio del rol funcional de genes y en el inicio transcripcional (Boycheva y col., 2014; Brkljacic y Grotewold, 2017).

La caracterización funcional de genes normalmente requiere de exhaustivas búsquedas de información a nivel de determinante génico y actualmente, si bien la gran acumulación de datos ómicos es necesaria para comenzar, no hay suficiente análisis para desentrañar las complejas relaciones génicas durante los procesos de interés en frutos (Farinati y col., 2017). Consideramos que una manera de comenzar radica en la posibilidad de contrastar rápidamente y a nivel específico de genes, la información disponible para ortólogos a los factores en estudio en otras especies frutales. Por ello, recopilamos la información a través de bases de datos creadas para los procesos relativos pre y poscosecha de interés (DB1-4; Gismondi y col., enviado). Las mismas fueron consultadas con los determinantes asignados y la información obtenida se nucleó en la **tabla suplementaria SII** (fig. 4.1), junto a aquella obtenida en los trabajos de nuestro laboratorio.

La figura 4.2 muestra números de interés obtenidos luego de las mencionadas intersecciones. Es interesante remarcar que para aquellos genes no reportados en frutas, se recurrió a verificar si existían reportes relativos a sus ortólogos en *A. thaliana*. Descontando casos en que los únicos reportes en esta especie modelo radican solamente en detecciones de productos génicos bajo un estímulo sin tratarse de análisis funcionales, 3 de 23 genes desconocidos en frutas tampoco poseen estudios asociados en *A. thaliana*. Corresponden a I13 (proteína con ZF del tipo CSL, sin especificidad química de interacción), I17 (proteína de familia DUF581) y R8 (proteína con ZF de familia Yippee). Esto resalta la importancia del trabajo de Lauxmann y col. (2012) debido a que identificó nuevos determinantes, específicos de duraznos, diferenciando estos órganos y sus procesos de otros estudiados. Por otro lado, refuerza la necesidad de una caracterización *in silico* como puntapié para la generación de nuevas hipótesis acerca de los procesos que hacen a la protección frente al CI mediada por TT.



Figura 4.2 Clasificación de genes de la base de determinantes según informaciones obtenidas en trabajos extra a los de nuestro laboratorio en duraznos y otras especies. TT, tratamiento térmico.

#### 4.3.1.1. Conformación de grupos de genes de respuesta al tratamiento térmico

A partir de la información de expresión de nuestro laboratorio acerca de la respuesta a TT, se conformaron diferentes grupos de determinantes, apuntando a englobar a aquellos posiblemente coregulados por procesos regulatorios upstream comunes. Así, los 153 determinantes de nuestra DB se clasificaron en **inducidos (I)**, **reprimidos (R)**, **afectados (A)** o **no afectados (NA)** por TT (tabla 4.1 con especificaciones). Luego, surgieron los grupos I2 y R2, versiones de I y R (respectivamente) con tendencias de expresión génica más detalladas aún. El grupo A de genes afectados por TT, contiene genes cuya expresión no pudo agruparse con otras, mínimo requisito para suponer coregulación, aunque la misma sí resultó sensible al TT.

Debido a la falta de datos más finos en cuanto a la expresión temporal, la posibilidad de que efectivamente sean grupos de genes coregulados se cree disminuida. Sin embargo, consideramos importante su caracterización *in silico* ya que la misma es base de futuros trabajos.

Tabla 4.1 Grupos de determinantes con expresión génica común

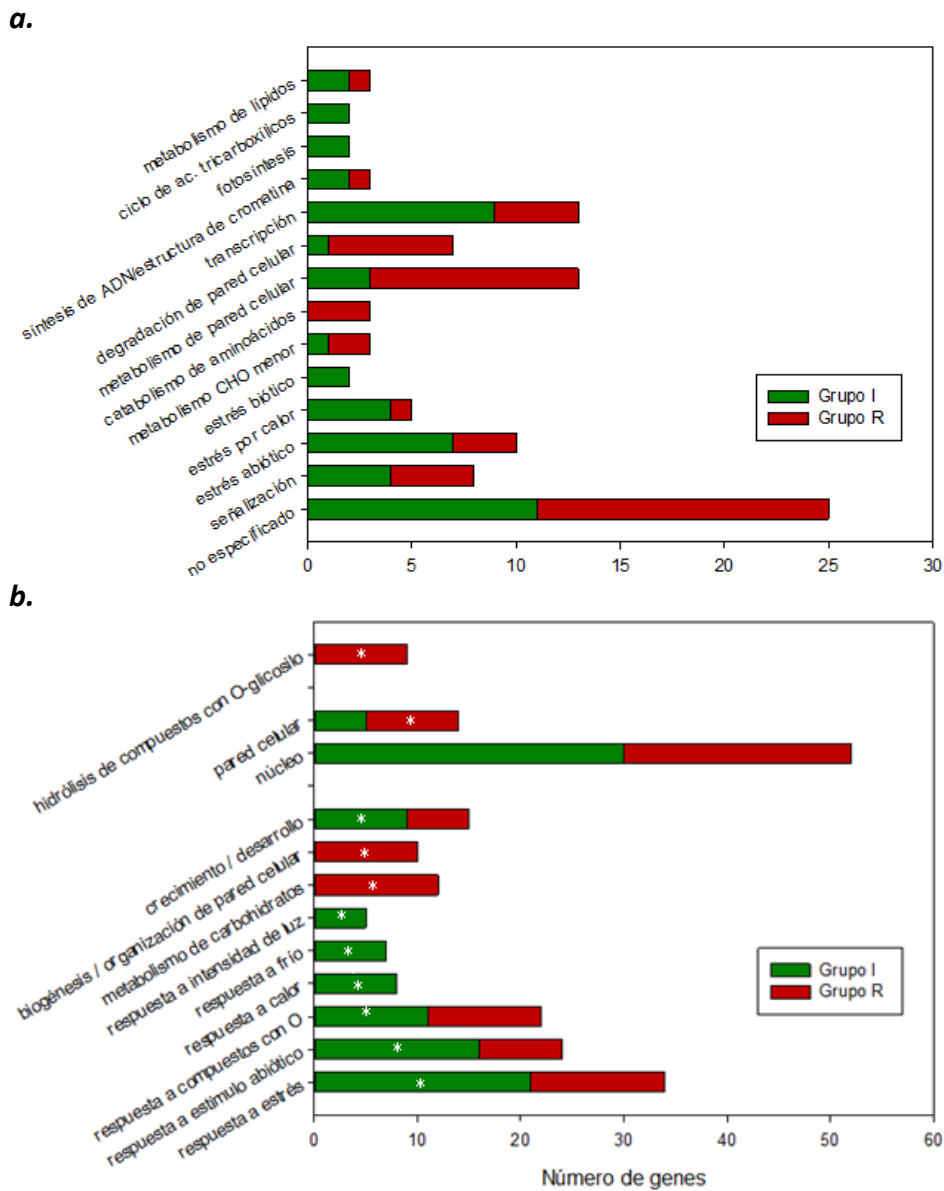
Grupo		Número	Expresión génica
I	Inducidos	65	Inducida en TT vs C3
I2	Inducidos2	45	Inducida en TT vs C3 y TT vs C; no afectada en vida de estantería (C3 vs C) ni maduración organoléptica (MO vs C)
R	Reducidos	58	Reducida en TT vs C3
R2	Reducidos2	41	Reducida en TT vs C3 y en TT+C3 vs C3; no afectada en vida de estantería (C3 vs C) ni maduración organoléptica (MO vs C)
NA	No afectados	5	No afectada por vida de estantería, maduración ni TT
A	Afectados	25	Afectada con diversas tendencias por TT, vida de estantería y maduración

El grupo I contiene a I2 y R, a R2. Grupos "2" son más detallados en cuanto a expresión

La investigación en poscosecha no escapa de recurrir a la información proveniente de organismos modelo, aunque los mismos sean distantes. Esto se debe a la gran cantidad de herramientas y datos disponibles que facilitan e invitan al trabajo con identificadores de *A. thaliana*. En la **tabla suplementaria SIII** (fig. 4.1), adicionamos a nuestra base datos: términos GO, anotaciones funcionales de MapMan, expresión génica bajo estímulos de frío o calor y en genotipos relacionados a señalización por frío (evaluando pertenencia a regulones de FTs), de ortólogos en *A. thaliana* a los determinantes de nuestra DB de duraznos. A partir de esta información se puede ver la putativa inclusión de algunos determinantes de duraznero en regulones de respuesta al frío equivalentes a los de *A. thaliana*, muchas veces disparadora de nuevas investigaciones que podrían establecer similitudes o diferencias entre los mecanismos moleculares de respuesta a bajas temperaturas.

#### **4.3.1.2. Recopilación y análisis de información funcional y de expresión génica relativas a los grupos de determinantes conformados**

La figura 4.3 muestra los resultados obtenidos para los identificadores de *A. thaliana* de los grupos I y R, en AgriGO (términos GO) y MapMan (vías y procesos biológicos). Esta información nos permite destacar a las funciones de respuesta a estrés abiótico, por calor y frío, a la intensidad de luz y la función de transcripción como aquellas inducidas por TT, mientras que la degradación de PC y el grupo de genes con funciones desconocidas representan a procesos reprimidos. Destacamos también la presencia de diferentes procesos relacionados al metabolismo del ARN, confiriendo importancia a otro nivel regulatorio de la expresión génica, adicional a la transcripción. Se incluyen proteínas ribosomales, de biogénesis de ARNr, de unión a ARN, de exporte de ARNm, helicasas, e implicadas en traducción. Un gran número de genes I y R quedan dentro de la categoría de MapMan de procesos desconocidos, lo que refuerza la necesidad de una caracterización funcional, más aun en frutos. Si bien es importante detallar los enriquecimientos respecto al genoma, hay casos como el número de genes con término GO relacionado a núcleo, no enriquecidos pero que suponen prácticamente la mitad de aquellos que conforman ambos grupos I y R, que denotan la movilización de procesos en esta organela debida al TT.



**Figura 4.3** Gráficos de número de genes asociados a procesos biológicos de MapMan (**a**) y con términos GO de AgriGO (**b**) para los grupos I (verde) y R (rojo). El asterisco en **b** representa los términos GO enriquecidos en este set respecto al genoma de *A. thaliana*.

A modo de facilitar la visualización de los resultados obtenidos principalmente en tablas suplementarias SII y SIII, nucleamos números relacionados a la recopilación de datos de expresión génica, para cada grupo conformado, en las tablas 4.2 y 4.3 siguientes. La primera se centra en la respuesta a altas mientras que la segunda a bajas temperaturas, estímulo de interés en poscosecha.

**Tabla 4.2 Genes con respuesta a calor en otros reportes y otras especies, por grupo**

Grupo	Número de genes con respuesta a TT	Genes con respuesta al calor			Genes con respuesta al calor conservada		
		Ppe*	Otras	Ath	Ppe*	Otras	Ath
I	65	6	27	3	5	8	1
I2	45	1	16	2	1	2	1
R	58	2	32	1	0	7	1
R2	41	1	21	1	0	0	1
U	5	0	2	2	0	0	0
A	25	7	14	2	1	6	2

TT, tratamiento térmico; Ppe, *P. persica*; Otras se refiere a frutas de otras especies; Ath, *A. thaliana*; \* se refiere a reportes extra a nuestro grupo

Si bien cada caso es considerable mientras conserve sensibilidad o, mejor aún, tendencia de expresión frente al calor en más de una especie vegetal, en la tabla 4.2 podemos señalar ciertos genes que fueron detectados en duraznos por otros trabajos, validando lo visto por los trabajos de nuestro grupo. Adicionalmente, se pueden destacar algunos genes que conservan la misma respuesta en frutas y unos menos que lo hacen también en *A. thaliana*. Quedan incluidos: del grupo I, *HSP20-like* (Spot 70), *HSP70* (I39), *PEX10* (I41), RuBP activasa (I34), entre otros; del grupo R, *PpDUF* (Bustamante y col., 2012), *PpPME1* y *PpACO1* (Genero y col., 2016), una histona H3, entre otros; del grupo A, *PpSDH* y *PpSS* (Lara y col., 2009), *PpRS* (Lauxmann y col., 2014), una ABA/WDS-induced protein y una proteína de estrés universal. Destacamos a *PpTIL* (I60) del grupo I por conservar su tendencia de expresión en respuesta a altas temperaturas en ortólogos de otras frutas pero, además, en su ortólogo de *A. thaliana*. Esto condice con la funcionalidad de *AtTIL1* como componente innato para la defensa frente a numerosos estímulos estresores, incluido (entre otros) congelamiento (Charron y col., 2005), calor (Chi y col., 2009) y alta salinidad (Brinker y col., 2010; Abo-Ogiala y col., 2014). Análisis filogenéticos demostraron homología con proteínas asociadas a membranas de bacterias (Blc), insectos (Lazarillo) y mamíferos (ApoD) (Charron y col., 2005), aunque se probó su movilidad frente a estrés a simplasto (Abo-Ogiala y col., 2014) y a otras membranas (tonoplasto, mitocondria, Golgi, peroxisomas y RE) (Hernández-Gras y Boronat, 2015). En cuanto a su rol funcional, líneas mutantes poseen hipersensibilidad a la luz y defectos en la termotolerancia basal y adquirida, en la resistencia frente a estrés oxidativo y se probó (en este y estudios bajo otros estreses) que estaría involucrada en contrarrestar la peroxidación lipídica (Charron y col., 2008; Chi y col., 2009; Boca y col., 2013; Abo-Ogiala y col., 2014).



**Tabla 4.3 Genes con respuesta a frío en nuestros y otros reportes y otras especies**

Grupo	Número de genes con respuesta a TT	Genes con respuesta al frío				Ath	
		Ppe*	Otras		Regulones de respuesta a frío		
I	65	29	25	37	15	CBF DREB2 ICE1 ESK1 SRF6 ZAT12 ZFHD/NAC	
I2	45	17	17	25	7	CBF DREB2 ICE1 SRF6 ZAT12	
R	58	38	36	34	13	CBF CBF4 SRF6 ZAT12	
R2	41	25	24	21	8	CBF CBF4 ICE1 ZAT12	
U	5	5	2	2	2	ZAT12 DREB2 SRF6	
A	25	18	15	12	7	CBF DREB2 ZAT12	

TT, tratamiento térmico; Ppe, *P. persica*; Otras se refiere a frutas de otras especies; Ath, *A. thaliana*; \* se refiere a reportes extras junto a los de nuestro grupo

De la tabla 4.3 es posible destacar la importante interrelación que podría existir entre las respuestas a tratamiento térmico y refrigeración, basándonos en el hecho de que casi la mitad de los genes de cada grupo responde al frío en al menos una categoría analizada (Ppe, Otras frutas y Ath). Los resultados también denotan al menos una posible implicancia parcial de regulones clásicos de respuesta al frío, muy caracterizados en la especie *A. thaliana*, en el tratamiento térmico en duraznos; aunque un análisis experimental particular de los genes responsables de estos regulones sería apropiado para verificarlo.

En otro enfoque no visible en tabla, 9 de los 65 genes del grupo I, 15 de los 58 del R y 6 de los 25 del A, poseen expresión sensible al frío en los tres grupos de especies (no necesariamente conservan tendencias). Sí las conservan en las tres categorías analizadas: la dehidrina *PpDhn3* (Spot 134), una acetil-CoA sintetasa plastídica (R25), la invertasa *PpNI2* y la rafinosa sintasa *PpRS*.

*PpDhn3* posee inducción por frío en duraznos, otras frutas y *A. thaliana*. Bassett y col. (2009) la caracterizan como dehidrina principal en frutos, con inducción en los meses de frío moderada (respecto a *PpDhn1*) en varios tejidos verdes y no inducible por sequía. Análisis filogenético de 5 dehidrinas de *A. thaliana* y 6 de *P. persica* (con dominio PF00257) agrupan a *PpDhn3* con ERD10 (At1g20450.1) y COR47 (Atg120440.1) (resultados no mostrados). Si bien su identidad de secuencia es de 40 a 45 %, los ortólogos de *A. thaliana* pertenecen a varios regulones clásicos de respuesta al frío, incluyendo a CBFs, CBF4, DREB2, ICE1, SRF6, ZAT12, ESK1. Acerca de su funcionalidad, se investigó su desorden estructural (por alta hidrofiliidad) como responsable

de evitar la desnaturalización y agregación frente al frío, sequía y alta salinidad. Sin embargo, se observó su ganancia de estructura al unir ligandos como membranas (por ejemplo para evitar peroxidación lipídica), u oligomerizar al unir iones (reduciendo su toxicidad) o moléculas de agua (contra la deshidratación) (Graether y Boddington, 2014). En particular, la fosforilación de ERD10, ERD14 y COR47 se demostró necesaria para unir iones  $\text{Ca}^{2+}$ , sugiriendo que las regiones ricas en Ser de PpDhn3-5 podrían retener esta función (Bassett y col., 2015). Algo destacable también, es la inducción transcripcional por calor de COR47 y DREB2, denotando una posible interacción entre las señalizaciones por altas temperaturas y deshidratación (Lim y col., 2006). Estas evidencias sugieren el rol protector del TT frente al CI al pre-inducir mecanismos comunes a aquellos que se ponen en juego en la respuesta al frío.

La acetil-CoA sintetasa plastídica *ACS1* (R25, *PpACS1*) del grupo R conserva su expresión reducida por frío. La misma y otras 2 ACSs pertenecen a la familia AMPBP de acil-CoA sintetetas y comparte arquitectura proteica con 4-cumarato-CoA ligasas (4CLs) y Long-Chain Acil-CoA sintetetas (LACs) (Shockey y col., 2002). Ha sido caracterizada, en *A. thaliana*, su importancia en la síntesis de ácidos grasos a partir de los intermediarios fermentativos acetato, etanol y acetaldehído y en el crecimiento de plantas de a partir de acetato (Lin y Olivier, 2008). En concordancia con la reducción por TT, se reportaron un aumento de la actividad Pir DH y altos niveles de acetaldehído en frutos cv. Dixiland tratados térmicamente y luego almacenados 3 d a 20 °C; así como también se discutieron sus posibles roles en la producción de aroma y a la vez protectores frente al CI (Lara y col., 2009). Cambios metabólicos similares a aquellos vistos luego de TT podrían darse por parte de *PpACS1* frente al frío, dada su reducción a nivel de transcripto por ambos estímulos de temperatura. También, puede que el TT “adelante” los fenómenos metabólicos que ocurrirán en la refrigeración.

Del grupo A, conservan su expresión reducida o inducida por frío en las especies recopiladas, *PpNI2* y *PpRS*, respectivamente. Múltiples cambios en el metabolismo de sacarosa y rafinosa ocurren debido a TT y refrigeración corta o prolongada. El beneficio en la aplicación de TT podría, entre otros mecanismos, proveer a la fruta de una batería de metabolitos de utilidad para enfrentar el estrés asociado a la refrigeración. En particular, *PpNI2* es una entre varias invertasas neutras (NIs) que interconvierten sacarosa en fructosa y glucosa y su reducción por frío que contrasta con su inducción por TT, sugiere que estos estímulos también pueden afectar finamente a las mismas vías metabólicas (Lara y col., 2009; Lauxmann y col., 2014; Bustamante y col., 2016). Una observación interesante es que los contenidos de sacarosa, fructosa y glucosa se

ven aumentados luego de una refrigeración prolongada en frutos de la variedad Elegant Lady poco susceptible a la harinosidad, lo cual es consistente con los resultados de TT como tratamiento preventivo. Por otro lado, *PpRS*, que interviene en la síntesis de rafinosa a partir de galactinol y sacarosa, es reducido en TT+C3 y reportamos su inducción por frío conservada en varias especies. Adicionalmente, galactinol y rafinosa fueron reportados con niveles inducidos por TT (Lauxmann y col., 2013) y luego de una refrigeración prolongada (Bustamante y col., 2016). Estos metabolitos, fueron confirmados en otras especies vegetales como antioxidantes de suma importancia, incluso en la aclimatación al frío, por lo que son considerados biomarcadores de tolerancia al CI (Davik y col., 2013; Bustamante y col., 2016).

Algo interesante a destacar al hacer las búsquedas anteriores de tendencias de expresión conservadas en las diferentes especies consideradas, es que la amplia diversidad natural que ofrecen los frutales dificulta el trabajo al presentar patrones de expresión variedad-dependiente.

#### **4.3.2. Caracterización *in silico* de secuencias regulatorias de grupos de determinantes conformados en base a la respuesta al tratamiento térmico**

Un análisis de interés para continuar con la caracterización *in silico* de los determinantes de nuestra base, consistió en explorar finamente su inicio transcripcional. El mismo podría intervenir intensivamente en la modificación de tasas transcripcionales, ampliamente observada luego de TT y refrigeración. Con el fin de establecer la regulación fina de la transcripción de un gen, numerosos elementos *cis* y *trans* combinan sus funciones moleculares, incluyendo desde la unión de un factor de transcripción (FT) a un promotor hasta la compleja interacción entre múltiples moléculas en dominios transcripcionales de cromatina topológicamente asociados (Brkljacic y Grotewold, 2017).

Por ello, este trabajo propone un análisis *in silico* de las secuencias upstream (promotores y 5' UTRs) de genes con expresión génica diferencial frente al tratamiento térmico en duraznos. El mismo comprende la búsqueda de motivos lineales que podrían suponer sitios de unión para FTs de durazno, con roles de importancia en los procesos biológicos de interés.

##### **4.3.2.1. Análisis del contexto genómico de los determinantes de la base construida**

El contexto génico de un locus cobra importancia al delimitar las regiones proximales no codificantes y potencialmente regulatorias, por lo que es interesante considerarlo al iniciar la caracterización de las mismas. Además, relaciones entre genes adyacentes pueden estudiarse a partir de la inspección del contexto génico, incluyendo mecanismos regulatorios comunes para su expresión y, por ende, roles funcionales en los mismos procesos biológicos (Wang y col., 2009; Boycheva y col., 2014). En la tabla suplementaria SI, se pueden observar los genes adyacentes a

cada uno de los determinantes y la distancia entre sus extremos. De manera interesante, 17 determinantes (incluidos una PEPC, una sHSP y *PpESP1* -Gismond, 2013-) poseen genes adyacentes upstream a menos de 500 pb y 7 de ellos podrían compartir promotor (el gen upstream se encuentra en orientación opuesta). 13 genes (incluyendo *PpTIL* -Lara y col., 2009; Lauxmann y col., 2012, Gismond, 2013; *PpOAT* -Lauxmann y col., 2014-, *PpFRO1* -Gismond, 2013- y *PpNI2* -Lara y col., 2009-) poseen loci adyacentes upstream a 500-1000 pb de distancia y 5 podrían poseer promotor bidireccional. A modo general y desconsiderando distancias, los posibles promotores compartidos serían para 75 determinantes.

Estos rasgos genómicos pueden influir profundamente en el inicio transcripcional del determinante de interés por lo que consideramos de suma importancia tenerlos en cuenta. Adicionalmente, sugieren la acción de procesos moleculares adicionales a los clásicos.

#### 4.3.2.2. Recopilación de factores de transcripción con expresión génica diferencial frente a TT y sus sitios de unión asociados

Múltiples FTs de familias conocidas, se observaron con expresión modificada por TT en duraznos. Resultó interesante considerarlos como partícipes, a nivel de la regulación del inicio transcripcional, de la respuesta al TT y su rol frente al CI. Se recopilaron FTs y otros genes con posibilidad de cumplir estos roles moleculares en la **tabla suplementaria SIV**. Luego, recurriendo a PlantPAN, PlantTFDB y PlnTFDB, se obtuvieron elementos *cis* asociados a los genes en cuestión específicamente (no necesariamente confirmados de forma experimental, sino propuestos a partir de información de ortólogos). En la tabla 4.4 se resume la información obtenida.

**Tabla 4.4 Factores de transcripción de duraznos bajo TT y elementos *cis* asociados**

Determinante	Grupo	Familia de FT	Motivo		Origen
R14	R, R2	ARR-B, Myb/SANT	Pp/AtARR-B bs	MRDATCTH	PlantPAN, PlantTFDB
			AtARR2 bs	RGATT	PlantPAN
I1	I, I2	bHLH	AtbHLH110 G-box	CACGTG	PlantTFDB
I24	I, I2	HD-ZIP, bZIP	AtHB12 bs	WTSATTRR	PlantPAN, PlantTFDB
			PpHB12 bs	WTGATTR	PlantPAN
R38	R, R2	S1Fa-like	S1Fa-like bs	RGAANNWTCKRGA	PlantTFDB
I44	I, I2	WRKY	WRKY40 bs	YTGACY	PlantPAN, PlantTFDB
				RGTCAA	
				RGTCMA	
				RGTCMAM	
R1	R, R2	C2H2	REF6 bs	RRARCAGAR	PlantTFDB
I42	I, I2		ZAT12 bs	RSAATGAG	Vogel y col., 2005
		GCATTGAC			

Caracteres IUPAC: R=A/G, Y=C/T, M=A/C, K=G/T, W=A/T, S=G/C, D=T/A/G, H=A/C/T, N=A/C/G/T; bs, binding site (sitio de unión del FT); FT, factor de transcripción.

#### 4.3.2.3. Estudios *in silico* de presencia y enriquecimiento de elementos *cis* en secuencias regulatorias de grupos de genes de respuesta al tratamiento térmico

Conformados los grupos de determinantes (ver tabla 4.1), se obtuvieron los primeros 500 bp de sus regiones regulatorias upstream en conjunto, así como también de sets controles (equivalentes en cantidad aunque contruidos al azar) y el correspondiente al genoma de *P. persica*. Se consideraron elementos *cis* conocidos para búsquedas, incluyendo los mencionados en la sección anterior y sumando PASPdb, asociada a *cisAnalyzer* (ver sección 3.2) (Gismondi y col., enviado). Las **tablas suplementarias SV-X** contienen los motivos encontrados y sus posiciones en promotores de los grupos I, I2, R, R2, A y U. Adicionales estudios en regiones upstream a los 500 bp e incluso downstream al inicio transcripcional así como la búsqueda de motivos desconocidos y la generación de nuevos subgrupos de promotores más relacionados, podrían proveer de información complementaria a la obtenida.

Un análisis realizado y que se presenta en las secciones siguientes para I, I2, R y R2 es el enriquecimiento de elementos *cis* en sus promotores, como prueba de su posible funcionalidad en el inicio transcripcional de la mayoría de los miembros de cada grupo. No se presentan enriquecimientos para grupos U y A debido a que diferentes patrones de expresión se incluyen en el último; sin embargo, otros análisis se han llevado a cabo (con cada grupo) para recopilar promotores similares en cuanto a combinatoria de motivos que poseen (resultados no mostrados).

#### 4.3.2.4. Análisis de enriquecimiento de elementos *cis* en promotores de los grupos I e I2.

##### Descripción de los factores de transcripción asociados

Debido a que los determinantes agrupados a partir de la base de genes construida poseen común expresión génica frente a TT, seguidamente se muestran los resultados obtenidos para los grupos I junto a I2 (tabla 4.5), en cuanto a la presencia de ciertos elementos *cis* que caracterizan a los primeros 500 pb upstream al ATG. Las tablas muestran frecuencias relativas de promotores con al menos una ocurrencia de un dado motivo vs la cantidad de promotores analizados por grupo. Luego, se pueden visualizar los *p*-values asociados a las pruebas  $\chi^2$  que evalúan si el enriquecimiento observado es estadísticamente significativo respecto a la proporción natural en el genoma. Adicionalmente, se realizó lo mismo para sets controles (valores no incluidos en tablas), con el fin de identificar si los enriquecimientos propios de cada grupo vs genoma se deben a la relación biológica entre los promotores y no se observan cuando la misma no existe.

Es interesante observar cómo depurar el grupo I en I2 permitió obtener nuevos enriquecimientos, lo que seguramente se relaciona con aumentar la probabilidad de que efectivamente los genes que se mantienen resulten coregulados por mecanismos similares.

**Tabla 4.5 Enriquecimiento de elementos *cis* en los grupos I e I2**

Motivo	Determinante asociado	Grupo(s) PASP	Consenso	Frecuencia relativa de promotores con al menos una aparición			Prueba $\chi^2$	
				Genoma	Grupo I	Grupo I2	Group I $p$ -value	Group I2 $p$ -value
DREB2A bs ERF1 bs	no	Calor Deshidratación	RCCGAC	<b>0,12</b>	<b>0,23</b>	0,22	<b>0,014</b>	0,073
DBF1-2 bs		ABA Deshidratación	ACCGAC	<b>0,08</b>	<b>0,18</b>	<b>0,20</b>	<b>0,003</b>	<b>0,005</b>
CBF4 bs			CCGAC	<b>0,21</b>	<b>0,35</b>	<b>0,36</b>	<b>0,009</b>	<b>0,031</b>
CRT/DRE		Frío	RYCGAC	<b>0,20</b>	<b>0,34</b>	0,31	<b>0,012</b>	0,114
DRE-like			DRCCGACNW	<b>0,06</b>	<b>0,12</b>	0,09	<b>0,044</b>	0,553
DREB1C/CBF2 bs			TTCNGAGT	<b>0,05</b>	<b>0,12</b>	0,11	<b>0,031</b>	0,179
Osa Cold Novel II			CTTTGCCT	0,03	0,08	0,09	0,068	0,064
CM4			CGTACG	<b>0,03</b>	<b>0,08</b>	0,04	<b>0,028</b>	0,753
AtZAT12 bs		I42	TCCACGTG	<b>0,02</b>	<b>0,06</b>	0,07	<b>0,016</b>	<b>0,036</b>
HSE I		no	Calor	GCATTGAC	<b>0,01</b>	<b>0,05</b>	<b>0,00</b>	<b>0,041</b>
Light HSE	AGAANNTTCT			0,02	0,03	0,02	0,764	0,725
CARE	Luz		GAANNTCC	<b>0,18</b>	0,26	<b>0,33</b>	0,101	<b>0,010</b>
HvGAMYB bs	GA		CAACTC	<b>0,26</b>	0,17	<b>0,11</b>	0,146	<b>0,04</b>
AtbHLH110 G-box	I1	YAACSRHM	0,44	0,48	0,53	0,609	0,254	
Pp/AtARR-B bs	R14	ABA	CACGTG	0,10	0,17	0,18	0,088	0,13
AtARR2 bs		Frío, CK	MRDATCTH	<b>0,50</b>	0,62	<b>0,67</b>	0,096	<b>0,043</b>
ARR5/7/15 bs			RGATT	0,92	0,95	0,96	0,403	0,513
WRKY bs	I44	Frío, estímulos abióticos y bióticos	YTGACY	0,99	0,97	0,98	0,450	0,929
				0,54	0,51	0,51	0,733	0,847

En negrita y fondo verde se observan motivos enriquecidos y en fondo rojo, motivos subenriquecidos respecto a genoma, no observados en control al azar. En letras rojas, enriquecimientos que también se observaron en control al azar. Caracteres IUPAC: R=A/G, Y=C/T, M=A/C, K=G/T, W=A/T, S=G/C, D=T/A/G, H=A/C/T, N=A/C/G/T; bs, binding site (sitio de unión del FT); FT, factor de transcripción.

Un resultado obtenido fue la ausencia del enriquecimiento de motivos HSE (Heat Shock Element) clásicos. Sin embargo, un HSE particular, **Light HSE**, resultó sobrerrepresentado en los grupos de promotores de genes aumentados por TT. Este motivo se asocia a un subset de HSFs (Heat Shock Factor; HSFA1d, A2 y A3) que se requieren para la respuesta rápida a la modificación

del estado redox celular de hojas de *A. thaliana*, gatillada por altas intensidades de luz o aplicación de herbicidas que comprometen la cadena de transporte de electrones fotosintética (Jung y col., 2013a). Cambios similares podrían ocurrir en efecto al TT en células de duraznos y conferir ventajas para enfrentar la refrigeración posterior. En base a lo último, obtuvimos ortólogos proteicos a los reportados por Jung y col. (2013a) en *P. persica* y otras frutas (ver **tabla suplementaria SXI**) y encontramos reportes de su expresión en: maduración (SIHSF-15/A1d, -02/A1d y -18/A2, Pan y col., 2013; Yang y col., 2016), refrigeración (SIHSF-02/A1d y -18/A2, Cruz-Mendivil y col., 2015, Zuo y col., 2017) y tratamiento térmico (SIHSF-18/A2, Cruz-Mendivil y col., 2015). Ningun ortólogo de AtHSFA3 presentó expresión en frutas aunque Yang y col. (2016) reportan la inducción por calor de SIHSF-24 (y de los demás ortólogos a HSFA2 y A1d) en hojas de *Solanum lycopersicum*. Adicionalmente y dada la posible acción sobre los mismos motivos de otros HSFs, recopilamos otros HSFs (habiendo 45 miembros de *P. persica* en PlantTFDB) que fueron detectados en frutos (duraznos, Pons y col., 2014; tomate, Pan y col., 2013, Yang y col., 2016), e incluso bajo tratamiento térmico (en *C. clementina*, Lin y col., 2015; frutilla, Brown y col., 2016; en tomate, Yang y col., 2016, Cruz-Mendivil y col., 2015) y refrigeración (duraznos, Pons y col., 2014; en banana, Wei y col., 2016; en tomate, Cruz-Mendivil y col., 2015). Estas numerosas evidencias sugieren un posible rol en duraznos que ciertos miembros de la familia HSF ejercerían a través de motivos **Light HSE**, como uno de los mecanismos moleculares activos sobre promotores de I e I2.

**Pp/AtARR-B bs** es el elemento que presentó mayor enriquecimiento (mayor al 60 %) en las regiones regulatorias analizadas de genes inducidos por TT y esto podría relacionarse con la expresión sensible al TT de un FT de la familia ARR-B (Response Regulator) encontrado por nuestro grupo (R14; ver tabla suplementaria SIV y la tabla 4.5). Es interesante remarcar la función de las citoquininas (CKs) en el desarrollo (especialmente en la división celular) de frutos (Matsuo y col., 2012; Böttcher y col., 2015; Farinati y col., 2017) y en las complejas redes en las que interaccionan con otras hormonas para la respuesta a estímulos estresores (Ha y col., 2012; O'Brien y Benková, 2013). Por ello, genes implicados en su biosíntesis, degradación y en su cascada de señalización, como lo son los FTs ARR-B (ARR1, 2, 10, 11, 12, 14, 18 de *A. thaliana*), han sido caracterizados en cuanto a sus funciones en respuestas a estrés, incluidos estímulos por frío (Jeon y col., 2010; Jeon y Kim, 2013; Kim, 2016). Sumando a estas evidencias, recopilamos transcritos de ARR-As y ARR-Bs (incluidos entre los 14 miembros de la familia de *P. persica* según PlantTFDB) con expresión génica en maduración (duraznos, Ogundiwin y col., 2009) y almacenamiento en frío (duraznos, Pons y col., 2014; naranjas, Yun y col., 2012; tomates, Cruz-Mendivil y col., 2015) así como sensibles a TT

(tomates, Cruz-Mendívil y col., 2015). Es por esto que tanto la funcionalidad del motivo **Pp/AtARR-B bs** así como la reducción en los niveles de transcripto de *PpARR-B* (R14) se podrían pensar como parte de la estrategia preventiva que el TT inicia para la futura exposición de los frutos a temperaturas inductoras del CI.

El motivo **CARE** (CAactc Regulatory Element), un GARE particular (GA Responsive Element) de respuesta a hormonas giberelinas (GAs), se encontró significativamente subenriquecido en los promotores de los genes de duraznos que resultaron inducidos por TT (respecto al genoma). El mismo se caracterizó como un motivo en promotores de genes expresados en semillas en germinación (ej. *REP-1* de *O. sativa*), necesario para su expresión inducible por estas hormonas (Sutoh y Yamauchi, 2003). Esto indicaría una posible independencia de GAs en la activación de promotores I e I2. Adicionalmente, estos resultados conciben con lo reportado por Pegoraro y col. (2015): aplicaciones exógenas de GAs en etapas de desarrollo y maduración de duraznos no han sido efectivas para contrarrestar harinosidad.

Seguidamente, resulta interesante discutir el enriquecimiento consistente de **motivos CRT/DRE** (C-Repeat/Dehydration Responsive Element) en promotores de genes inducidos por TT. Los mismos son sitios de unión de ciertos FTs de la familia AP2/ERF, que cuenta con 149 miembros en duraznero (PlantTFDB): 25 de la subfamilia AP2 (con dos dominios AP2), 116 ERFs (con un único AP2) y 8 RAVs (único AP2 y un dominio B3). Dentro de esta categoría, podemos citar a RAP2.1 de *A. thaliana* (represor de tolerancia a sequía y congelamiento, ABA-insensible; Dong y Liu, 2010), DBF1 y DBF2 de *Z. mays* (con roles en germinación relacionados a ABA; Kizis y Pages, 2002), a EREBPs como ERF105 (actor en la aclimatación al frío relacionado a CBFs; Bolt y col., 2017) e incluso a ciertos miembros con comportamiento dual como TINY (Sun y col., 2008b) y ERF1. Este último, regulado por ácido abscísico (ABA) y relacionado con jasmonatos (JAs), Et, las respuestas a patógenos, alta salinidad, sequía y calor, es capaz de interactuar con GCC-boxes durante estímulos bióticos y con DREs, en abióticos (Cheng y col., 2013). Los ERFs se subdividen en **clase ERF** (Et Responsive Element Factor o EREBPs, **ERE** Binding Protein; ERE posee el core **GCC-box**) y **DREBs** (DRE Binding protein). Luego, los DREBs de *A. thaliana* poseen dos subclases principales, con ciertas diferencias estructurales: CBFs/DREB1s (inducibles por frío, no por deshidratación ni por alta salinidad; ABA-independientes) y DREB2s (inducibles por deshidratación, calor, salinidad, no por frío; ABA-independientes) (Agarwal y col., 2006b; Chen y col., 2010; Mizoi y col., 2011). CBF4/DREB1D, DREB1E y DREB1F no son inducibles por frío: CBF4 es inducible por sequía y ABA (Haake y col., 2002), DREB1F por alta salinidad. Los FTs DREB1 ó 2, así como otros ERFs, poseen la

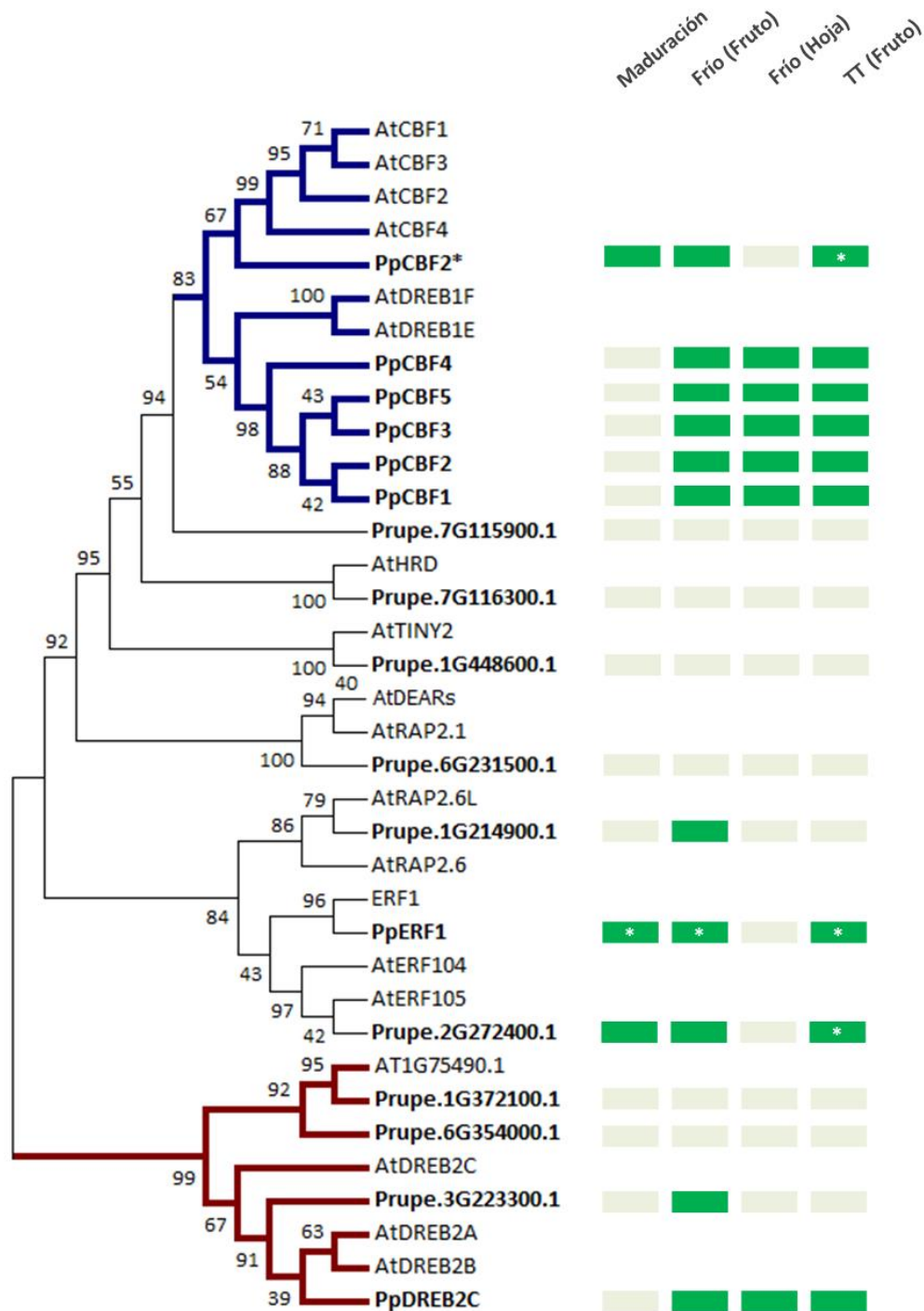


misma especificidad de unión por DREs; e incluso existen variantes en expresión e interacción en ortólogos de otras especies (Agarwal y col., 2006; Liu y col., 2007; Artlip y col., 2013). CBFs/DREB1s recibieron considerable atención como FTs responsables de parte de la aclimatación al frío en plantas y los aspectos downstream y upstream a ellos, incluida una compleja regulación hormonal y post-traducciona, han sido ampliamente estudiados (Eremina y col., 2015; Park y col., 2015; Shi y col., 2017). *A. thaliana* DREB2A es un componente principal de la cascada de respuesta al shock por calor, regulando a HsfA3, entre otros, y siendo regulado por HsfA1s (Schramm y col., 2006).

Finalmente, se puede observar que los motivos DRE de la tabla 4.5, sobrerrepresentados en los promotores I e I2, tienen la potencialidad de ser sitios de unión de diferentes FTs de la subfamilia ERF, ampliamente diversificada y sensible a diferentes estímulos. La búsqueda de ortólogos (tabla SXI) y un análisis filogenético presentado en la figura 4.4 es el inicio de su caracterización, en busca de aquellos FTs que confieran ventajas frente al CI. Adicionalmente, recopilamos datos de expresión de los ortólogos obtenidos en otras frutas, obteniéndose la información que se observa en la misma figura. Por otro lado, destacamos que otros ERFs, no incluidos en el árbol, se detectaron en frutos, en las condiciones de interés (MaDEAR1 de bananas implicado en la maduración, Fan y col., 2016; ERFs en tomate, Cruz-Mendivil y col., 2015).

A partir del árbol filogenético construido, se pueden observar posibles ortólogos funcionales para cada subclase incluida de la familia ERF y ya caracterizada en *A. thaliana*. Esto se debe a la conservación de estructuras primarias y arquitecturas entre los productos génicos y podría indicar roles similares en poscosecha de frutos. Es destacable que la mayoría son monoexónicos y que 9 genes ERFs se ubican en una misma región genómica; Prupe.5G089900-90800 (que incluyen PpCBF1-5) se encuentran de manera similar a la que se presentan los CBFs de *A. thaliana* (Artlip y col., 2013), lo que sugiere posibles regulaciones particulares y conservadas para esta región del cromosoma 5.

PpCBF2\* se observa como el mejor candidato (a nivel de secuencia aminoacídica y sumando la evidencia de expresión recopilada) de cumplir roles similares a CBFs de *A. thaliana*. Sin embargo, otros DREB1s también poseen expresión en frutos, en las condiciones de interés, así como también otros miembros de la familia que se visualizan en el árbol.



**Figura 4.4** Árbol filogenético de miembros de la familia ERF de *A. thaliana* y *P. persica*. La historia evolutiva fue inferida usando el método de Máxima Probabilidad basado en el modelo de Whelan y Goldman (2001), en el software MEGA6 (Tamura y col., 2013). El porcentaje de veces en que los taxones fueron asociados se muestra al lado de cada rama. Se destacan en negrita ortólogos de *P. persica* a los reportados en *A. thaliana*. En azul, se señala la clase DREB1 y en rojo, la clase DREB2. PpCBF2\* es PpCBF2 para Liang y col. (2013) cuando Artlip y col. (2013) utilizaron la misma denominación para otro gen. A la derecha, se reflejan los reportes con información de expresión gen-específica para maduración (Liang y col., 2013; Pan y col., 2013; Hao y col., 2015; Zhang y col., 2016), refrigeración (Pons y col., 2014; Wang y col., 2017; Cruz-Mendivil y col., 2015; Ma y col., 2014), incubación en frío de hojas (Artlip y col., 2013) y tratamiento térmico (Liang y col., 2013; Cruz-Mendivil y col., 2015). Los asteriscos blancos indican que la información obtenida se refiere a ortólogos de los genes de *P. persica* en otras frutas.

Es interesante destacar la posibilidad de que las familias de FTs conocidas en las respuestas al calor y al frío, no necesariamente conserven sus rasgos (cantidad de miembros, estímulo/s bajo el/los que actúan, regulación) en las distintas especies vegetales. Las evidencias recopiladas en kiwis (Ma y col., 2014), tomates (Cruz-Mendivil y col., 2015), duraznos (Liang y col., 2013) y GmDREBs de plántulas de soja (Kidokoro y col., 2015), confirman la sensibilidad de los CBFs de frutas y otros órganos frente a estímulos de altas temperaturas, beneficiosos contra CI inducidos por frío. Otros, como Pons y col. (2014) que trabajaron con duraznos de individuos con diferente susceptibilidad al CI, o con acondicionamientos poscosecha (Wang y col., 2017), observaron el rol de DREBs en la resistencia al CI y la inducción por frío de DREB2s en frutas. Un detalle que también diferencia a los PpCBFs de los AtCBFs es la presencia de DREs en los promotores de los primeros (Artlip y col., 2013), sugiriendo otras regulaciones ausentes en *A. thaliana*. En conjunto, las mencionadas evidencias sugieren que el rol en el inicio transcripcional de CBFs y/u otros DREBs, sobre promotores con DRE, podría requerirse para las respuestas de protección frente al CI e iniciarse por TT y les da importancia como actores en los mecanismos de tolerancia.

Estudios adicionales que evalúen la funcionalidad de los motivos enriquecidos en promotores I e I2 permitirán concluir acerca del rol de y la interacción entre las discutidas familias de FTs en los procesos bajo estudio en duraznos. Queda en evidencia la complejidad de las redes transcripcionales vegetales en plantas y frutas, lo que refuerza la necesidad de avanzar en su dilucidación (Brkljacic y Grotewold, 2017).

#### **4.3.2.5. Análisis de enriquecimiento de elementos *cis* en promotores de los grupos R y R2.**

##### **Descripción de los factores de transcripción asociados**

La tabla 4.6 permite visualizar los resultados relativos a los primeros 500 pb upstream al ATG de promotores R y R2, con expresión reducida luego de la aplicación de TT. Recordamos que los motivos estadísticamente enriquecidos/subenriquecidos respecto al genoma se muestran en negrita y con fondo verde/rojo (respectivamente), solo si sus sets controles construidos al azar no presentan igual comportamiento, señalando una putativa relación biológica entre promotores de interés.

Tabla 4.6 Enriquecimiento de elementos *cis* en los grupos R y R2

Motivo	Determinante asociado	Grupo(s) PASP	Consenso	Frecuencia relativa de genes			Prueba $\chi^2$		
				Genoma	Grupo R	Grupo R2	Grupo R $p$ -value	Grupo R2 $p$ -value	
DREB2A bs ERF1 bs	no	Deshidratación Calor	RCCGAC	0,12	0,21	0,20	0,082	0,244	
DBF1-2 bs		Deshidratación	ACCGAC	<b>0,08</b>	<b>0,19</b>	0,17	<b>0,001</b>	0,053	
CBF4 bs		ABA	CCGAC	0,21	0,29	0,32	0,180	0,148	
CRT/DRE		Frío	RYCGAC	0,20	0,26	0,24	0,394	0,670	
ICE1 bs / JIN bs		Frío JA	CACATG	<b>0,22</b>	<b>0,38</b>	0,32	<b>0,005</b>	0,179	
NAC072 bs		Estímulos bióticos	CATGTG						
AtZAT12 bs		I42	Frío	RSAATGAG	<b>0,08</b>	<b>0,16</b>	0,10	<b>0,040</b>	0,804
TA5 box	no	TATCCT		<b>0,18</b>	0,28	<b>0,32</b>	0,081	<b>0,036</b>	
HOS9 bs		VCKCGT		<b>0,29</b>	<b>0,40</b>	<b>0,46</b>	<b>0,092</b>	<b>0,021</b>	
MYB15 bs		GKTWGKTR		<b>0,28</b>	<b>0,45</b>	<b>0,49</b>	<b>0,007</b>	<b>0,005</b>	
MYB4 bs		JA Luz		AMCWAMC	0,52	0,62	0,66	0,145	0,096
AtMYB3 bs		-	TAACTAAC	<b>0,02</b>	0,05	<b>0,07</b>	0,121	<b>0,029</b>	
HSE I		Calor	AGAANNNTTCT	0,02	0,02	0,02	0,656	0,777	
STRE			AGGGG	0,42	0,53	0,54	0,082	0,157	
P-box	GA		CCTTTKB	<b>0,53</b>	<b>0,69</b>	<b>0,73</b>	<b>0,021</b>	<b>0,015</b>	
AtbHLH110 G-box	I1	Deshidratación ABA	CACGTG	0,10	0,09	0,10	0,927	0,808	
EIRE	no	Estímulos bióticos y abióticos	TTGACC	<b>0,20</b>	<b>0,07</b>	0,07	<b>0,018</b>	0,063	
AS1/ocs-element			TGACG	0,28	0,34	0,07	0,386	0,050	
AtWRKY18 bs	I44		TTGACY	<b>0,42</b>	0,34	<b>0,22</b>	0,332	<b>0,017</b>	
			YTGACY	<b>0,54</b>	<b>0,26</b>	<b>0,32</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,008</b>	
RGTCMA			<b>0,42</b>	<b>0,26</b>	<b>0,22</b>	<b>0,021</b>	<b>0,017</b>		
WRKY40 bs			-	RGTCMA	<b>0,59</b>	<b>0,41</b>	<b>0,37</b>	<b>0,011</b>	<b>0,007</b>
			-	RGTCMAM	0,40	0,28	0,27	0,063	0,106
		-	-	-	-	-	-	-	

En negrita y fondo verde se observan motivos enriquecidos y en fondo rojo, motivos subenriquecidos respecto al genoma, no observados en control al azar. En letras rojas, enriquecimientos que también se observaron en control al azar. Caracteres IUPAC: R=A/G, Y=C/T, M=A/C, K=G/T, W=A/T, S=G/C, D=T/A/G, H=A/C/T, N=A/C/G/T; bs, binding site (sitio de unión del FT); FT, factor de transcripción.

En este caso, destacamos al **DBF1-2 bs** (Kizis y Pages, 2002) como único DRE enriquecido en el grupo R, en común con lo visto en promotores I e I2 (aunque no se presentan sobrerrepresentados otros DREs). Esto podría indicar una funcionalidad particular para cada DRE identificado frente al TT.

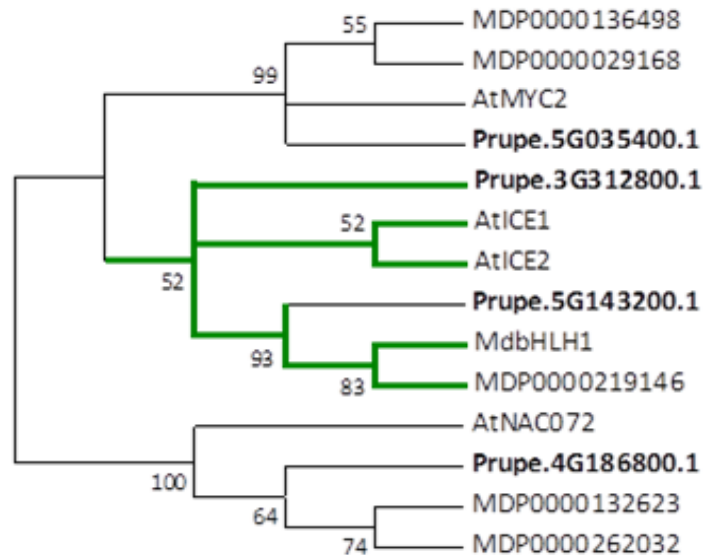
Otro motivo enriquecido fue un **AtZAT12 bs** (Vogel y col., 2005), lo que lo sugiere como posible actor junto a su FT, sobre el inicio transcripcional de los promotores R. AtZAT12 se reportó con roles regulatorios sobre la expresión de CBFs y se sugiere un rol como represor transcripcional (Vogel y col., 2005). Adicionalmente, AtZAT12 participa de señalizaciones en respuesta a variados estímulos (Davletova y col., 2005b; Le y col., 2016). Un detalle adicional es la detección de un gen

inducido por TT ortólogo a *AtZAT12* (*PpZAT12*, incluido en I e I2), sugiriendo roles para el mismo en procesos poscosecha. El mismo es sujeto a una caracterización particular en la presente tesis.

**TA5-box** es uno de varios motivos encontrados en promotores de genes con expresión afectada por el FT **OsMYBS3** de *O. sativa* (Su y col., 2010). De manera interesante, el mismo se describió con un rol importante en la aclimatación al frío de plántulas de arroz, a cargo de un regulón de genes de respuesta tardía a bajas temperaturas e incluso capaz de reprimir a nivel transcripcional a genes CBFs. Realizamos las correspondientes búsquedas de información relativa a sus ortólogos en frutos (tabla SXI) y los encontramos reportados en estos órganos expuestos a almacenamiento refrigerado en duraznos (Pons y col., 2014) así como también frente a tratamientos térmicos preventivos del CI en tomates (Cruz-Mendivil y col., 2015), reforzando la posibilidad de que el mismo y su regulón cumplan roles en los procesos bajo estudio.

**P-box** es un elemento *cis* relacionado con la señalización por fitohormonas GAs, enriquecido en promotores R y R2. Wisniewski y col. (2006) lo identificaron en promotores de las dehidrasas *PpDhn1* y *2*, siendo importantes para el control fotoperiódico de la aclimatación al frío.

ICE1 actúa upstream a los factores CBFs para la señalización por bajas temperaturas en variadas especies vegetales (Chinnusamy y col., 2003, 2007; Doherty y col., 2009; Kim y col., 2015). Benedict y col. (2006) determinaron *in silico* varios elementos *cis* en promotores regulables por ICE1 (MYC-like bHLH), siendo **ICE1 bs** uno de ellos. El mismo motivo es correspondiente al FT *AtMYC2/AtJAI1/AtJIN1* (Lorenzo y col., 2004), inducible por deshidratación, JAs y ABA y responsable de diversos procesos dependientes de JA (incluida la resistencia a insectos) (Kazan y Manners, 2013). Por otro lado, ICE1 bs es el reverso complementario de **AtNAC072 bs** (Tran y col., 2004), siendo *AtNAC072* inducible por frío, deshidratación, alta salinidad y ABA y responsable de parte de la regulación génica en base a ABA (Li y col., 2016). En base a estas posibilidades, construimos un árbol filogenético con ortólogos en duraznos y manzanas a los FTs mencionados (tabla suplementaria SXI, fig. 4.5).



**Figura 4.5** Árbol filogenético de FTs MYC-like de *A. thaliana* con sitios de unión en ADN reportados y sus ortólogos de *M. domestica* y *P. persica*. La historia evolutiva fue inferida usando el método de Máxima Probabilidad basado en el modelo de JTT (Jones y col., 1992), en el software MEGA6 (Tamura y col., 2013). El porcentaje de veces en que los taxones fueron asociados se muestra al lado de cada rama. Se destacan en negrita ortólogos de *P. persica* a los reportados en *A. thaliana* y *M. domestica*. En verde, se señalan los FTs tipo ICE.

Seguidamente, buscamos datos de expresión génica de ortólogos en frutos a estos FTs de *A. thaliana* (Gismondi y col., enviado) y, observamos un único transcripto detectado en muestras tratadas térmicamente y luego refrigeradas (ortólogo a NAC072 en tomates, Cruz-Mendivil y col., 2015). Sin embargo, otros reportes contienen información sobre un ortólogo a ICEs en duraznos (Prupe.5G143200, cercano al ICE1-like caracterizado en manzanas MdbHLH1, Feng y col., 2012) detectado durante la refrigeración (Pons y col., 2014) y acerca del correspondiente a AtNAC072 en *P. persica* y *S. lycopersicum* (Pons y col., 2014; Cruz-Mendivil y col., 2015). No encontramos información en frutos del segundo ortólogo a ICEs, Prupe.3G312800 así como tampoco acerca de ortólogos a AtMYC2. Por otro lado, sí recopilamos múltiples bHLHs (no ortólogos a los reportados en *A. thaliana*) expresados en frutos (en maduración, refrigeración y tratamientos térmicos) que (si fueran capaces de interactuar con los mismos elementos *cis* que los anteriores) podrían intervenir en el inicio transcripcional de los promotores R y R2.

El FT de tipo MYB R2R3 denominado **MYB15/ATY19** de *A. thaliana* interactúa físicamente con ICE1 y se describió su rol negativo en la tolerancia a estreses osmóticos y al frío mediante su interacción con promotores *CBFs* y regulación de sus niveles de transcripto (Agarwal y col., 2006). Las búsquedas de sus ortólogos en frutas (tabla SXI) y de la información de expresión relativa a los mismos revelan su presencia durante maduración, refrigeración y bajo tratamiento térmico (Sanchez-Ballesta y col., 2003; Cruz-Mendivil y col., 2015). Las evidencias anteriores sugieren una

participación de esta familia de FTs y de mecanismos similares a los reportados, aunque análisis detallados hacen falta para confirmar estas hipótesis. Por otro lado, se pueden observar numerosos reportes que revelan expresión de otros FTs MYBs en frutas en maduración, refrigeración e incluso TT.

Finalmente, un interesante resultado fue observado en cuanto a la presencia de motivos para FTs de la familia WRKY (Xu y col., 2006; Lindlof y col., 2009). La familia de FTs en duraznero posee 85 miembros (caracterizados por Chen y col., 2016) y en *A. thaliana* presenta 90 miembros con roles en respuestas a muy variados estímulos, incluido frío y señalización oxidativa bajo estreses bióticos (Kim y col., 2008; Lindlof y col., 2009; Wang y col., 2011). Lo que se puede observar en promotores R y R2 es un claro subenriquecimiento de motivos **WRKY bs** respecto a los valores naturales en el genoma. Esto sugiere la no participación de esta familia en la regulación del inicio transcripcional de estos genes en particular e hipotéticamente, un escape de su regulación. Por otro lado, sumando evidencias sobre esta familia de FTs, Lauxmann y col. (2012) identificaron un determinante que corresponde a un ortólogo de WRKY40 como inducido en duraznos por TT (I44). Por otro lado, varios reportes verifican WRKYs de duraznos y otras frutas con expresión modificada en procesos poscosecha (Pan y col., 2013; Wang y col., 2017).

#### 4.4. Conclusiones

Como resultados de los análisis contenidos en este capítulo, fue posible:

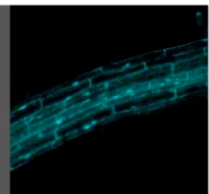
**Construir una base de determinantes génicos identificados en durazno por los enfoques ómicos aplicados en muestras tratadas térmicamente.** La misma es de suma importancia para el conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen al TT, **reúne la información genómica y de expresión obtenida a nivel génico en nuestro y otros laboratorios y en duraznos y otras especies** y contribuirá a la selección de factores con posibles roles preventivos frente al daño por frío en duraznos y otros frutos de importancia agronómica.

**Caracterizar *in silico* las regiones regulatorias upstream de genes con expresión modificada bajo tratamiento térmico en duraznos.** Si bien hay otros niveles en la regulación de la expresión génica, avanzar en la caracterización del inicio transcripcional y la combinatoria de elementos *cis* y recopilar evidencias de las familias de FTs implicados en el TT es un primer paso hacia el entendimiento de sus mecanismos moleculares de protección frente al CI. El enriquecimiento de los motivos descritos podría ser característica que define a los promotores estudiados como afectados por el TT y, a las familias de FTs discutidas, que se unirían a estos sitios y con ortólogos en frutos a los caracterizados en *A. thaliana*, como posibles actores en su regulación.

Entre otros, se destaca la participación de DREs, ICE1 bs, Light HSE, MYB15 bs, reportados de poseer roles en condiciones de bajas temperaturas, por su enriquecimiento en sets de genes inducidos o reprimidos frente al TT. Esto sugiere la **movilización e implicancia de mecanismos moleculares de respuesta al frío**, conservados o con variaciones respecto a los reportados en especies modelo, **como efecto del tratamiento térmico en duraznos y la interacción entre ambas respuestas a temperatura.** Los resultados son de suma importancia para la problemática en estudio debido a que la combinación de exposiciones a diferentes temperaturas sería efectiva al requerirse almacenamiento refrigerado, vida de estantería y aplicación de TTs preventivos del CI en la cadena productiva de fruta fresca. Finalmente, las evidencias recopiladas invitan a profundizar los estudios funcionales acerca de estas familias de factores de transcripción en frutos.



*PpTRAF y AtTRAF son nuevas ARN chaperonas con roles en respuestas frente a temperatura, incluida la protección frente al daño por frío en duraznos*



## **5. PpTRAF y AtTRAF son nuevas ARN chaperonas con roles en respuestas frente a temperatura, incluida la protección frente al daño por frío en duraznos**

### **5.1. Introducción**

#### **5.1.1. ARN chaperonas**

Las moléculas de ARN poseen gran diversidad en cuanto a los procesos celulares en los que se desempeñan pero, adicionalmente, cuentan con una gran versatilidad estructural lo que podría considerarse un factor regulatorio de su funcionalidad (Rajkowitsch y col., 2007; Semrad, 2011). En el contexto celular, los ARNs pueden encontrarse en interacción con proteínas, pudiéndose regular mutuamente (Rajkowitsch y col., 2007; Semrad, 2011). Las RBPs (RNA-Binding Proteins) intervienen en múltiples procesos del metabolismo del ARN celular, transcripción, splicing, exporte a citosol (en eucariotas), estabilidad post-transcripcional, biogénesis ribosomal, silenciamiento, traducción, entre otros; y pueden cumplir roles en facilitar interacciones de ARN con otras moléculas o estabilizar/desestabilizar estructuras funcionales (Rajkowitsch y col., 2007; Jung y col., 2013b; Kang y col., 2013). Por ello, actualmente es de interés el desarrollo de nuevos métodos para su estudio (Faoro y Ataide, 2014).

Las **ARN chaperonas** son un grupo de proteínas heterogéneo debido a su diversidad estructural, sus mecanismos de acción y su participación en el metabolismo del ARN. Sus funciones moleculares, centradas en la resolución de estructuras mal plegadas y/o en la asistencia al correcto plegamiento de los ARNs (Rajkowitsch y col., 2007), les confiere un rol sustancial en la regulación de la expresión génica. Las ARN helicasas dependen de ATP para catalizar su función chaperona capaz de incluso desplazar a otras RBPs de su ARN blanco (Bourgeois y col., 2016).

Una característica destacable de las diferentes arquitecturas proteicas con funcionalidad ARN chaperona es su alto nivel de regiones intrínsecamente desordenadas que les otorgan mayor flexibilidad. Este rasgo sería esencial para su función molecular, al favorecer el establecimiento de interacciones inespecíficas con las moléculas blanco. Ciertas arquitecturas pueden presentar segmentos plegados estables separados por regiones desestructuradas (Bocca y col., 2005; Rajkowitsch y col., 2007; Mangeon y col., 2010).

#### **5.1.2. ARN chaperonas con funciones frente a estímulos ambientales**

La intervención de ARN chaperonas en variados procesos celulares y su rol en la expresión

génica ha sido observada en el desarrollo vegetal y también en respuestas a estímulos del medio (Jung y col., 2013b; Kang y col., 2013).

Las DEAD-box ARN helicasas LOS4 y RCF1 cumplen roles en el transporte de ARNs al citosol y splicing, respectivamente, ambos positivos para la aclimatación al frío y la tolerancia al congelamiento (Gong y col., 2005; Guan y col., 2013). Otro caso es el de STR1 y STR2, supresores de la respuesta a estrés por frío, calor, alta salinidad, ABA y sequía (Kant y col., 2007).

En procariontes, sucede un proceso de aclimatación al frío similar al reportado en plantas. El mismo ha sido detalladamente caracterizado en *E. coli* y se ha visto que la familia de proteínas pequeñas de shock por frío (CSP, CspA-E), con el dominio único CSD (Cold Shock Domain), serían principales actores en este proceso (Rajkowitsch y col., 2007).

En plantas, distintas familias proteicas se caracterizaron como ARN chaperonas incluidas GRPs (Glycine-Rich Proteins), CSDPs o CSPs (Cold Shock Domain Proteins), entre otras (fig. 5.1; Bocca y col., 2005 y Kim y col., 2007a).



**Figura 5.1 Esquema representativo de las arquitecturas de ARN chaperonas vegetales en contraste con las proteínas CSPs de *E. coli*.** Adaptada de Bocca y col. (2005) y Kim y col. (2007a). RRM, RNA-Recognition Motif; GR, region Glycine-Rich; ZF-GR, region Glycine-Rich con Zn Finger(s); CSD, Cold-Shock Domain.

Las CSDPs vegetales difieren de las CSPs procariontes al poseer regiones C-terminales adicionales, ricas en glicina (GR) e intercaladas con al menos dos dedos de Zn (ZFs) tipo CCHC (Bocca y col., 2005). En particular, CSDP1 estimula el crecimiento a bajas temperaturas (Kim y col., 2007a; Juntawong y col., 2013).

Las proteínas GRPs, detectadas en diversas especies vegetales, poseen un motivo de reconocimiento de ARN (RRM) en su extremo N-terminal y una región GR C-terminal (Bocca y col., 2005). Se reportaron GRPs con niveles de ARNm inducidos luego de exposición al frío, heridas, estreses hídrico, salino y biótico y fitohormonas (Kim y col., 2005, 2007a; Kwak y col., 2005; Park y col., 2009). Una subclase adicional son RZs (RNA-binding domain and a Zinc finger); poseen un RRM y un dominio GR con un único ZF tipo CCHC, representada por atRZ-1a (Kim y col., 2005).

### 5.1.3. Presente capítulo

La refrigeración de frutos, como estímulo de bajas temperaturas, también induce mecanismos que involucran ARN chaperonas (Müller y col., 2017; Ruggieri y col., 2018). Lauxmann y col. (2012), identificaron diversos transcritos de duraznos relacionados al metabolismo del ARN, con expresión afectada bajo tratamiento térmico. El fragmento de ADN codificante TED 16 corresponde al gen Prupe.1G538600 (asignado por blastn) y el mismo codifica para una proteína con ZFs tipo TRAF (TRAF-type Zn finger-related; siendo TRAF: Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor) de función desconocida. De la misma manera, su ortólogo en el organismo modelo *A. thaliana*, At1g09920, no ha sido caracterizado.

Ambos genes fueron seleccionados para su estudio y los primeros avances en este sentido se han logrado basándonos en la utilización de diferentes muestras de duraznos en poscosecha así como también de genotipos de *A. thaliana* con pérdida y ganancia de función. El organismo modelo ofrece numerosas herramientas de trabajo, que contrastan con la falta de protocolos para la manipulación genética de una especie como duraznero. Adicionalmente, el conocimiento en detalle de numerosos procesos moleculares en esta especie favorece el estudio de productos génicos desconocidos.

### 5.2. Objetivos específicos

Estudiar el rol molecular de los factores *PpTRAF* y *AtTRAF* *in vivo* mediante complementación funcional en cepas de *E. coli* BX04 sensible al frío y RL211 prueba de actividad ARN helicasa.

Determinar la localización subcelular de *PpTRAF* y *AtTRAF* mediante fusión a CFP y transformación transitoria en *Nicotiana benthamiana* y estable en *A. thaliana*.

Obtener genotipos con niveles modificados de *AtTRAF* y determinar fenotipos relacionados a estímulos por temperatura y procesos particulares en los que podría desempeñar sus funciones.



La mutación puntual mencionada entre variantes transcripcionales, genera una diferencia en los residuos codificados: Pro (5' **C**CC) para Prupe.1G538600.2 y Ala (5' **G**CC) para Prupe.1G538600.1 (fig. 5.4). Estudios *in silico* (no mostrados) con ortólogos vegetales de estos genes revelan cierta conservación de esta mutación puntual, en la misma posición, para casos que poseen anotadas variantes transcripcionales. Sin embargo, si bien no se hicieron secuenciaciones exhaustivas, no se amplificó la secuencia .2 y sí la correspondiente a Prupe.1G538600.1, que fue caracterizada.

A partir de Phytozome, se obtuvo la información presentada en la tabla 5.1, que muestra la denominación de Prupe.1G538600 y de su ortólogo At1g09920 (obtenido con relación uno a uno mediante la herramienta disponible en Biomart, Phytozome). Como se puede observar la nomenclatura optada corresponde al dominio anotado en los productos génicos (y comprobado en escaneos en InterPro, tabla 5.3). Sin embargo, alineamientos con los factores TRAF2-6 de mamíferos (Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor), implicados en la transducción de señales durante respuestas inflamatorias (Inoue y col., 2000), revelan escasa identidad de secuencia quedando en común sólo el ZF tipo TRAF (uno de los tres dominios importantes en TRAFs de mamíferos). Es interesante destacar que, en estas arquitecturas, estos ZFs cumplirían roles de interacción con otras proteínas para la transducción de señales (Bishop, 2004). Por otra parte, en plantas se han descrito productos proteicos con los mencionados y con otros dominios similares a aquellos de las proteínas TRAFs de mamíferos (Peralta y col., 2013; Huang y col., 2016).

Adicionalmente, se recopiló información acerca de la arquitectura génica de ambos genes en estudio (fig. 5.3), dado que es su primera caracterización.

**Tabla 5.1 Genes TRAF en estudio en el presente capítulo**

Gen	Transcripto	Cromosoma	Descripción	Denominación
Prupe.1G538600	Prupe.1G538600.1 ppa011706m	<i>P. persica</i> Chr: 1	TRAF-type Zn Finger Protein-Related	<i>PpTRAF</i>
	Prupe.1G538600.2 ppa011708m			<i>PpTRAF2</i>
At1g09920	At1g09920.1	<i>A. thaliana</i> Chr: 1		<i>AtTRAF</i>

*PpTRAF* (Prue.1G538600)



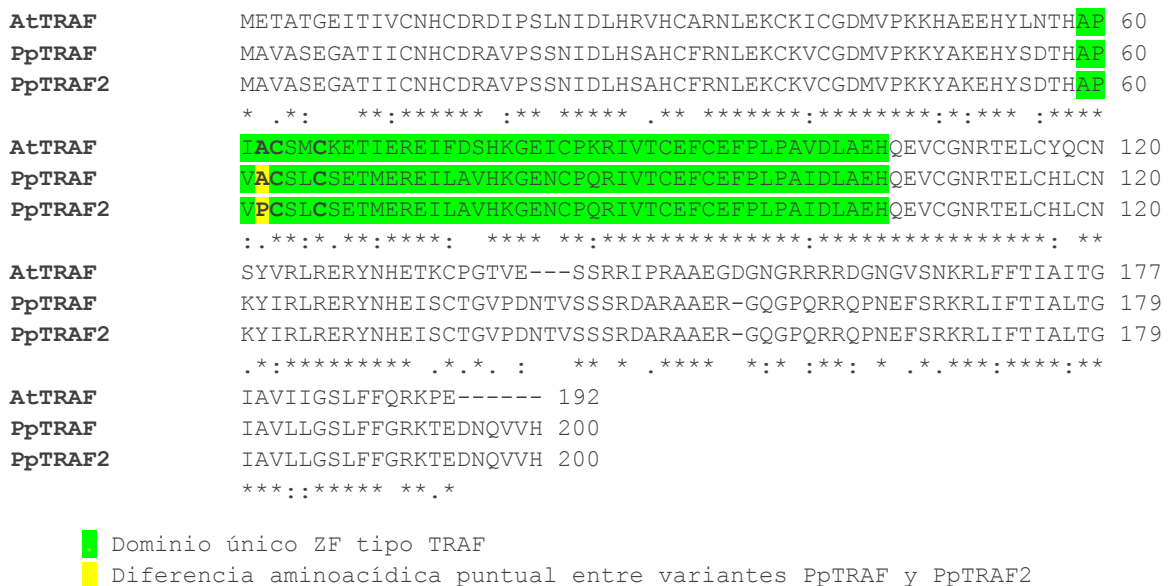
*AtTRAF* (At1g09920)



**Figura 5.3 Arquitecturas génicas de *PpTRAF* y *AtTRAF*.** Se pueden observar los límites exón-intrón y los largos conservados de exones, 3'UTR y ciertos intrones. *PpTRAF* posee una longitud de 3991 pb mientras que *AtTRAF*, 2387 pb. E, exón, I, intrón, UTR, región no traducible.

Es destacable la conservación en el largo de los cinco exones de *PpTRAF* y *AtTRAF* (solo E4 y E5 poseen aproximadamente 10 pb extra para *PpTRAF* respecto a *AtTRAF*), de 3'UTRs y de solo un intrón, mientras que los demás segmentos difieren en longitud. *PpTRAF* posee un intrón en 5'UTR, adicional respecto a su ortólogo en *A. thaliana*.

El ADNc *PpTRAF* codificaría para una proteína de 200 aminoácidos y el de *AtTRAF*, para un producto peptídico de 192 aminoácidos (la diferencia se debe a 12 pb extras que poseen los exones 4 y 5 de *PpTRAF*, respecto a los mismos en *AtTRAF*), con pls predichos de 7.3 y 7.5, respectivamente. Los mismos fueron alineados (fig. 5.4 y tabla 5.2) y escaneados en busca de dominios conservados (tabla 5.3) así como también se recopilaron términos GO (tabla 5.3).



**Figura 5.4 Alineamiento entre secuencias proteicas derivadas de los ADN codificantes de *PpTRAF*, *PpTRAF2* y *AtTRAF*** (ClustalW). *AtTRAF* es la secuencia proteica derivada del transcripto At1g09920.1; *PpTRAF*, de Prue.1G538600.1 o ppa011706m y *PpTRAF2*, de Prue.1G538600.2 o ppa011708m. Se destaca el dominio único anotado en ambas especies. "\*" indica residuos idénticos; ":", sustituciones conservadas; ".", sustituciones semiconservadas; "-" ausencia de residuos.

Tabla 5.2 Parámetros del alineamiento entre AtTRAF, PpTRAF y PpTRAF2

	Valor E	Similitud (%)	Identidad (%)	Cobertura (%)
AtTRAF vs PpTRAF	1,5e-51	70,3	62,5	99,5
AtTRAF vs PpTRAF2	4,1e-51	69,8	62,0	99,5

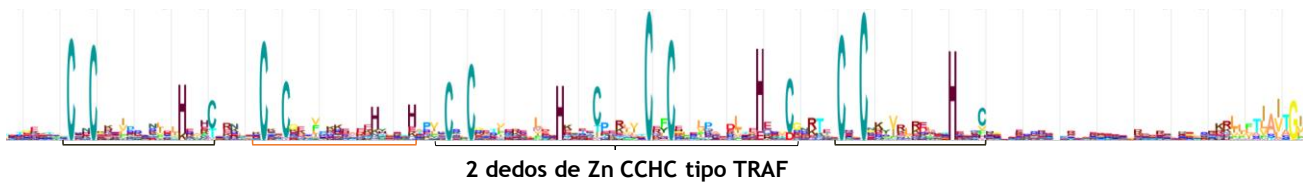
Tabla 5.3 Anotaciones recopiladas de AtTRAF y PpTRAF

Gen	Términos GO			Dominios conservados
	Proceso Biológico	Componente Subcelular	Función Molecular	
<b>PpTRAF</b> Prupe.1G538600 ppa011708m.g	Proceso Biológico Desconocido (4)	Componente celular desconocido (5575)	-	IPR001293 PF02176 <b>Dedo de Zn tipo TRAF</b> (60-93) IPR013083 Dedo de Zn tipo RING/FYVE/PHD (4-106) Segmento transmembrana (171-190)
<b>AtTRAF</b> At1g09920	Proceso Biológico Desconocido (4) Direccionamiento proteico a vacuola (6623) Transporte vesicular (16192)	Componente celular desconocido (5575) Núcleo (5634)	Unión a Zn (8270)	IPR001293 PF02176 <b>Dedo de Zn tipo TRAF</b> (59-105) IPR013083 Dedo de Zn tipo RING/FYVE/PHD (1-106) Segmento transmembrana (169-188)

Las anotaciones recopiladas en la tabla 5.3 son predichas mediante algoritmos, no han sido verificadas experimentalmente, lo que demuestra el desconocimiento de este factor inclusive en *A. thaliana*. Lo mismo puede evidenciarse al no poseer publicaciones asociadas en TAIR. La información relacionada al dominio de ZF tipo TRAF (IPR001293) revela que puede o no unir al  $Zn^{2+}$ , Fe u otros metales y, adicionalmente, interaccionar con varias especies químicas como ácidos nucleicos, glúcidos, lípidos o proteínas manteniendo su estructura estable (Laity y col., 2001).

En busca de revelar qué residuos aminoacídicos se encuentran conservados en las proteínas TRAF, se realizaron búsquedas en el servidor HMMER utilizando como input las secuencias de AtTRAF y PpTRAF. Seteando la búsqueda de proteínas ortólogas en el taxón *Viridiplantae*, se obtuvo un logo de frecuencias de aparición (por ende, de conservación) de cada aminoácido. Resultados similares se obtuvieron para ambas proteínas TRAF por lo que, en la figura 5.5, se presentan aquellos obtenidos utilizando la secuencia de PpTRAF como input.

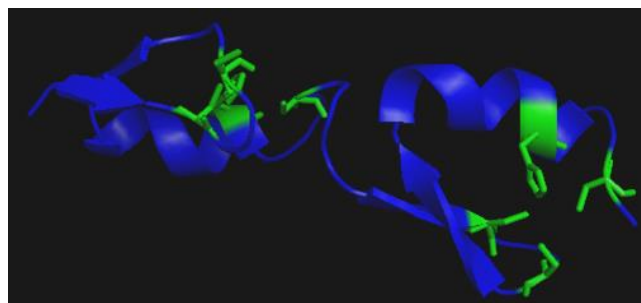




**Figura 5.5 Conservación de residuos aminoacídicos entre ortólogos peptídicos de AtTRAF y PpTRAF.** Búsqueda con la secuencia aminoacídica de PpTRAF en el servidor web HMMER, taxón *Viridiplantae*. La misma puede visualizarse a través de las frecuencias de aparición de cada residuo en las secuencias analizadas. Mayor es el residuo en el logo, mayor es su frecuencia de aparición. Se destacan los dos ZFs incluidos en el dominio anotado en Phytozome aunque se revelan posibles ZFs extras.

El logo que HMMER permitió obtener revela la existencia de ZFs extra a los contenidos en el dominio tipo TRAF anotado y sugiere la importancia de residuos de His y Cys (dada su conservación entre ortólogos), ya que estos residuos, con largos de linkers similares, son requeridos para el establecimiento de ZFs (Zn finger). A partir de esto se podría pensar en estas proteínas TRAF como poseedoras de 5 ZFs similares en tándem. Un detalle es que el segundo ZF (desde el extremo N-t) es del tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, mientras que los demás son CCHC (dos de ellos anotados como tipo TRAF y los otros dos, similares a este tipo de ZF).

Para confirmar *in silico* la putativa estructuración en ZFs y revelar la estructura tridimensional 3D, búsquedas de proteínas con estructuras similares fueron realizadas en HHPRED. Los resultados apuntan a lo hipotetizado ya que las únicas regiones que alinean estructuralmente con moldes conocidos son los diferentes ZFs de las proteínas TRAF. Por ello, se realizaron modelados por homología, de cada ZF y del dominio zf\_TRAF de ambas proteínas en estudio, en el servidor SWISS-MODEL, que se pueden observar en la figura 5.6 para el caso de PpTRAF.



**Figura 5.6 Modelado por homología del dominio zf\_TRAF de la proteína PpTRAF.** Se utilizó el servidor web SWISS-MODEL y el molde 3HCS (Crystal structure of the N-terminal domain of TRAF6). Se señalan en verde los residuos de Cys e His que coordinarían el ión Zn<sup>2+</sup>. Resultados similares se obtuvieron para cada uno de los ZFs por separado y para el dominio zf\_TRAF de AtTRAF.

Resultados de modelados similares en cuanto a la estructuración observada, se obtuvieron para cada uno de los ZFs por separado y para el dominio zf\_TRAF de AtTRAF. Por otro lado,

modelados *ab initio* (no mostrados) en el servidor I-TASSER revelan que las regiones entre ZFs no poseen estructura secundaria, quedando los ZFs como únicos elementos estructurados.

Finalmente, para profundizar en el conocimiento de los posibles roles de estas proteínas, ambas fueron sujetas junto a una lista de sus ortólogos proteicos, a predicciones *in silico* de localización subcelular (en los servidores CELLO2GO, SUBA3, Plant-mPloc y WoLF PSORT). La tabla 5.4 muestra los resultados obtenidos, indicativos de que posiblemente estas proteínas se localicen en núcleo y citoplasma de células vegetales.

**Tabla 5.4 Predicciones *in silico* de localización subcelular de proteínas PpTRAF y AtTRAF**

Gen	WoLF PSORT	Plant-mPloc	CELLO2GO	SUBA3
<b>PpTRAF</b> Prupe.1G538600.1 ppa011708m.g	citosol	núcleo	extracelular   núcleo	-
<b>AtTRAF</b> At1g09920.1	citosol	núcleo	núcleo   extracelular   citosol	núcleo
Ortólogos proteicos *	0,80 citosol	-	0,65 extracelular   0,35 núcleo	-

\* se muestran frecuencias relativas de la mejor localización sobre el total de secuencias ortólogas anotadas

Los análisis y las predicciones realizadas permitieron sumar información importante para el inicio de la caracterización funcional de este factor desconocido. Las mismas fueron consideradas a la hora de realizar los experimentos siguientes.

### 5.3.2. Estudios de los niveles de ARNm *PpTRAF* en *P. persica* mediante RT-qPCR

Con el fin de analizar la abundancia transcripcional de *PpTRAF* en diversos órganos de duraznero, se diseñaron diversos experimentos de RT-qPCR. Se utilizaron muestras provenientes del INTA San Pedro de diversas variedades (ver sección 3.4.1).

#### 5.3.2.1. Análisis en hojas adultas, flores abiertas y frutos cosechados

La presencia del transcrito *PpTRAF* fue estudiada en diversos órganos de la variedad de duraznero Dixiland. La figura 5.7 revela los resultados obtenidos por RT-qPCR para *PpTRAF*.

Se puede visualizar que la expresión del gen *PpTRAF* es ubicua en estos órganos a nivel transcripcional, lo que resalta la importancia de su funcionalidad a nivel celular.

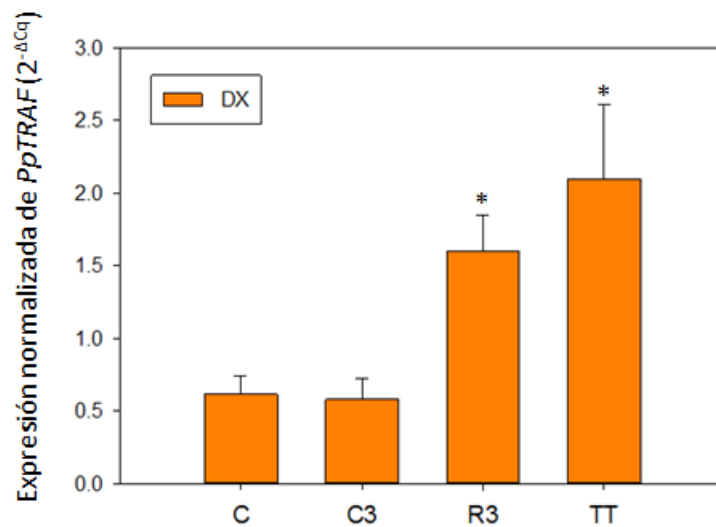


**Figura 5.7 Expresión transcripcional normalizada de *PpTRAF* en hojas, flores abiertas y frutos de duraznero cv. Dixiland.** Se analizaron hojas adultas, flores abiertas y mesocarpio de frutos cosechados, luego de aplicar el mismo método de extracción de ARN total, adaptado de Meisel y col. (2008). La expresión se calculó mediante la fórmula  $2^{-\Delta Cq}$  (Cq, ciclo de cuantificación) y se normalizó a aquella correspondiente al normalizador *PpDNArep*. Se muestran los promedios y los desvíos obtenidos a partir de al menos tres réplicas biológicas. El asterisco indica el valor significativamente diferente ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.2.2. Análisis en frutos expuestos a tratamiento térmico

Considerando al tratamiento térmico como una de las estrategias preventivas del daño por frío y dada la mencionada identificación de este transcrito por Lauxmann y col. (2012), se trabajó con muestras de duraznos cv. Dixiland sometidas a distintas condiciones poscosecha. Esta variedad fue caracterizada como intermedia en cuanto a su susceptibilidad al daño por frío (Genero y col., 2016). Los resultados de las reacciones de RT-qPCR en frutos recién cosechados (C), o almacenados durante 3 d a temperatura ambiente (C3), 0 °C (R3) y 39 °C (TT) (ver figura 3.2a), para *PpTRAF*, se observan en la figura 5.8.

El análisis reveló la inducción del transcrito *PpTRAF* frente a bajas temperaturas y tratamiento térmico, respecto a las condiciones cosecha y 3 d a 20 °C (condiciones similares a la vida de estantería de la fruta fresca). Estos resultados validan lo reportado en el manuscrito de Lauxmann y col. (2012) y confirman la agrupación del transcrito *PpTRAF* como parte de los grupos I e I2 (sección 4.3.1.2). Adicionalmente, sugieren la participación de este transcrito en las respuestas de la fruta a la refrigeración corta y al TT preventivo del CI.



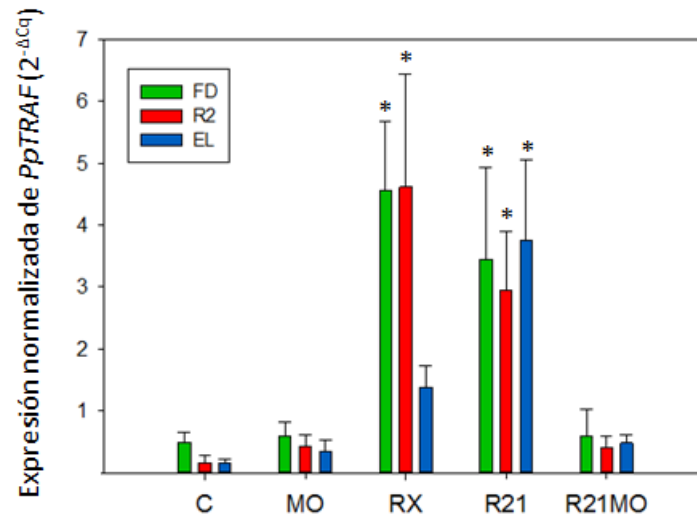
**Figura 5.8 Expresión transcripcional de *PpTRAF* en duraznos cv. Dixiland (DX) durante la cosecha, vida de estantería, refrigeración y tratamiento térmico.** Se analizaron frutos recién cosechados (C), almacenados durante 3 d a 20 °C (C3), refrigerados a 0 °C por 3 d (R3) o expuestos a tratamiento térmico a 39 °C por 3 d (TT). La expresión se calculó mediante la fórmula  $2^{-\Delta Cq}$  ( $Cq$ , ciclo de cuantificación) y se normalizó a aquella correspondiente al gen de referencia *PpDNArep*. Se graficaron los promedios y los desvíos obtenidos a partir de al menos tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.2.3. Análisis en frutos de diversas variedades expuestos a refrigeración

En el trabajo de Genero y col. (2016) se caracterizaron cinco variedades en cuanto a la harinosidad de sus duraznos una vez alcanzada la maduración organoléptica luego de 21 d de almacenamiento a 0 °C. La determinación consistió en medir el jugo extraíble de la fruta luego de la refrigeración, debido a que la pérdida de jugosidad es un rasgo típico del CI. De sus resultados, surgió la categorización de Elegant Lady (EL) como variedad con baja susceptibilidad, Rojo2 (R2) y la mencionada Dixiland (DX) como intermedias y Flordaking (FD) como aquella más sensible al frío, es decir, con la mayor pérdida de jugosidad.

Para sumar información a la caracterización de *PpTRAF*, sus niveles de ARNm se estudiaron en frutos de estas variedades, expuestos a la misma refrigeración, inductora del CI (ver figura 3.2b). La figura 5.9 muestra los resultados de RT-qPCR obtenidos.

La figura muestra que el período de almacenamiento a 20 °C, destinado a permitir la maduración organoléptica, no produjo cambios en los niveles del transcrito *PpTRAF* (respecto a C) lo cual se mantiene respecto a la variedad DX y sugiere que el mismo no cumple roles funcionales en este proceso. Sin embargo, el almacenamiento refrigerado a 0 °C fue capaz de inducir a *PpTRAF* en el mesocarpio de todas las variedades en estudio (respecto a C y MO).



**Figura 5.9 Expresión transcripcional de *PpTRAF* en duraznos en condiciones de cosecha, maduración y refrigeración.** Se analizaron frutos de las variedades Flordaking (FD), Rojo2 (R2) y Elegant Lady (EL), cosechados (C), almacenados durante X d a 20 °C hasta madurez organoléptica (MO), refrigerados a 0 °C por X d (RX) o 21 d (R21), o refrigerados a 0 °C por 21 d y luego almacenados a 20 °C hasta madurez organoléptica (R21MO). La expresión se calculó mediante la fórmula  $2^{-\Delta Cq}$  (Cq, ciclo de cuantificación) y se normalizó a aquella correspondiente al gen de referencia *PpDNArep*. Se graficaron los promedios y los desvíos obtenidos a partir de al menos tres réplicas biológicas. Los análisis estadísticos se han realizado a un factor con los valores de cada variedad. Los asteriscos indican valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

En particular, la refrigeración corta induce sus niveles en las variedades FD, R2 y DX indicando una mayor rapidez en la respuesta transcripcional respecto a EL. Continuado el tratamiento por 21 d, FD, R2 y EL incluida mostraron niveles inducidos del ARNm *PpTRAF*. Estas evidencias indicarían una funcionalidad de este transcripto en las respuestas de la fruta a bajas temperaturas. Nuevas mediciones y/o nuevos diseños podrían definir diferencias más detalladas entre variedades con distinta susceptibilidad al CI y permitir dilucidar un rol en la protección, aunque los resultados obtenidos indican un comportamiento común en respuesta al frío.

Demostrando conservación interespecífica en las respuestas de frutas al frío, la búsqueda de ortólogos con reportes asociados (ver sección 4.3.1.2), revelaron que Solyc12g088070.1 (ortólogo de *PpTRAF* en *S. lycopersicum*) fue inducido a nivel transcripcional en tomates almacenados a bajas temperaturas y también luego de un tratamiento térmico seguido de refrigeración (Cruz-Mendivil y col., 2015).

### 5.3.3. Estudios de los niveles de ARNm *AtTRAF* en *A. thaliana Col-0* mediante RT-qPCR

#### 5.3.3.1. Información de expresión génica disponible *in silico* para *AtTRAF*

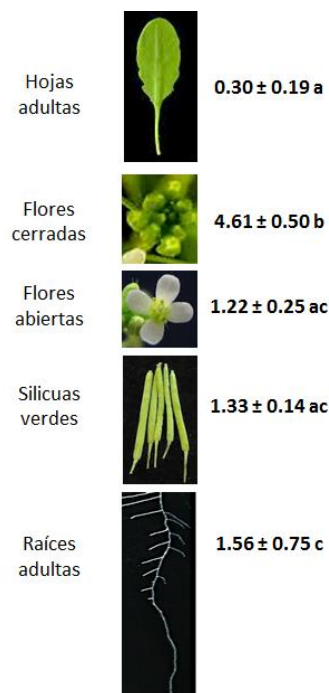
En los servicios web BAR y ExPath, el transcripto *AtTRAF* se encontró presente en bajos niveles, en varios órganos, a excepción de silicuas maduras y durante el desarrollo de *Arabidopsis*. También se vio inducido luego de tratamiento con ABA, reprimido por JAs y afectado por GAs. Un

tratamiento de plántulas de 7 d por 3 h con ABA es el mayor inductor de la expresión en ExPath. Por otro lado, el estrés por choque osmótico, frío, salinidad, patógenos (*P. syringae*) y sequía afectan positivamente los niveles de *AtTRAF* en partes aéreas y radicales de plántulas, mientras que el estrés por calor y UV-B los reducen. Estas evidencias suman a las características comunes entre los ortólogos *AtTRAF* y *PpTRAF* y refuerzan lo determinado experimentalmente y recopilado *in silico* para el gen de duraznero en caracterización. Por otra parte, el ortólogo Solyc12g088070.1 de ambas proteínas TRAF, presenta expresión tisular y respuestas bajo diferentes tipos de estrés similares a las recopiladas para *AtTRAF* (Expressolog Tree, BAR), en concordancia con lo mencionado en la sección 5.3.2.3.

Un dato adicional es la identificación del péptido TELCYQCNSYVR (contenido en el quinto ZF predicho) en muestras de raíces jóvenes (10 d) y de HAEHYLNTHAPIAC en raíces y hojas adultas (23 d) cultivadas en condiciones normales. Estas evidencias indican la posible traducción *in vivo* a partir de *AtTRAF* codificante (servicio web pep2pro).

### 5.3.3.2. Análisis en diferentes órganos

Se analizó la presencia del transcripto *AtTRAF* en hojas adultas, flores abiertas, flores cerradas, silicuas verdes y raíces adultas. La figura 5.10 revela los resultados obtenidos.

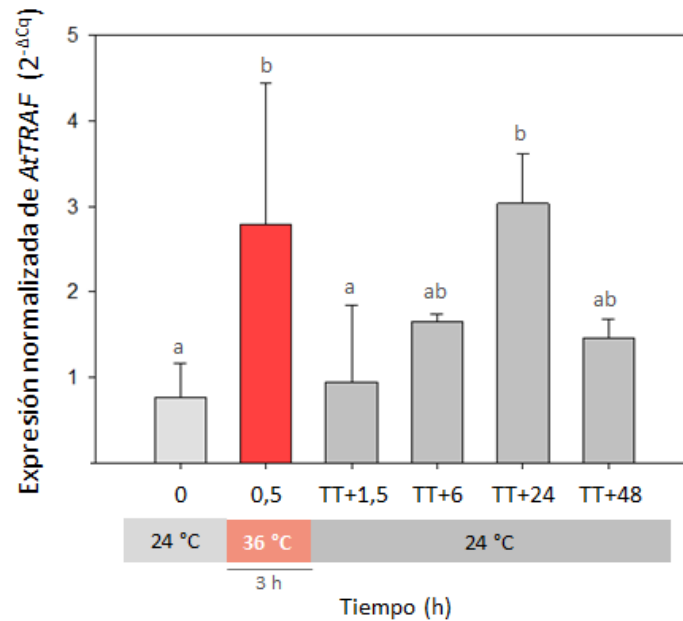


**Figura 5.10** Expresión transcripcional normalizada de *AtTRAF* en hojas adultas, flores cerradas y abiertas, silicuas verdes y raíces adultas de *A. thaliana Col-0*. Se analizaron los mencionados órganos a partir de plantas de 30 d cultivadas en suelo. El método de extracción de ARN total fue el descrito por el fabricante para Trizol (Roche) excepto para silicuas (se utilizó el protocolo de Oñate-Sánchez y col., 2008). La expresión se calculó mediante la fórmula  $2^{-\Delta Cq}$  (Cq, ciclo de cuantificación) y se normalizó a aquella correspondiente al gen de referencia *UBQ10*. Se muestran los promedios y los desvíos obtenidos a partir de al menos tres réplicas biológicas. Letras diferentes indican valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

De manera interesante, el ARNm en estudio se encontró con niveles significativamente mayores en flores cerradas respecto a los demás órganos estudiados. No se descartan variaciones adicionales a lo largo del desarrollo o en órganos particulares. El mismo resultado contrasta con el obtenido para *PpTRAF*, con mayores niveles en hojas de duraznero. Por otro lado, *GRP4* posee una expresión diferencial en flores abiertas y cerradas (Kwak y col., 2005), así como también proteínas con ZFs en tándem, cumplen funciones durante la floración (Bogamuwa y Jang, 2014).

### 5.3.3.3. Análisis en hojas expuestas a estímulos de temperatura

Se midieron los niveles de ARNm *AtTRAF* al exponer plantas de *A. thaliana* a un tratamiento de 3 h a 36 °C para luego permitir su recuperación (fig. 5.11).



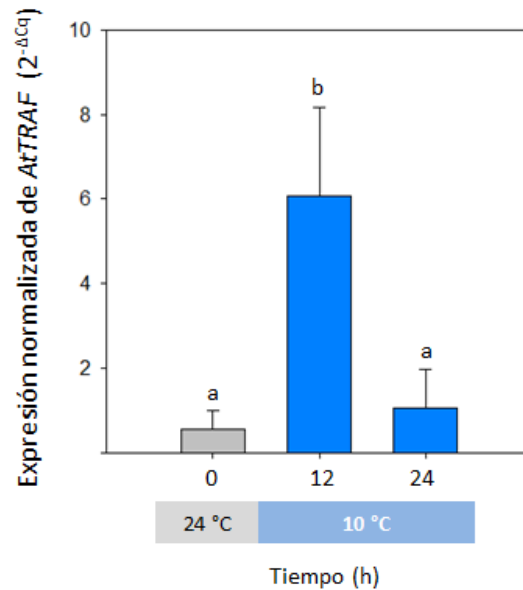
**Figura 5.11 Expresión génica de *AtTRAF* a nivel de transcritos en *A. thaliana Col-0* frente a altas temperaturas y en recuperación.** Plántulas de 10 d cultivadas en MS-agar fueron expuestas por 3 h a 36 °C (tratamiento térmico, TT) y se tomaron muestras foliares antes (0), durante (0,5) y seguido el mismo, a diferentes tiempos de recuperación a 24 °C (TT+1,5, TT+6, TT+24 y TT+48). La expresión se calculó mediante la fórmula  $2^{-\Delta Cq}$  (Cq, ciclo de cuantificación) y se normalizó a aquella correspondiente al gen de referencia *UBQ10*. Se graficaron los promedios y los desvíos de los resultados obtenidos a partir de al menos tres réplicas biológicas. Letras distintas indican valores estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Se observa que a los 30 min de exposición al calor, así como luego de 24 h de recuperación, los niveles del transcritos *AtTRAF* aumentan de manera significativa respecto a los demás tiempos muestreados. Esta evidencia sugiere que el gen podría estar involucrado en una respuesta inmediata al estrés por calor y en otra respuesta a largo plazo durante la recuperación.

Por otro lado, la figura 5.12 muestra los resultados obtenidos luego de llevar a cabo reacciones de RT-qPCR hojas de plantas expuestas a almacenamiento refrigerado a 10 °C. La

expresión del transcripto se ve inducida en hojas adultas, luego de 12 h de exposición al frío y luego de 24 h decae.

Cabe destacar que existen similitudes en el efecto de estímulos de altas y bajas temperaturas sobre los niveles de ARNm *PpTRAF* y *AtTRAF*, a pesar de que sucedan en sistemas vegetales muy diferentes. Estos resultados sugieren una posible funcionalidad de estos factores desconocidos frente a este tipo de condiciones ambientales, dos de ellas (R y TT) parte de la cadena productiva de fruta fresca.



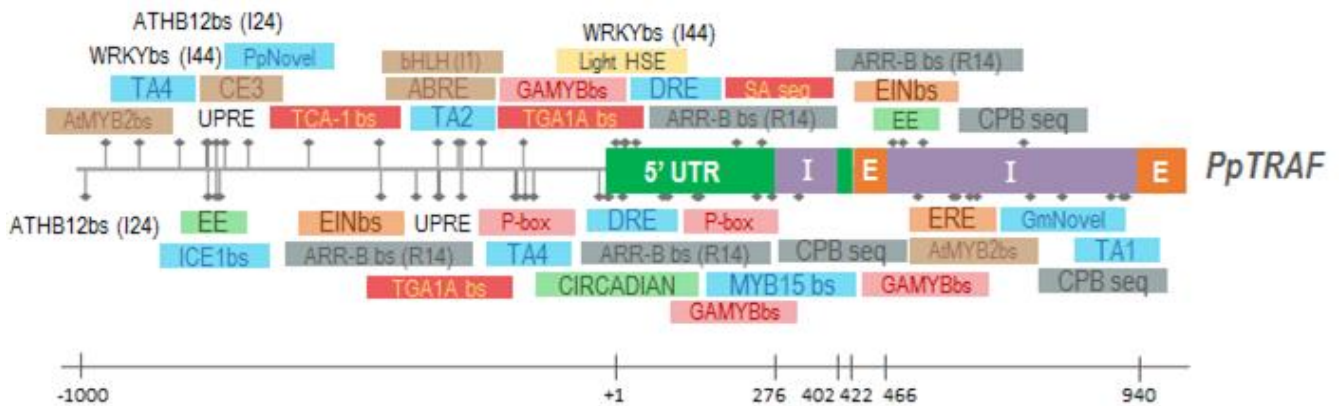
**Figura 5.12 Expresión génica de *AtTRAF* a nivel de transcripto en *A. thaliana Col-0* frente a bajas temperaturas.** Plantas de 25 d cultivadas en suelo fueron expuestas por 24 h a 10 °C y se tomaron muestras foliares antes (0) del mismo y a las 12 y 24 h de iniciada la incubación. La expresión se calculó mediante la fórmula  $2^{-\Delta Cq}$  (Cq, ciclo de cuantificación) y se normalizó a aquella correspondiente al gen de referencia *UBQ10*. Se graficaron los promedios y los desvíos de los resultados obtenidos a partir de al menos tres réplicas biológicas. Letras distintas indican valores estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

#### 5.3.4. Análisis *in silico* de la región del inicio transcripcional de los genes *PpTRAF* y *AtTRAF*

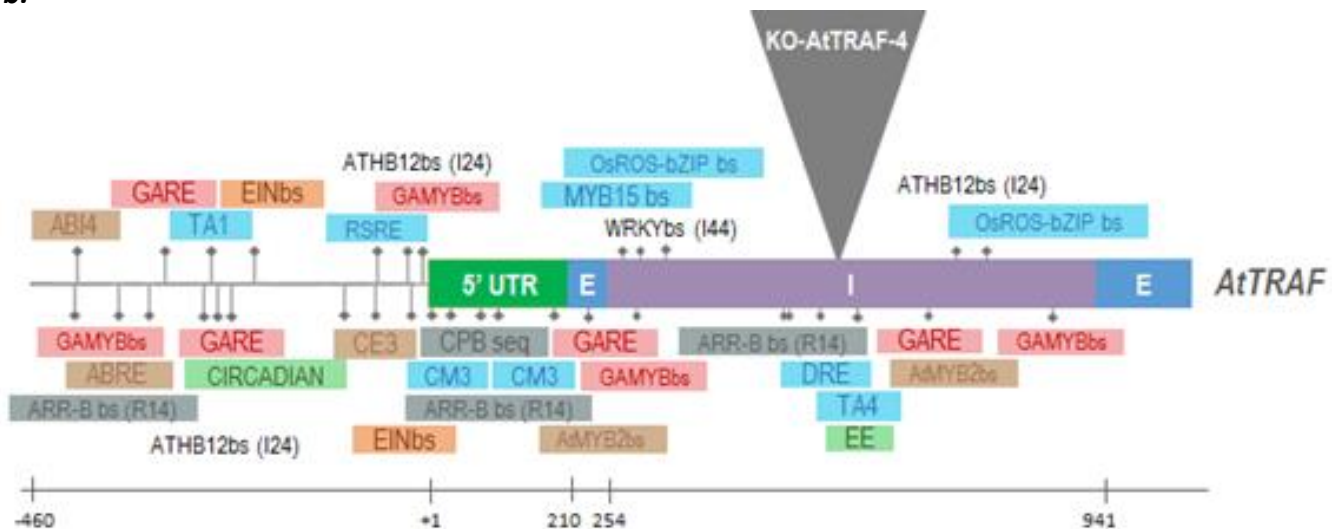
Para indagar acerca del inicio transcripcional de los genes en estudio y su relación con los aumentos observados por estímulos de temperatura (si bien mecanismos post-transcripcionales podrían intervenir adicionalmente), se exploraron los sitios de unión para FTs en las regiones promotoras e intrónicas cercanas al inicio transcripcional, para ambos *PpTRAF* y *AtTRAF*. Se analizaron secuencias corriente arriba al primer intrón (dentro del ADNc) inclusive, alcanzando hasta 2000 pb upstream al inicio transcripcional (Phytozome). Los resultados se observan en la figuras 5.13a y b.



a.



b.



**Figura 5.13 Esquemas simplificados de las regiones de inicio transcripcional de *PpTRAF* (a) y *AtTRAF* (b).** Se realizaron análisis en busca de motivos conocidos incluidos en PASP db y detallados en la tabla 4.4 (*cisAnalyzer*). Se visualizan elementos *cis* desde -1000 pb hasta el primer intrón de *PpTRAF* y desde -460 pb hasta la posición equivalente de *AtTRAF* (debido a la superposición de un gen contiguo), aunque se discuten en el texto motivos encontrados corriente arriba. Se señala el sitio de inserción del ADN-T en el primer intrón de *AtTRAF* y, con rombos, las posiciones de los motivos encontrados. Diferentes colores representan grupos de motivos relacionados: celeste, frío; amarillo, luz; naranja, Et; verde, ritmo circadiano; marrón, sequía y ABA; rosa, GA; gris, CKs; sin color, sitios para familias de FTs, incluidos aquellos presentes en la base de datos construida en la presente tesis (capítulo 4). bs; binding site (sitio de unión para FT).

A simple vista, numerosos procesos podrían estimular el inicio transcripcional de los genes *TRAF* en sus sistemas vegetales, incluidos señalizaciones por hormonas y estímulos abióticos.

Las inducciones por frío observadas para *PpTRAF* y *AtTRAF* se podrían deber a la presencia de uno o más elementos *cis* con funcionalidad frente a este estímulo: DRE (para FTs CBF/DREB; Vogel y col., 2005), ICE1bs (Benedict y col., 2006), CGCG-box/RSRE (para CAMTAs; Doherty y col., 2009), MYB15bs (Agarwal y col., 2006), TA1, TA2, TA4 y TA5 (posibles sitios de unión para OsMYBS3; Su y col., 2010), OsROS-bZIPbs (Cheng y col., 2007), CM1 y CM3 (conservados en los promotores *CBF2* y *ZAT12* inducibles por frío; Doherty y col., 2009). Adicionalmente, los motivos

OsNovel y GmNovel descriptos por Maruyama y col. (2012) y PpNovel, por Tittarelli y col. (2009), respectivamente, también podrían contribuir. La ocurrencia de PpNovel en este promotor inducible por refrigeración en duraznos, suma más evidencias acerca de su funcionalidad como elemento *cis*. Se suman, a los motivos directamente relacionados con frío, ABRE (con un rol comprobado frente a deshidratación y en la señalización de ABA), reportado de actuar acoplado a DRE en ciertos promotores inducibles por bajas temperaturas (Hannah y col., 2005; Maruyama y col., 2012), EINbs y ERE, debido al efecto negativo del Et en la tolerancia al congelamiento (Shi y col., 2012) aunque positivo en frutos frente al CI (Wang y col., 2017) y aquellos relacionados a CKs, debido al rol de FTs ARR-A (afectados por Et, Shi y col., 2012) en la aclimatación al frío (Jeon y col., 2010; Jeon y Kim, 2013). En este último caso, se podría incluir también a ARR-B bs, asociado al TED R14 de nuestra base de tratamiento térmico (capítulo 4), debido a la regulación de los FTs ARR-B sobre aquellos ARR-A (O'Brien y Benková, 2013).

Es interesante remarcar la ausencia conservada de motivos HSE clásicos que justifiquen el aumento luego de aplicar altas temperaturas. Sin embargo, como se discutió en el capítulo 4, LightHSE sí está conservado (no mostrado pero encontrado corriente arriba) y podría permitir la acción de factores HSFs sobre estos promotores. También se puede considerar la funcionalidad de DREs en la respuesta de estos promotores al calor, ya sea por la acción de DREB2A (Sakuma y col., 2006) y ERF1 (Cheng y col., 2013) o por la inducción por calor de los CBFs (capítulo 4).

Luego, es de interés destacar, que motivos de respuesta a ácido salicílico (SA), CKs, GAs, ABA y ritmo circadiano se encuentran conservados en los promotores de los genes *TRAF* en estudio. Acerca del SA, implicado en la respuesta a patógenos (An y Mou, 2011), *PpTRAF* presenta importantes motivos relacionados (que se pueden observar en la figura) mientras que *AtTRAF* solamente posee los mismos (SA seq.) en regiones corriente arriba (no mostrado en la figura). Por otro lado, es destacable la conservación de motivos de respuesta a GAs y ABA. Esto condice con lo observado en BAR y ExPath ya que estas fitohormonas afectan los niveles del transcripto *AtTRAF*.

Análisis experimentales permitirían determinar la importancia funcional de los motivos y qué FT o FTs participan en su regulación. En el caso de la respuesta a frío, investigar esos aspectos permitiría ubicar a *PpTRAF* y *AtTRAF* dentro de algún regulón de respuesta al frío conocido (no reportado hasta el momento) o evidenciar nuevos mecanismos.

### 5.3.4.1. Comparación de secuencias promotoras y codificantes de *PpTRAF* provenientes de las variedades en estudio

Las diferencias intervariedades en la expresión de *PpTRAF* frente a la refrigeración a 0 °C por X d (RX), podrían indicar mutaciones en las regiones encargadas del inicio transcripcional, entre otras diferencias. Además, la secuencia genómica que fue analizada en la sección anterior, proviene de la variedad Lovell (Phytozome). Para analizar las secuencias codificantes y los promotores de *PpTRAF* en las variedades en estudio, se amplificaron y clonaron las mismas para compararlas a nivel de estructura primaria (ver tabla 3.9 por cebadores).

Se amplificó el ADNc de *PpTRAF* a partir de muestras de ARN retrotranscritas, provenientes de frutos cosechados de las variedades DX, EL, FD y R2 y de frutos tratados térmicamente de la variedad DX. En todos los casos, se identificó solamente *PpTRAF* sin cambios (aunque no se descarta la existencia de *PpTRAF2*). Tampoco se observaron variaciones en la secuencia promotora y 5'UTR (se amplificaron 1280 pb desde el inicio traduccional), lo que indica que las diferencias observadas en las variedades no se deben a mutaciones en elementos *cis*, aunque podrían existir diferencias en otras regiones (incluso intrónicas) y/o podrían deberse a otros mecanismos (post-transcripcionales o epigenéticos) o diferencias en los factores que actúan en *trans* sobre dichas secuencias.

### 5.3.5. Ensayos de complementación funcional de *PpTRAF* y *AtTRAF* *in vivo* en cepas de *E. coli*

Se realizaron complementaciones funcionales en cepas particulares de *E. coli* para evaluar el posible rol *in vivo* de *PpTRAF* de duraznos y *AtTRAF*, su ortólogo no caracterizado de *A. thaliana*.

#### 5.3.5.1. *E. coli* como sistema *in vivo* y su aclimatación al frío

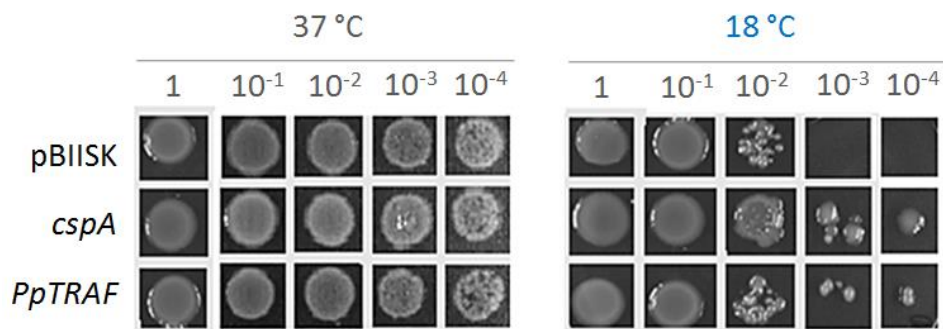
Cuando *E. coli* crece a bajas temperaturas (entre 10 y 15 °C) desarrolla una respuesta que involucra la detención del crecimiento, el aumento en la fluidez de la membrana plasmática y la producción de chaperonas de ARN para contrarrestar la sobreestabilización de especies de ARNm debida al frío (Yamanaka, 1999; Phadtare e Inouye, 2004). El gen *cspA* (*cold shock protein A*), cuyo producto es una proteína de unión a ácidos nucleicos que funciona como ARN chaperona, es uno de los nueve parálogos (*cspA-I*) de *E. coli* (Yamanaka y col., 1998) y se induce marcadamente frente al estrés por bajas temperaturas (Goldenberg y col., 1996; Brandi y col., 1996).

Xia y col. (2001) demostraron la función de *cspA*, *B*, *E* y *G* en la aclimatación al frío de *E. coli* al observar que bacterias cuádruple mutantes (cepa BX04) en los mismos eran altamente susceptibles al frío (poseían crecimiento defectuoso y sus células carecían de división celular). La complementación de BX04 con los ADN codificantes *csps* (excepto *cspD*) por separado, restaura la

capacidad de *E. coli* para aclimatarse a las bajas temperaturas casi en su totalidad. El sistema que ofrece la cepa BX04 de *E. coli* fue utilizado con éxito para el análisis *in vivo* de proteínas provenientes de diversas especies vegetales con posible funcionalidad como ARN chaperona bajo estrés por frío. Es el caso de proteínas tales como CSDPs y GRPs (Kim y col., 2007a).

### 5.3.5.2. Ensayos de complementación en *E. coli* BX04, prueba de aclimatación a bajas temperaturas

Con la hipótesis de que *PpTRAF*, cuya arquitectura proteica posee un único dominio proteico con ZFs del tipo TRAF, podría estar implicado en el metabolismo del ARN, se propuso la complementación funcional de la cepa bacteriana BX04. Luego de transformar estas células bacterianas, se inspeccionó diariamente su crecimiento a bajas temperaturas y se registraron los resultados que se muestran en la figura 5.14.

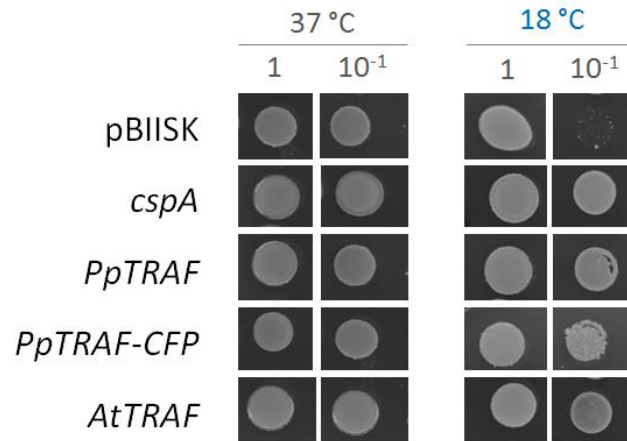


**Figura 5.14** Habilidad de complementación del ADNc *PpTRAF* en la cepa bacteriana BX04 de *E. coli* sensible al frío. El crecimiento de las bacterias BX04 transformadas con el vector pBIISK(-) vacío o portando los ADNcs de *cspA* o *PpTRAF* se evaluó inoculando 5 µl de cultivos diluidos seriadamente al décimo, a partir de un cultivo líquido inicial de  $DO_{600nm}=1,0$ , en placas de LB agar suplementadas con y sin IPTG 0,5 mM, ampicilina y kanamicina. Se fotografiaron el control de incubación luego de 16 h a 37 °C y las placas de prueba, luego de 15 d a 18 °C. pBIISK, pBluescriptIISK(-).

Como es visible, las diluciones inoculadas presentaron crecimientos similares en el control de incubación luego de 16 h a 37 °C. Cuando se expone los inóculos a 18 °C, se observa que el crecimiento se lentifica en general para las tres cepas pero aún más para el control negativo (cuádruple mutante *cspABCG* transformado con el vector pBIISK(-) vacío). El control positivo (la ARN chaperona inducible por frío *cspA*) complementa exitosamente el defecto en crecimiento de la cepa mutante BX04, demostrando la funcionalidad molecular requerida para restablecer el crecimiento normal de la cepa silvestre a bajas temperaturas. La similitud entre los crecimientos bacterianos de la cepa control positivo y la que expresaría *PpTRAF* denota la posible acción de *PpTRAF* como ARN chaperona ya que es capaz de complementar funcionalmente la susceptibilidad al frío de BX04. De la misma manera, se comprobaron las funcionalidades como ARN chaperona de

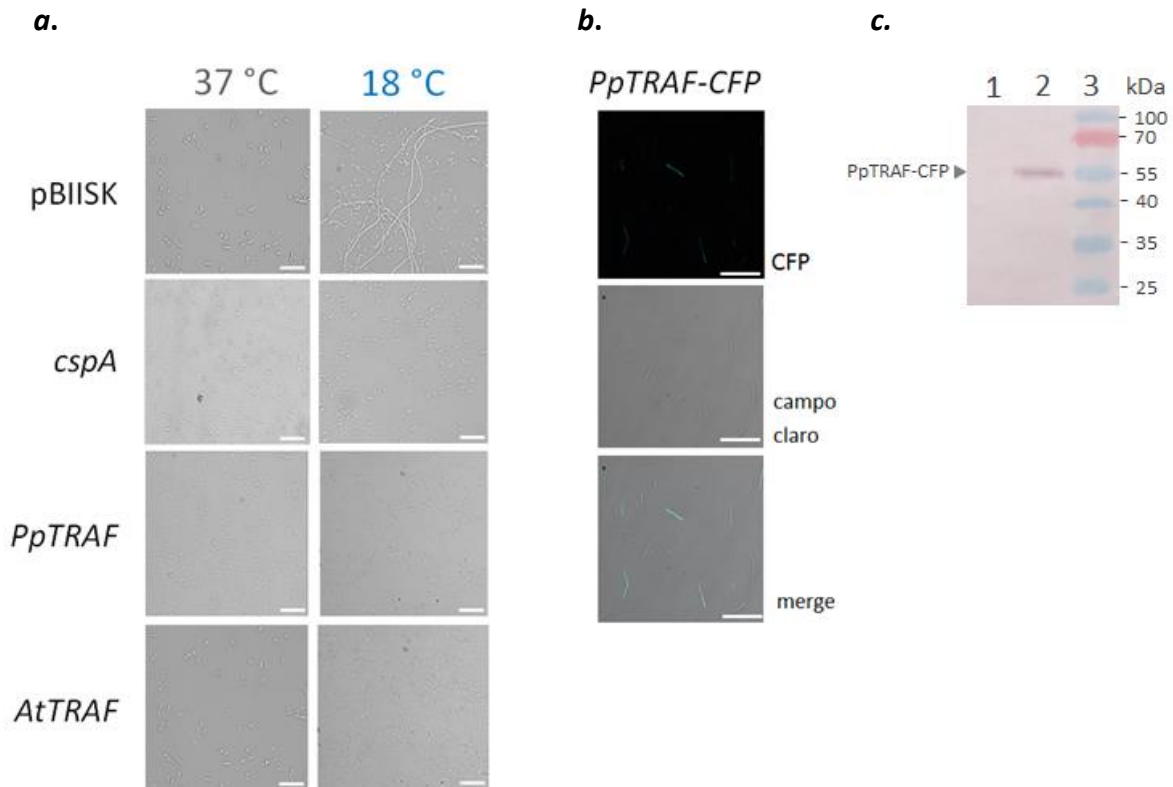
los ADNcs de *AtTRAF* y de la fusión traduccional PpTRAF-CFP, utilizada posteriormente para determinar localización subcelular (y subclonada en pBIISK(-) para esta prueba) (fig. 5.15).

El mismo experimento de complementación funcional fue reportado con resultados positivos para las ARN chaperonas CSDP1 y GRP7, entre otras con diferentes arquitecturas como se describió anteriormente (Kim y col., 2007a; Kwak y col., 2011).



**Figura 5.15 Habilidad de complementación de los ADNcs *PpTRAF*, *AtTRAF* y *PpTRAF-CFP* en la cepa bacteriana BX04 de *E. coli* sensible al frío.** El crecimiento de las bacterias BX04 transformadas con el vector pBIISK(-) vacío o portando los ADNcs de *cspA*, *PpTRAF*, *AtTRAF* y *PpTRAF-CFP* se evaluó inoculando 5  $\mu$ l de cultivos diluidos al décimo, a partir de un cultivo líquido inicial de  $DO_{600nm}=1,0$ , en placas de LB agar suplementadas con y sin IPTG 1 mM, ampicilina y kanamicina. Se fotografiaron el control de incubación luego de 16 h a 37 °C (ON) y las placas de prueba, luego de 3 d a 18 °C. pBIISK, pBluescriptIISK(-); ON, overnight.

Sumando a las evidencias anteriores, la observación al microscopio de preparaciones frescas de las cepas construidas crecidas a 37 o 18 °C (fig. 5.16a) revela el defecto en crecimiento de la cepa BX04 original (no mostrado) y del control negativo, que carecen de la funcionalidad ARN chaperona y, al poseer un defecto en citocinesis, presentan células alargadas cuando crecen a 18 °C. Con ciertas variaciones, *CspA*, *PpTRAF* y *AtTRAF* presentan recuperación de la morfología normal. Cabe destacarse que, en otros reportes, imágenes de la morfología celular de BX04 complementada por diversas ARN chaperonas vegetales han sido suplementarias a la observación del crecimiento de las células ya que se desconocen las causas moleculares de este fenotipo. La observación de fluorescencia de CFP en células BX04 transformadas con PpTRAF-CFP y expuestas al frío (fig. 5.16b), indicaría la presencia del producto traducido en esta cepa con complementación funcional positiva, lo que sugiere que el mismo sería el responsable de la función ARN chaperona. Adicionalmente, un Western blotting anti-CFP luego de SDS-PAGE de los extractos proteicos solubles totales de esta cepa (ver sección 3.7.6), permitió verificar la integridad del producto de fusión en estas condiciones (fig. 5.16c).

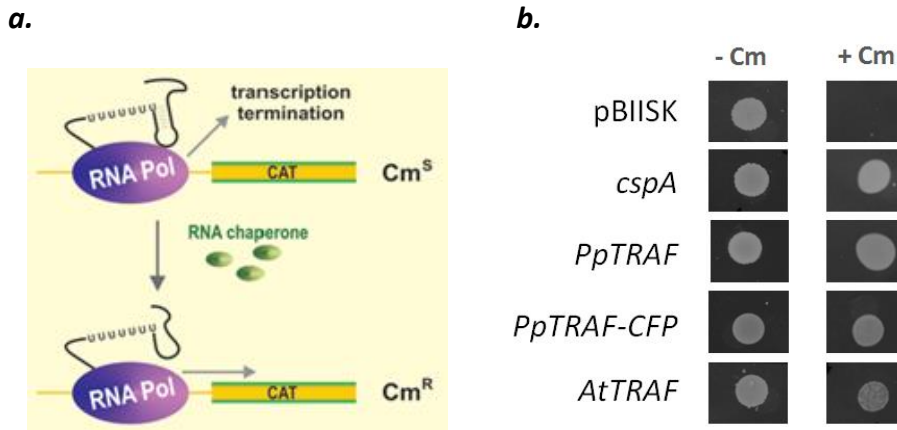


**Figura 5.16 Defecto en la división celular de la cepa BX04 a bajas temperaturas y su complementación por *PpTRAF* y *AtTRAF*.** Verificación de la traducción e integridad del producto *PpTRAF-CFP*. *a*) Se observan al microscopio óptico (40x) bacterias BX04 transformadas con el vector pBIISK(-) vacío o portando los ADNcs de *cspA*, *PpTRAF* o *AtTRAF* crecidas en presencia de los correspondientes antibióticos y 0,5 mM de IPTG y en condiciones control (ON a 37 °C) y de bajas temperaturas (7 d 18 °C). *b*) Se observan al microscopio confocal de fluorescencia, células BX04 transformadas con *PpTRAF-CFP*. Las barras indican 20  $\mu$ m. *c*) Inmunodetección de CFP en muestras bacterianas del ensayo de complementación. Western blotting anti-CFP (revelado de PA) luego de SDS-PAGE de 15  $\mu$ g de extractos proteicos solubles totales de BX04-pBIISK(-) (calle 1) y BX04-pBIISK(-)-*PpTRAF-CFP* (2) incubadas por 10 d a 18 °C en presencia de los correspondientes antibióticos y 0,5 mM de IPTG; marcador de peso molecular preteñido (calle 3). pBIISK, pBluescriptIISK(-); ON, overnight; PA, fosfatasa alcalina; kDa, kilo Dalton.

### 5.3.5.3. Ensayos de antiterminación de la transcripción en *E. coli* RL211

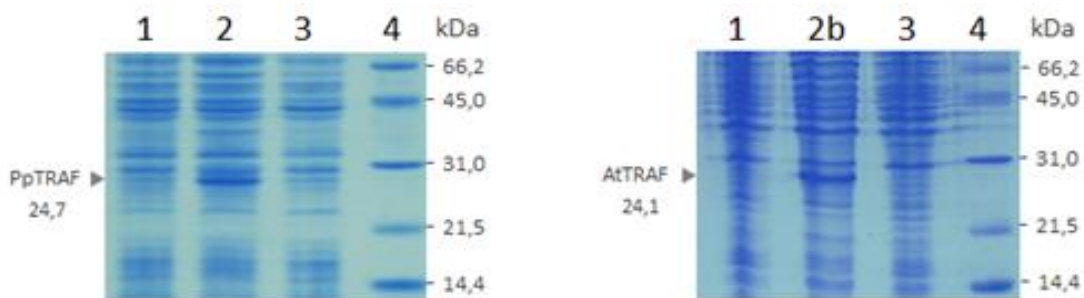
Además de BX04, se utilizó la cepa RL211 (cedida por el Dr. R. Landick, Landick y col., 1990) para probar actividad ARN helicasa. La misma, cuando es transformada con el ADNc de interés, permite evaluar la antiterminación de la transcripción del gen *cat*, indispensable para la resistencia bacteriana al antibiótico cloranfenicol. Los resultados obtenidos se observan en la figura 5.17.

El ensayo de crecimiento resultó positivo para *PpTRAF* y *AtTRAF*, reflejando su capacidad de intervenir en la resolución de la estructura antiterminadora, permitiendo la correcta expresión del gen de resistencia a Cm. Esto podría sugerir la efectiva funcionalidad de TRAF en la antiterminación de la transcripción en sistemas vegetales *in vivo* y/o podría ser que en células de duraznos y de *A. thaliana* se desempeñe como una nueva RBP vegetal.



**Figura 5.17 Habilidad de complementación de los ADNcs de *PpTRAF*, *AtTRAF* y *PpTRAF-CFP* en la cepa bacteriana RL211 de *E. coli* prueba de actividad ARN helicasa. a)** Esquema del funcionamiento del sistema que ofrece la cepa RL211. **b)** El crecimiento de las cepas RL211 transformadas con pBIISK(-) vacío o portando los ADNcs de *cspA* y *PpTRAF* se evaluó inoculando 5  $\mu$ l de cultivos  $DO_{600nm} = 1$ , en placas de LB agar suplementadas con IPTG 0,6 mM, ampicilina y en presencia (+ Cm) o ausencia (- Cm) del antibiótico cloranfenicol. Se fotografiaron el control sin Cm luego de 16 h a 37 °C (ON) y la segunda placa se fotografió luego de 3 d de la inoculación. pBIISK, pBluescriptIISK(-); ON, overnight; Cm, cloranfenicol.

A modo de sumar evidencias de la presencia de los productos génicos de interés en las bacterias con fenotipo de antiterminación, se realizó la separación mediante SDS-PAGE de proteínas solubles totales de las cepas RL211-pBIISK(-) y RL211-pBIISK(-)-*cspA*, -*PpTRAF* y -*AtTRAF* (fig 5.18). Se pudieron identificar bandas peptídicas diferenciales entre las cepas de trabajo, indicando putativamente la presencia de las proteínas *PpTRAF* y *AtTRAF* esperadas en las bacterias correspondientes.



**Figura 5.18 Análisis del patrón de bandas proteicas de extractos solubles totales de las cepas RL211 del ensayo de antiterminación transcripcional.** Se observan los revelados con Coomassie luego de dos SDS-PAGEs en los que se sembraron 20  $\mu$ g de proteínas totales obtenidas a partir de las cepas RL211-pBIISK(-) (1), RL211-pBIISK(-)-*cspA* (3), -*PpTRAF* (2) y -*AtTRAF* (2b) luego de repetir los ensayos descritos en medio líquido con Cm y 0,6 mM IPTG a 37° C ON. Se utilizó el marcador Low Range (Biorad) (4). Se señalan los tamaños esperados para las proteínas *PpTRAF* y *AtTRAF*. pBIISK, pBluescriptIISK(-); ON, overnight; Cm, cloranfenicol; kDa, kilo Dalton.

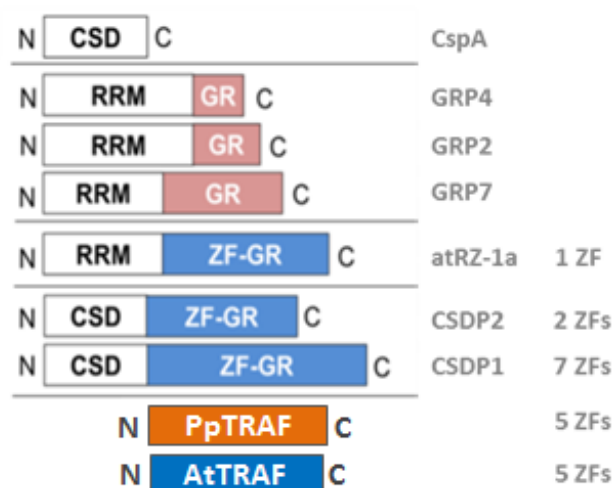
De ambos ensayos *in vivo*, en BX04 y RL211, surge la idea de que *PpTRAF* y *AtTRAF* podrían participar de al menos algún proceso incluido en metabolismo del ARN, pudiendo intervenir en la regulación de la expresión génica. Si bien su funcionalidad como ARN chaperona podría no estar



relacionada con los mecanismos de CspA y sus parálogas, dadas las diferencias en arquitectura de dominios (ver figura 5.1), la misma resultó efectiva e incluso en bacterias de *E. coli*, un sistema tan diferente a las células eucariotas vegetales.

La complementación del rol funcional de CspA en BX04 y en bajas temperaturas, sugiere una capacidad estructural intrínseca de las proteínas en estudio que les permite desempeñar sus roles de ARN chaperona en estas condiciones. Esto condice con su inducción por bajas temperaturas en sistemas vegetales y propone acciones en el mantenimiento/establecimiento del correcto plegamiento de ARNs para su necesaria traducción frente a estrés. La antiterminación de la transcripción en RL211 (la cual no es una mutante en ARN chaperonas pero sí requiere de una función ARN chaperona adicional) involucra contrarrestar la estabilidad del terminador *trpL* específicamente, lo que sugiere la posible interacción de las proteínas TRAFs con esta estructura.

De la figura 5.1, se puede observar que el extremo C-terminal de las proteínas CSDPs, con múltiples ZFs del tipo CCHC, resulta ser la arquitectura proteica más parecida (entre las ARN chaperonas vegetales reportadas) a AtTRAF y PpTRAF. Cabe destacar que los ZFs de CSDPs poseen menores longitudes entre las secuencias Cys-X<sub>2</sub>-Cys y His-X<sub>2</sub>-Cys. Esta observación sugiere la interacción inespecífica de los mismos con sus ácidos nucleicos blanco en similitud con lo reportado para CSDPs, y a diferencia de proteínas con RRM como GRPs (Kim y col., 2007a). Por ello, proponemos como nueva arquitectura a la observada en *AtTRAF* y *PpTRAF*: no rica en Gly y con 5 ZFs CCHC de tipo TRAF, y capaz de actuar como ARN chaperona (fig. 5.19). Las proteínas TZFs poseen ZFs en tándem (de tipo C<sub>3</sub>H) y se reportaron con un rol en el metabolismo del ARN durante desarrollo y respuestas a estrés (Bogamuwa y Jang, 2014), aunque no son ARN chaperonas.



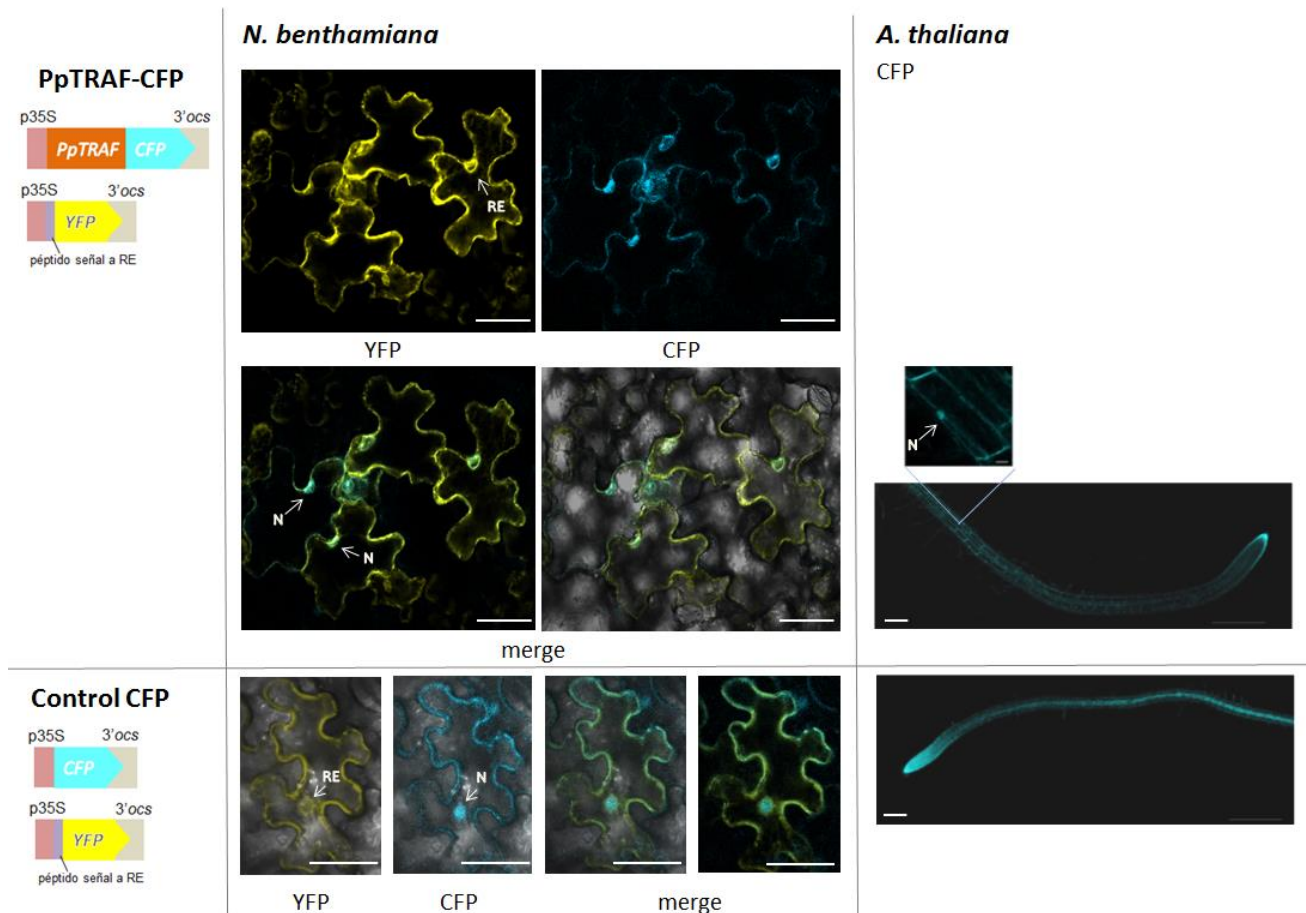
**Figura 5.19** Esquema representativo de las arquitecturas de ARN chaperonas AtTRAF y PpTRAF en contraste con GRPs vegetales y CSPs de *E. coli*. Adaptada de Bocca y col. (2005) y Kim y col. (2007a). RRM, RNA-Recognition Motif; GR, region Glycine-Rich; ZF-GR, region Glycine-Rich con Zn Finger(s); CSD, Cold-Shock Domain.



### 5.3.6. Determinación de la localización subcelular de los productos génicos PpTRAF y AtTRAF

El metabolismo del ARN incluye variados procesos moleculares que involucran diversas proteínas y especies de ARN y que son realizados en localizaciones celulares diferentes. Las ARN chaperonas son muy diversas en estructura y mecanismo de acción, pudiendo participar como accesorios durante transcripción y traducción. Recordamos que las predicciones *in silico* señalaron la posible localización de AtTRAF, PpTRAF y ortólogos (tabla 5.4) en citosol y/o núcleo celulares.

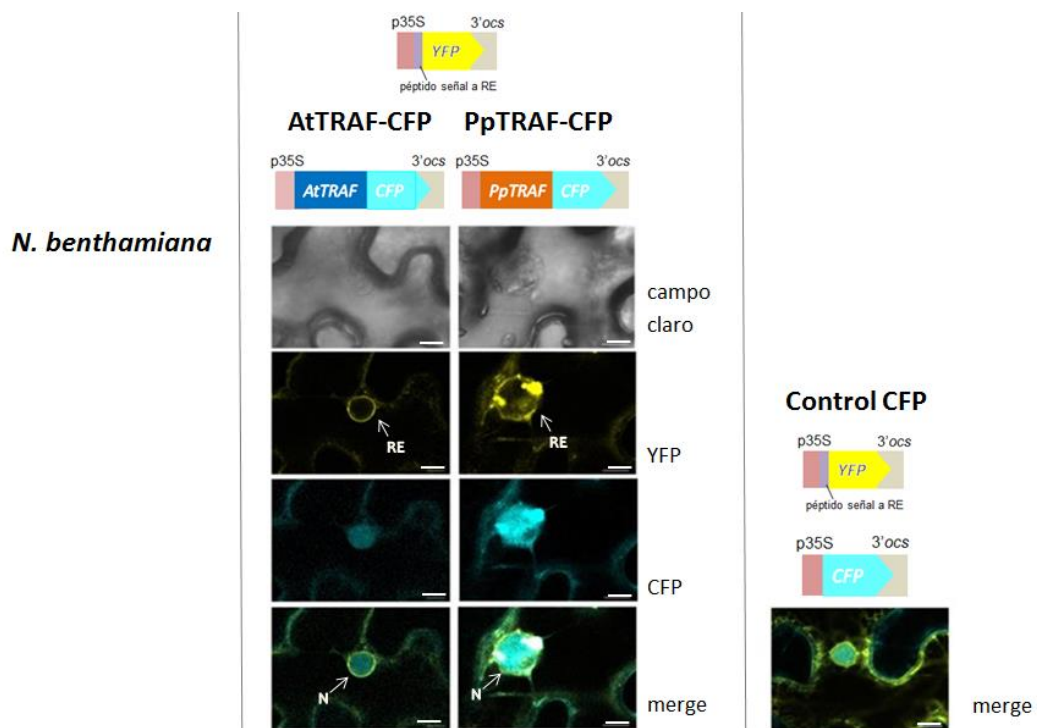
En el presente trabajo, se decidió determinar experimentalmente la localización subcelular de PpTRAF y AtTRAF aplicando: fusión traduccional a CFP (CFP hacia extremo C-terminal) en el vector binario ER-cb y su expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* y estable en plantas de *A. thaliana*. Las imágenes en las figuras 5.20 y 5.21 permiten observar los resultados obtenidos. Es interesante recordar que los transcritos *PpTRAF* y *AtTRAF* fueron identificados ubicuos en los diferentes órganos evaluados, incluidas hojas maduras de sus respectivas especies.



**Figura 5.20** Localización subcelular de PpTRAF en células foliares de *N. benthamiana* y raíces jóvenes de *A. thaliana*, en condiciones de crecimiento normales. Se observan imágenes de microscopía confocal de fluorescencia con fluoróforos YFP y CFP, provenientes de los constructos detallados a izquierda. En el centro, se pueden visualizar células epidérmicas de hoja de *N. benthamiana* con expresión transitoria de PpTRAF-CFP e YFP-RE como marcador (delimita la zona nuclear) o del control CFP e YFP-RE (3 d luego de la infiltración). A derecha, raíces y células radiculares de *A. thaliana* de 15 d, con expresión estable PpTRAF-CFP o control CFP (generación T1, por lo que crecieron en MS-agar en presencia del agente de selección glufosinato). Las barras representan 50  $\mu\text{m}$ . N, núcleo con señal CFP; RE, retículo endoplásmico; merge, superposición de canales sobre campo claro u oscuro.

La localización determinada para PpTRAF-CFP y AtTRAF-CFP es observable al microscopio en núcleo y citosol, aunque también se observan señales provenientes de retículo endoplásmico que colocalizan con YFP-RE (no mostrado en detalle). Para evidenciar la señal de CFP nuclear, se adquirieron observaciones en distintos planos lo que permitió encontrar aquellos que provienen de un corte transversal de la organela nuclear, pudiéndose observar (como en las figuras) la señal de CFP dentro de la misma y aquella de YFP-RE bordeándola en el mismo plano.

Debido a la similitud en la localización respecto al control, observada en múltiples compartimentos celulares, se procedió a analizar las imágenes obtenidas en el software Fiji, obteniéndose interesantes observaciones. Se registra una importante caída de la señal de CFP debida a las fusiones traduccionales (respecto al control de CFP sin fusión). Por otro lado, análisis exhaustivos permitieron determinar que, a pesar de observarse señal de CFP en diferentes compartimentos incluido el RE, existe una concentración de señal proveniente de las fusiones de PpTRAF y AtTRAF en la zona nuclear, lo que favorece su rol en esta localización. Más aún, otra diferencia observada en las transformantes estables de *A. thaliana* es la señal nuclear de PpTRAF-CFP únicamente en células de las zonas superiores de diferenciación radicular, mientras que el control es ubicuo a todo compartimento a lo largo de las diferentes regiones radiculares (fig. 5.20).



**Figura 5.21 Localización subcelular de AtTRAF y PpTRAF en células foliares de *N. benthamiana* en condiciones de crecimiento normales.** Se observan imágenes de microscopía confocal de fluorescencia con los fluoróforos YFP y CFP, provenientes de los constructos detallados. Se visualizan células epidérmicas de hoja de *N. benthamiana* con expresión transitoria de AtTRAF-CFP, PpTRAF-CFP o CFP junto a YFP-RE (imágenes tomadas 3 d luego de la infiltración). Las barras representan 10  $\mu$ m. N, núcleo con señal CFP; RE, retículo endoplásmico; merge, superposición de canales sobre campo oscuro.

Una verificación adicional realizada fue comprobar el origen de las señales fluorescentes observadas. Se realizó una inmunodetección específica anti-CFP y anti-YFP en muestras de hoja de *N. benthamiana* sin transformar, infiltradas con la mezcla de *A. tumefaciens* portando CFP y *A. tumefaciens*-YFP-RE, o infiltradas con la mezcla de *A. tumefaciens* portando PpTRAF-CFP y *A. tumefaciens*-YFP-RE. Los resultados observables en la figura 5.22 revelan que las bandas inmunoreactivas en hojas transformadas con PpTRAF-CFP provienen de la fusión traduccional por lo que se podría asignar el origen de la señal fluorescente a estos productos génicos. El marcador coinfiltrado YFP-RE y CFP sin fusión pueden observarse con tamaños esperados también. Esta evidencia indica que la caída de fluorescencia de CFP observada, la mayor concentración de señal en núcleos celulares respecto al total celular y el comportamiento diferencial en raíces en desarrollo en *A. thaliana* (solo presente en núcleos de células desarrolladas) se deben a los rasgos moleculares de PpTRAF, fusionada a la marca fluorescente.



**Figura 5.22 Inmunodetección de CFP e YFP en muestras de hoja transformadas y observadas al microscopio.** Western blot anti-CFP (revelado de PA) luego de SDS-PAGE de 15 µg de extractos proteicos solubles totales de hojas de *N. benthamiana* no transformadas (2 y 3) o cotransformadas transitoriamente con CFP e YFP-RE (6 y 7), o con PpTRAF-CFP e YFP-RE (4 y 5); marcador de peso molecular preteñido (1). Se presentan duplicados. PA, fosfatasa alcalina.

Por último, la habilidad de la fusión PpTRAF-CFP de complementar células BX04 en frío y RL211 en la antiterminación del gen *cat* (sección 5.3.5), indica que la misma es funcional como ARN chaperona aportando validez biológica a las observaciones de localización realizadas.

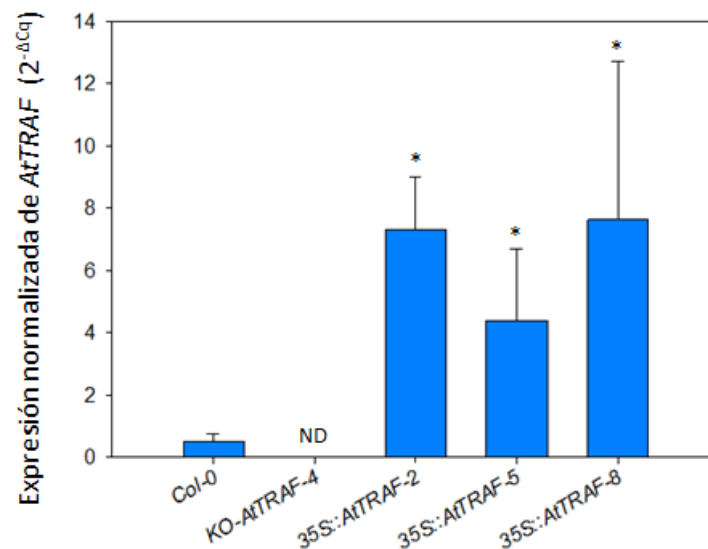
GRP7 y LOS4, ARN chaperona y DEAD-box ARN helicasa, respectivamente, han sido involucradas en el transporte de ARNs del núcleo al citosol por lo que un set de transcritos ven afectada su traducción al modificarse sus funcionalidades (Gong y col., 2005; Kwak y col., 2011). Las GRPs con un ZF atRZ-1a/b/c fueron descritas como nucleares e involucradas en el splicing y en la interacción con cromatina y otras proteínas (Wu y col., 2016). Un caso interesante es WCSP1: una CSDP de trigo localizada en el núcleo y el RE que podría estar asociada a la traducción en células foliares de trigo (Nakaminami y col., 2006).

Las evidencias recopiladas hasta el momento, sugieren la funcionalidad de PpTRAF y AtTRAF en procesos del metabolismo del ARN, en núcleos celulares y posiblemente en respuesta a

estímulos de temperatura aunque no se descartan interacciones con otro tipo de moléculas y/o cambios de localización en respuesta a estímulos.

### 5.3.7. Caracterización fenotípica de genotipos de *A. thaliana* relativos a *AtTRAF*, obtenidos en la presente tesis

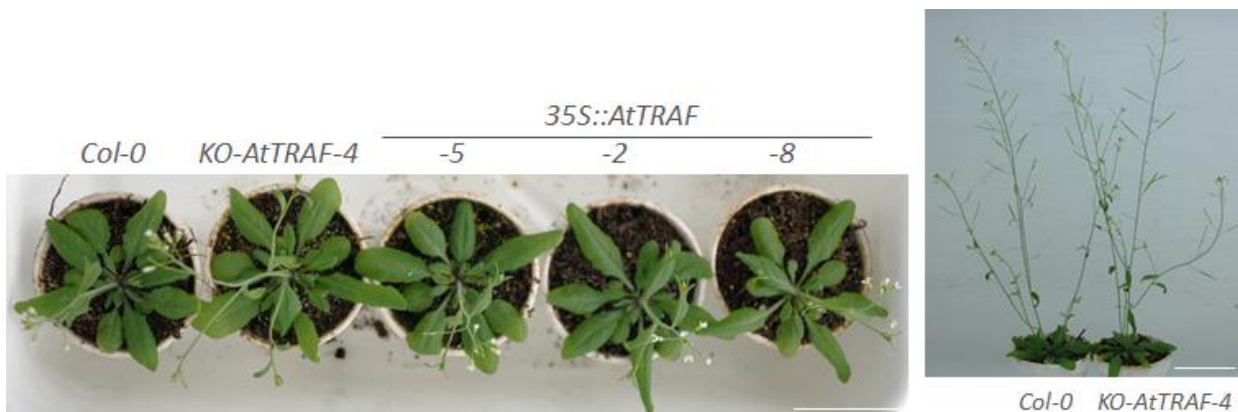
Duraznero carece de protocolos de transformación rápida y fiable, además de que su ciclo de vida contrasta en practicidad con el de *A. thaliana*. Para ahondar en la caracterización funcional de *AtTRAF* en particular, se obtuvieron semillas con inserción putativa de un ADN-T en su primer intrón (región codificante, ver figura 5.13). La línea de trabajo se denomina SALK\_125714, de ahora en más, llamada *KO-AtTRAF-4*. Se realizaron los procedimientos de selección de homocigotas para la inserción a partir del lote de semillas adquirido comercialmente. Por otro lado, líneas estables e independientes con ganancia de función de *AtTRAF* (*35S::AtTRAF-2*, *-5* y *-8*) fueron construidas mediante Floral Dip y utilizando el vector binario pGREENII portador de *AtTRAF* bajo el promotor 35S y el terminador 3' *ocs*. Antes de proceder con análisis fenotípicos, se verificaron los niveles del transcripto *AtTRAF* en hojas adultas de plantas *KO-AtTRAF-4* (demostrando que es una línea Knock-Out de este ARNm, de ahí su nombre) y *35S::AtTRAF*. La figura 5.23 muestra los resultados obtenidos.



**Figura 5.23** Expresión génica de *AtTRAF* a nivel de transcripto en *A. thaliana Col-0* y en los genotipos relacionados. Se tomaron muestras de hojas adultas (30 d) de los diferentes genotipos construidos. La expresión se calculó mediante la fórmula  $2^{-\Delta Cq}$  (Cq, ciclo de cuantificación) y se normalizó a aquella correspondiente al gen de referencia *UBQ10*. Se graficaron los promedios y los desvíos de los resultados obtenidos a partir de al menos tres réplicas biológicas de una o tres líneas construidas. El asterisco indica el valor estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ) respecto a *Col-0*. ND, No Detectado.

### 5.3.7.1. Caracterización fenotípica de líneas mutantes y sobreexpresantes de *AtTRAF* cultivadas en condiciones normales

Una vez obtenidas las líneas homocigotas mutantes y sobreexpresantes de *AtTRAF* se procedió a realizar diversos análisis fenotípicos con el fin de caracterizar las funciones del gen en estudio en estos sistemas vegetales. Primeramente, el cultivo de las líneas bajo estudio en condiciones normales, hasta completar su ciclo de vida, fue evaluado en suelo y en placa (MS-agar), en búsqueda de rasgos fenotípicos debidos a los genotipos. A nivel macroscópico no se apreciaron características fenotípicas diferenciales en el crecimiento o desarrollo de los órganos vegetales de las líneas mutantes o sobreexpresantes en *AtTRAF*, respecto a *Col-0* (fig. 5.24). Adicionalmente, se evaluaron parámetros fenotípicos durante el crecimiento y el desarrollo completos a bajas temperaturas (10 °C, no mostrado). Ninguna diferencia aparente pudo observarse entre los genotipos de interés. Esto indicaría que *AtTRAF* no intervendría naturalmente en los procesos generales de desarrollo evaluados o que lo hace con otras proteínas que deben modificarse adicionalmente para visualizar fenotipos diferenciales.



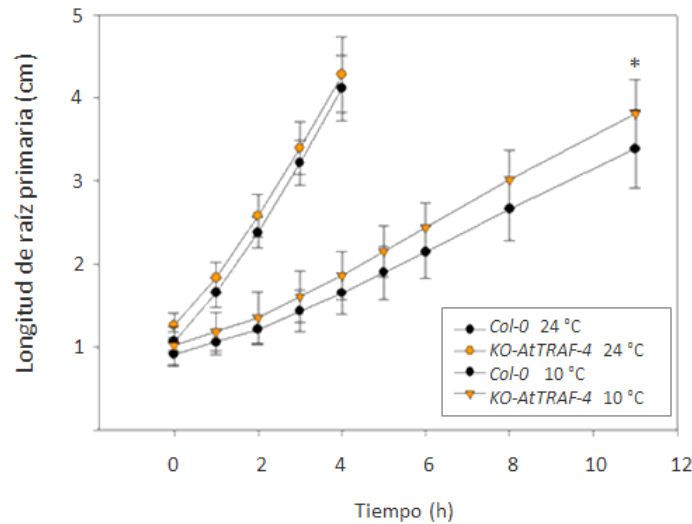
**Figura 5.24 Rasgos fenotípicos de los genotipos relativos a *AtTRAF* construidos en la presente tesis.** Se observan plantas de 35 d cultivadas en suelo. Las barras indican 5 cm.

A pesar de esto, nuevos análisis podrían llevarse a cabo evaluando rasgos a niveles celular o tisular, y/o inducidos por condiciones de crecimiento alternativas.

En las siguientes secciones, se podrán visualizar resultados relacionados a la capacidad de estos genotipos de elongar la raíz primaria y de germinar en condiciones de estrés.

### 5.3.7.2. Ensayo de elongación de raíz primaria de líneas mutante y sobreexpresantes de *AtTRAF* en condiciones de bajas temperaturas

A través de este ensayo fenotípico se estudió el efecto del estímulo de frío sobre la elongación de la raíz primaria de plántulas con niveles afectados de *AtTRAF* (fig. 5.25).



**Figura 5.25** Elongación de la raíz primaria de *Col-0* y *KO-AtTRAF-4* en condiciones normales o de bajas temperaturas. Se evaluaron al menos 30 individuos de cada genotipo por 4 d de crecimiento en MS-agar a 24 °C u 11 d a 10 °C. El asterisco indica un valor promedio de longitud de raíz primaria estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ).

Se puede observar la esperada lentificación del crecimiento vegetal por el tratamiento refrigerado, común a ambos genotipos ensayados. Luego de varias repeticiones, se pudo comprobar un aumento leve pero reproducible en el largo total de raíces primarias de *KO-AtTRAF-4* luego de 11 d a 10 °C y no se observaron diferencias respecto a *Col-0* a 24 °C.

Resultados similares se pudieron observar al calcular las velocidades de elongación y al relativizarlas a aquella promedio para *Col-0* (tabla 5.5).

**Tabla 5.5** Velocidades de elongación de la raíz primaria de *Col-0* y genotipos de *AtTRAF* en condiciones normales y de bajas temperaturas

Genotipo	Velocidad (mm/d)		Velocidad relativa a <i>Col-0</i>	
	4 d 24 °C	11 d 10 °C	4 d 24 °C	10 °C
<i>Col-0</i>	7,450 ± 0,702	2,326 ± 0,239		10 °C
	5,646 ± 0,413	2,295 ± 0,195		
<i>KO-AtTRAF-4</i>	7,433 ± 0,871	<b>2,468 ± 0,215 *</b>	0,997 ± 0,116	<b>1,061 ± 0,092 * (11 d)</b>
<i>35S::AtTRAF-2</i>	5,775 ± 0,331	2,293 ± 0,166	1,023 ± 0,058	<b>0,973 ± 0,070 * (4 d)</b>
<i>35S::AtTRAF-5</i>	5,693 ± 0,255	2,300 ± 0,118	1,000 ± 0,108	<b>0,903 ± 0,154 * (4 d)</b>
<i>35S::AtTRAF-8</i>	5,871 ± 1,818	2,367 ± 0,191	1,057 ± 0,092	<b>0,889 ± 0,210 * (4 d)</b>

Se señalan con fondo más oscuro los promedios y desvíos a los cuales se realizan las comparaciones estadísticas (velocidad de *Col-0* a 24 °C o a 10 °C a izquierda y relación de velocidades -vs. *Col-0*- a 24 °C, a derecha). Fila superior para *KO-AtTRAF-4* y fila inferior de *Col-0* para OEs. Los asteriscos señalan las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).



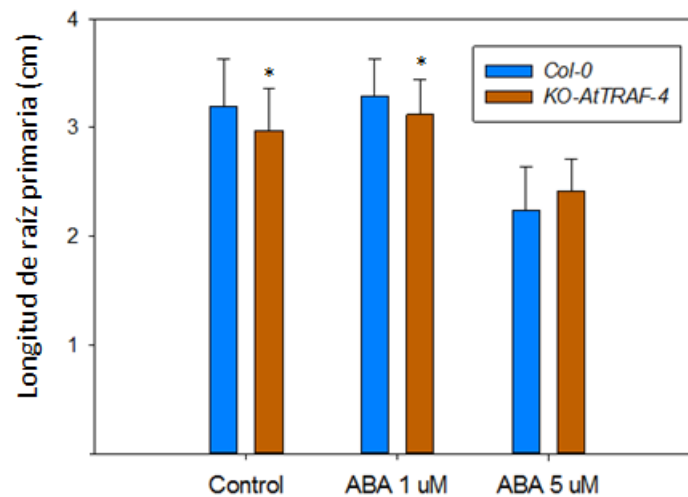
La relativización supone una forma distinta de observar el comportamiento de los genotipos: las relaciones en condición control se ven modificadas luego del tratamiento, sugiriendo un aumento en la velocidad de crecimiento para la línea mutante en esta condición. En la misma se pueden ver también los resultados para genotipos sobreexpresantes, sin diferencias respecto a *Col-0* en el largo total en ninguna condición pero sí mostraron velocidades relativas a *Col-0* menores en frío respecto a la misma relación a 24 °C.

Los resultados sugieren que los diferentes niveles del producto génico de *AtTRAF* afectan leve pero reproduciblemente la elongación de raíces primarias en respuesta al frío. En particular, se podría pensar en una función negativa de este factor en la elongación de raíces primarias en respuesta al frío. Nuevos experimentos para indagar acerca de los mecanismos subyacentes a este fenotipo y más aún, en cuanto a su relación con la funcionalidad ARN chaperona comprobada, están siendo explorados y son de interés. Estas observaciones conciben con la observada inducción transcripcional luego de la refrigeración y la presencia de elementos *cis* de respuesta al frío en su promotor e intrón.

Comparando con resultados reportados para otras ARN chaperonas, *atRZ-1a* presentó un comportamiento opuesto al de *AtTRAF*: su sobreexpresión favorece la elongación de raíces primarias a bajas temperaturas y su ausencia, un retardo en la misma (Kim y col., 2005). Otro caso opuesto a *AtTRAF* es el de líneas sobreexpresantes del dominio RRM de GRP7 que favorecen la elongación radicular en condiciones de frío (Kwak y col., 2011).

#### **5.3.7.3. Ensayo de elongación de raíz primaria de *Col-0* y *KO-AtTRAF-4* en presencia de ABA**

La secuencia promotora de *AtTRAF* (fig. 5.13b) presenta posibles motivos de respuesta a ABA y ha sido encontrada inducida en plántulas jóvenes en presencia de esta fitohormona (sección 5.3.3.1). Por ello, decidimos evaluar la elongación de raíces primarias de la mutante *KO-AtTRAF-4* en exposición a dos concentraciones de ABA: 1 y 5  $\mu$ M. En la figura 5.26 y en la tabla 5.6 se muestran los resultados obtenidos.



**Figura 5.26 Elongación de la raíz primaria de *Col-0* y *KO-AtTRAF-4* en ausencia o presencia de ABA.** Se evaluaron al menos 30 individuos de cada genotipo por 4 d de crecimiento a 24 °C en MS-agar sin o con 1 o 5  $\mu$ M de ABA adicionados. Asteriscos indican valores promedios de longitud de raíz primaria estadísticamente diferentes a *Col-0* en la misma condición ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 5.6 Velocidades de elongación de raíz primaria de *Col-0* y *KO-AtTRAF-4* en ausencia o presencia de ABA**

Genotipo	Velocidad (mm/d)			Velocidad relativa a <i>Col-0</i>		
	Control	1 $\mu$ M ABA	5 $\mu$ M ABA	Control	1 $\mu$ M ABA	5 $\mu$ M ABA
<i>Col-0</i>	7,978 $\pm$ 1,111	8,151 $\pm$ 1,039	5,604 $\pm$ 0,989			
<i>KO-AtTRAF-4</i>	<b>7,423 <math>\pm</math> 0,962 *</b>	7,803 $\pm$ 0,798	6,033 $\pm$ 0,751	0,930 $\pm$ 0,120	0,957 $\pm$ 0,097	<b>1,076 <math>\pm</math> 0,134 *</b>

Se señalan con fondo más oscuro los promedios y desvíos a los cuales se realizan las comparaciones estadísticas (velocidad de *Col-0* en condición control o en presencia de ABA a la izquierda y relación de velocidades -vs. *Col-0*- en condición control, a la derecha). Los asteriscos señalan las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

En la condición control, se encontraron diferencias de elongación total entre *KO-AtTRAF-4* y *Col-0*. Las mismas permanecen en presencia de 1  $\mu$ M ABA. Sin embargo, la diferencia desaparece cuando la elongación se realiza con 5  $\mu$ M ABA.

El análisis de velocidades permite evidenciar que la mutante elonga raíces primarias más lento que *Col-0* en condición control, pero esa diferencia es inexistente en presencia de ABA. Esta equiparación de velocidades en presencia de la fitohormona y el aumento de la relación  $V_{KO-AtTRAF-4}/V_{Col-0}$  en 5  $\mu$ M de ABA ( $V$ , velocidad de germinación), sugieren que *AtTRAF* podría actuar en respuesta a ABA para afectar negativamente la elongación de raíces primarias. Resultados similares fueron observados por Li y col. (2017) para los mutantes *ein3-1* y *ein2-1*, invitando a



analizar la posible relación de *AtTRAF* con estos FTs y con Et. Recordamos la presencia de motivos EINbs en las regiones regulatorias del inicio transcripcional de *AtTRAF* y *PpTRAF*.

Una observación interesante es que el efecto de la fitohormona ABA en la velocidad de crecimiento de raíces mutantes es similar al evidenciado en frío: **el genotipo *KO-ATRAF-4*, bajo las condiciones estresoras de frío o ABA, aumenta leve pero reproduciblemente la velocidad de elongación de la raíz primaria**. Esto indicaría que los rasgos genómicos salvajes en el loci *AtTRAF* son necesarios para limitar la elongación radicular en estas condiciones. Los motivos de respuesta a estos estímulos, observados en su región regulatoria, podrían intervenir en esa funcionalidad. Estudios adicionales de la expresión génica de *AtTRAF* en estas condiciones y en estos órganos (aunque la inducción por frío ya fue probada en hojas), así como también el análisis de las líneas sobreexpresantes, podrían sumar evidencias interesantes a estas hipótesis.

A modo comparativo, evidencias experimentales demuestran que plantas *los4* son más sensibles a ABA (Gong y col., 2005), las DEAD box helicinas STRS1 y STRS2 son inhibidas transcripcionalmente por ABA (Kant y col., 2007), *atRZ-1a* también es inducida por esta fitohormona (Kim y col., 2005) y *AtCSP2* (*CSDP2*) regula negativamente la germinación de *A. thaliana* mediante el control del nivel de ARNm de una enzima catabólica (Sasaki y col., 2013).

#### 5.3.7.4. Ensayo de viabilidad de semillas de líneas mutantes y sobreexpresantes de *AtTRAF* en condiciones de bajas temperaturas

La tabla 5.7 muestra las frecuencias de germinación obtenidas para los genotipos de trabajo en condiciones normales y frente a bajas temperaturas.

**Tabla 5.7 Frecuencias de germinación de los genotipos de trabajo**

	<i>Col-0</i>	<i>KO-AtTRAF-4</i>	<i>35S::AtTRAF-2</i>	<i>35S::AtTRAF-5</i>	<i>35S::AtTRAF-8</i>
<b>24 °C</b>	0,97 ± 0,01	0,98 ± 0,00	0,99 ± 0,03	0,99 ± 0,01	0,99 ± 0,01
<b>10 °C</b>	0,98 ± 0,01	<b>0,91 ± 0,01 *</b>	0,99 ± 0,08	1,00 ± 0,02	1,00 ± 0,04

Se muestran promedios de frecuencias obtenidas en las réplicas del ensayo (n=100 en cada repetición). El asterisco señala la frecuencia de germinación significativamente diferente a *Col-0* en la misma condición (test t realizado contra valores marcados en gris,  $p < 0,05$ ).

Los resultados muestran que la frecuencia de germinación a 24 °C es independiente de la presencia de *AtTRAF*, no observándose diferencias entre semillas *Col-0*, mutantes y sobreexpresantes. Sin embargo, *KO-AtTRAF-4* presentó una cantidad significativamente menor de semillas germinadas cuando las mismas son expuestas a frío. Las líneas sobreexpresantes no

presentan diferencias respecto a *Col-0* en frío. Estos resultados indican, en contraposición al rol negativo de *AtTRAF* respecto a la elongación de raíces a bajas temperaturas, una posible funcionalidad benéfica de *AtTRAF* para el desarrollo de la germinación a bajas temperaturas. En cuanto a otros factores que pueden contribuir al rol de *AtTRAF* en este proceso, podemos mencionar los elementos *cis* de respuesta a las fitohormonas ABA y GAs, relacionadas a la dormancia del embrión y al desarrollo de la germinación en sí. Nuevos estudios podrían sumar evidencias de su participación y de un efecto sobre *AtTRAF*.

Una ARN chaperona que presenta un comportamiento similar en cuanto a la germinación en frío de plantas con pérdida de su función, es *atRZ-1a* (Kim y col., 2005). Otros casos reportados, opuestos en cuanto a su acción, son *GRP2* que acelera la germinación en frío independientemente de ABA y GAs (Kim y col., 2007b) y *AtCSP2*, el último implicado en la regulación negativa de la germinación al afectar la acumulación de ABA y GAs (Sasaki y col., 2015).

#### 5.4. Conclusiones

La caracterización *in silico* y experimental de los factores *AtTRAF* y *PpTRAF* rindió resultados interesantes como los **primeros avances** en la investigación acerca de sus roles moleculares, hasta ahora **desconocidos en plantas**.

En cuanto a su expresión transcripcional, similares respuestas de **aumento de los ARNms *AtTRAF* y *PpTRAF*** ocurren en duraznos y hojas de *A. thaliana* como **efecto de tratamientos por altas o bajas temperaturas**. La existencia y conservación de múltiples elementos *cis* relacionados al frío en el inicio transcripcional de los genes *TRAF* (incluidos DREs) sugiere la activación de mecanismos que contribuirían a aumentar sus niveles. Se observaron otros motivos de interés, los cuales pueden justificar la inducción por calor (incluido LightHSE) o que señalan la relación con ABA, GAs, CKs y SA. Adicionalmente, la ubicuidad de ambos ARNms en distintos órganos vegetales sugiere que pueden requerirse para múltiples procesos fisiológicos.

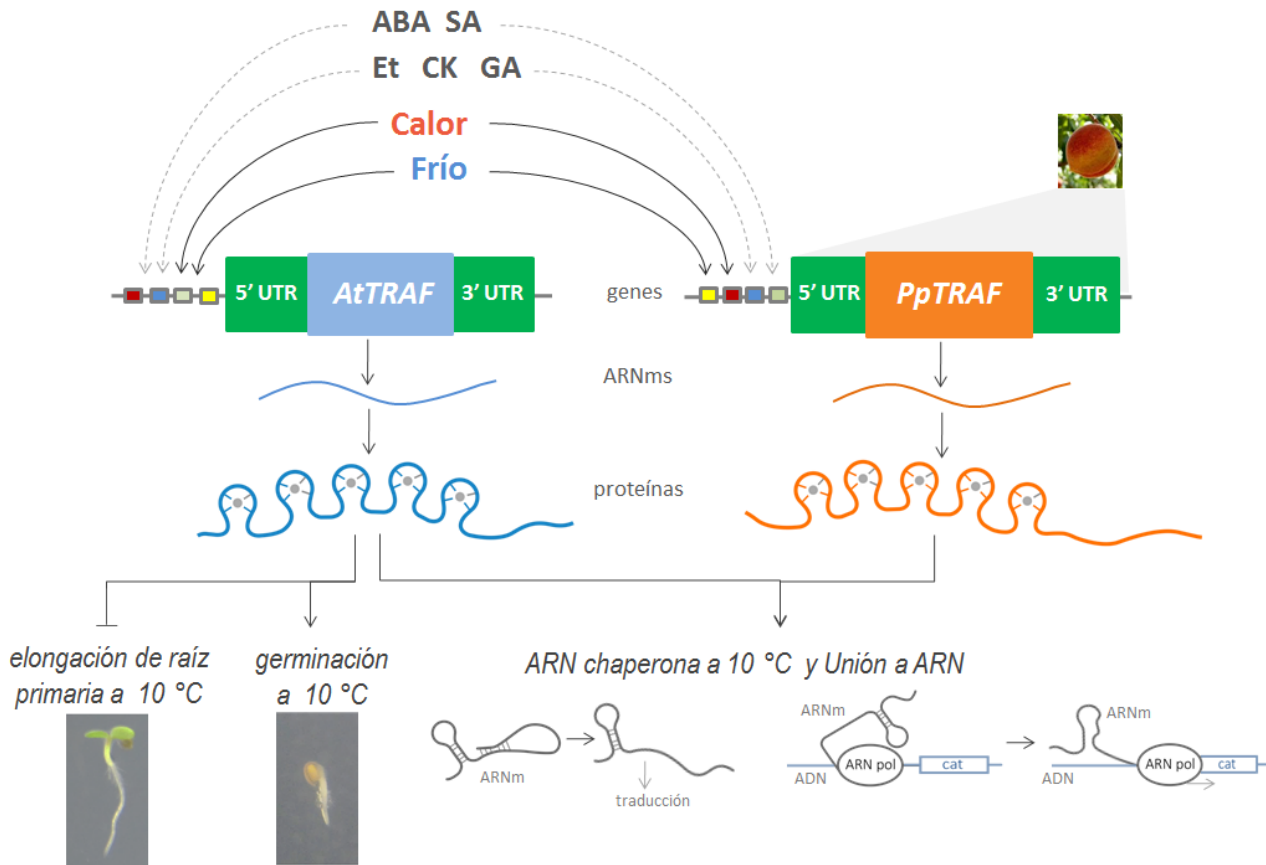
La complementación funcional *in vivo* de Csp's en *E. coli* BX04 a bajas temperaturas, sugiere una capacidad estructural intrínseca de las proteínas TRAF que les permite desempeñar un rol como **ARN chaperona** sin ser afectadas en estas condiciones. Esto propone roles en el mantenimiento/establecimiento del correcto plegamiento de ARNs, incluidos ARNms que deben ser traducidos para permitir la aclimatación al frío. Por otro lado, la antiterminación de la transcripción en RL211 sugiere la **interacción *in vivo* de las proteínas TRAFs con una estructura de ARN conocida** para desarmar su plegamiento y permitir la finalización de la transcripción.

Ninguna región rica en Gly y **5 ZFs** (4 CCHC y 1 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) dispuestos **en tándem**, pudieron evidenciarse como únicos elementos de estructura secundaria en *PpTRAF* y *AtTRAF*. Esto las propone como **nueva arquitectura ARN chaperona de plantas**. Las CSDPs, con una zona C-terminal GR-ZF desestructurada y con ZFs del tipo CCHC en tándem, son las únicas ARN chaperonas que presentan una región similar, lo que condice con la funcionalidad observada. La simplicidad en la arquitectura aportaría flexibilidad a la hora de interaccionar con sus blancos, rasgo común entre las RBPs.

La localización nuclear observada a través de una fusión fluorescente a CFP, así como la detección de la misma en menor intensidad en citosol y RE, son congruentes con la posible participación de las TRAFs en el metabolismo del ARN en uno o más compartimentos subcelulares. El hecho de que la fusión sea funcional como ARN chaperona en el presente trabajo, aporta validez biológica a las observaciones de fluorescencia realizadas.

No se recopilaron evidencias que demuestren roles importantes de *AtTRAF* durante el crecimiento y el desarrollo en condiciones normales. Sin embargo, se ha podido asignar un **posible rol negativo** que limitaría la **elongación de la raíz primaria a bajas temperaturas y en presencia de ABA** y, llamativamente, una **funcionalidad biológica positiva** en la **germinación de semillas en frío**. La observación de fenotipos leves podría indicar la necesidad de mutaciones adicionales para evidenciar rasgos más exacerbados. Los resultados obtenidos se integran en el esquema de la figura 5.27.

Nuevos métodos para profundizar lo visto y explorar nuevas hipótesis permitirán avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares de acción de estas proteínas, con una nueva arquitectura capaz de actuar como ARN chaperona incluso en la protección frente al daño por frío en órganos vegetales de interés agronómico como son los frutos de durazno.



**Figura 5.27** Esquema de las funcionalidades moleculares y biológicas propuestas para los productos génicos de *AtTRAF* y *PpTRAF* en los sistemas *in vivo* evaluados. Flechas en líneas de puntos indican procesos propuestos; flechas continuas, procesos probados en la presente tesis.

***PpZAT12: un factor de transcripción involucrado en la  
protección frente al daño por frío en duraznos.  
Estudios comparativos con AtZAT12 de A. thaliana***



## **6. PpZAT12: un factor de transcripción involucrado en la protección frente al daño por frío en duraznos. Estudios comparativos con AtZAT12 de *A. thaliana***

### **6.1. Introducción**

#### **6.1.1. Información reportada acerca de la caracterización del gen *AtZAT12***

Las ZFPs (Zinc Finger Proteins) pueden poseer desde uno a varios dedos de Zn (ZFs) de diferentes tipos. Una amplia variedad de ZFs y ZFPs (Zinc Finger Proteins) existe en la naturaleza y numerosas combinaciones de los mismos en diferentes arquitecturas se han observado, así como también se han descrito funcionalidades en la interacción con diferentes especies químicas, no sólo ácidos nucleicos (Laity y col., 2001). Un caso lo representan PpTRAF y AtTRAF, nuevas ARN chaperonas estudiadas en el capítulo 5 de la presente tesis.

El dominio de ZF de tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> clásico está involucrado en un amplio rango de funciones y puede unirse a ADN, ARN, y proteínas (Englbrecht y col., 2004). Esta familia posee múltiples diversificaciones específicas de cada grupo taxonómico.

El transcripto *AtZAT12* (o *RLH41*) ha sido reportado en cantidad de publicaciones y actualmente se describe como marcador de estrés general y sistémico en *A. thaliana*. Se observó una rápida inducción del ARNm bajo estímulos de frío, sequía, calor, anoxia, alta salinidad, alta intensidad de luz, UV-B, heridas, agitación mecánica, deficiencia de hierro prolongada y diferentes estreses bióticos (Iida y col., 2000; Kreps y col., 2002; Fowler y Thomashow, 2002, Rizhsky y col., 2004; Vogel y col., 2005; Davletova y col., 2005a y b; Ramonell y col., 2005; Kilian y col., 2007; Libault y col., 2007; Takahashi y col., 2011; Pucciarello y col., 2012; Hahn y col., 2013; Le y col., 2016; búsqueda actual en BAR. El transcripto se induce además bajo diversas condiciones que imponen cambios en el estado oxidativo celular como el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Desikan y col., 2001; Davletova y col., 2005a; Le y col., 2016), la aplicación de metilviológeno (Davletova y col., 2005b; Scarpeci y col., 2008) y la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógena en plantas cAPX1-deficientes (Rizhsky y col., 2004, Davletova y col., 2005a). Entre otros mutantes que afectan la expresión de *AtZAT12*, *rbohD* es capaz de disminuir su inducción luego de provocar heridas en *A. thaliana*. Esto indica la dependencia de esta NADPH oxidasa generadora de EROs para la inducción de *AtZAT12* (Takahashi y col., 2011). Adicionalmente, el ARNm *AtZAT12* posee cinética de inducción por alta intensidad de luz afectada negativamente en genotipos *gun1* y *abi4* (Koussevitzky y col., 2007), lo

que podría indicar su dependencia de señales retrógradas derivadas de la transferencia electrónica en fotosistemas y la modulación de las mismas por GUN1 (proteína plastídica que contiene dominios de repetición pentatrírico péptido) y ABI4 (factor de transcripción del tipo AP2).

Por otro lado, se observó que la inducción por frío de *AtZAT12* depende de regulación circadiana (Fowler y col., 2005). Vogel y col. (2005) comparan a *AtZAT12* y otros FTs (incluido *RAV1*) con los factores *CBFs* (clásicos actores en la aclimatación al frío) debido a que poseen similares cinéticas de expresión por frío (en 0, 1, 24 y 168 h de tratamiento). Sin embargo, en el trabajo de Fowler y col. (2005) se destaca que la expresión de *AtZAT12* en respuesta al frío está desfasada 180 ° en cuanto a regulación circadiana respecto a aquella de los *CBFs* y de *RAV1*.

Después de la anterior recopilación, se puede mencionar que frente a los diferentes estímulos se pone/n en funcionamiento red/es compleja/s de cambios moleculares para dar respuesta a los mismos. Cabe mencionar que pocos factores como *AtZAT12* responden de manera similar a la mayoría de ellos. Walley y col. (2007) identificaron un nuevo elemento *cis* (RSRE, Rapid Stress Responsive Element) en los promotores de genes de inducción rápida frente a la señal de herida, cuya detección se ha postulado como generadora de una respuesta sistémica común a un amplio rango de estreses ambientales. *AtZAT12* es uno de ellos. En relación a esto, este mismo locus fue categorizado como gen de respuesta local y sistémica, y común a muchos estreses (PCEsr, Plant Core Environmental Stress Response) (Hahn y col., 2013). Finalmente, cabe destacar que su rápida inducción transcripcional condice con la arquitectura de exón único.

En cuanto a estudios funcionales de *AtZAT12*, plantas de *A. thaliana* con disminución o abolición en su expresión génica presentaron mayor sensibilidad a los estreses por alta intensidad de luz (Iida y col., 2000), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno (Rizhsky y col., 2004), alta salinidad y choque osmótico (Davletova y col., 2005b). Sin embargo, estas plantas deficientes en la funcionalidad de *AtZAT12* fueron más resistentes al estrés por calor (Davletova y col., 2005b), lo que condice con: la reducción del ARNm *AtZAT12* en plantas que sobreexpresan *HSF21* y el aumento del mismo bajo estrés por calor en el mutante *mbf1c*, coactivador transcripcional con roles positivos para la tolerancia frente a este estrés (Suzuki y col., 2008). Cabe destacar que Suzuki y Mittler (2006) discuten que el estrés por calor disminuye la actividad mitocondrial lo que genera peroxidación lipídica, inducción de HSFs e incrementos en las actividades de sistemas antioxidantes.

Otros estudios funcionales con plantas de *A. thaliana* sobreexpresantes del ADNc *AtZAT12* demostraron aumentos significativos en la tolerancia sistémica de las mismas a la alta intensidad de luz (Iida y col., 2000), estrés oxidativo (Rizhsky y col., 2004), choque osmótico (Davletova y col.,

2005b) y al estrés por bajas temperaturas. En especial, las plantas transgénicas resultaron aclimatadas al frío sin necesidad de exponerlas a bajas temperaturas antes del congelamiento (Vogel y col., 2005). Al respecto, *AtZAT12* fue categorizado como segundo factor en importancia en este proceso y se le ha asignado un rol represor de la expresión de los FTs *CBFs* (Vogel y col., 2005; Chinnusamy y col., 2007). Suzuki y Mittler (2006) también observaron que la aclimatación al frío depende de la detoxificación de EROs ya que plantas de tomate sobreexpresantes del factor *CBF1* poseen menores niveles de  $H_2O_2$ , y que el mutante *fro1* (que codifica para una subunidad del complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial) posee reducida expresión de genes necesarios para la aclimatación al frío así como también mayores niveles de EROs (Lee y col., 2002). Sumando a esto, Yun y col. (2010) relacionan la aclimatación al frío de plantas de arroz con la señalización oxidativa, tanto en la respuesta temprana como en la defensa frente a estrés.

Es de interés destacar que dos ortólogos de *AtZAT12* y *PpZAT12* (*ZFP179* de *Oryza sativa* y *BcZAT12* de *Brassica carinata* -bajo el promotor inducible por estrés *Bclea1-*), se utilizaron con éxito para incrementar la tolerancia de plantas de arroz, tomate y *Brassica juncea* a diversos estreses abióticos, incluyendo estrés por alta salinidad, sequía, calor y oxidativo (Sun y col., 2010; Rai y col., 2012, 2013a y b, Verma y col., 2013). Justificando la tolerancia a estrés en estas plantas transgénicas, se encontraron altos niveles de HSPs, Pro y azúcares solubles, valores menores de pérdida de electrolitos, junto a bajos niveles de EROs y/o mejor habilidad para detoxificarlas.

### 6.1.2. Presente capítulo

El almacenamiento a bajas temperaturas se podría considerar un estímulo sobre células vegetales similar a aquel extensivamente estudiado en hojas de organismos modelo. De la misma manera, estos sistemas también son afectados por señalizaciones hormonales y de especies reactivas del oxígeno (EROs), aunque diferencias particulares se pueden identificar como mecanismos específicos de frutos.

El trabajo de Lauxmann y col. (2012), en el que se aplicó la técnica transcriptómica de Differential Display, permitió identificar al ARN mensajero de *PpZAT12* como inducido por tratamiento térmico, estrategia poscosecha verificada como preventiva frente al daño por frío en duraznos. El TED I42 es un fragmento de ADN retrotranscrito a partir del ARN mensajero original, presente en las muestras de mesocarpio tratadas. *PpZAT12* fue seleccionado para su caracterización funcional, en comparación a su ortólogo en *A. thaliana*, *AtZAT12*. Diferentes evidencias relativas a estos FTs en las respuestas a la temperatura se han recopilado y similitudes y diferencias se pudieron evaluar en cuanto a su funcionalidad.



## 6.2. Objetivos específicos

Comparar la funcionalidad molecular de los ortólogos *PpZAT12* y *AtZAT12* en el sistema *A. thaliana*, detectando fenotipos asociados y sus actores y posibles blancos en común.

Determinar el proteoma diferencial de hojas adultas de los genotipos mutante en *AtZAT12* y sobreexpresante del mismo y de su ortólogo *PpZAT12*.

Delimitar el posible regulón del factor de transcripción *PpZAT12* en duraznero, en base a la información obtenida y a trabajos publicados acerca de su ortólogo *AtZAT12*.

### 6.3. Resultados y discusión

#### 6.3.1. Caracterización bioinformática de *PpZAT12* en comparación con su ortólogo *AtZAT12*

La figura 6.1 muestra el alineamiento resultado de blastx entre las secuencias del TED I42 (identificado por Lauxmann y col., 2011) traducido y parte de la secuencia aminoacídica del producto génico de Prupe.2G230800, identificado tras la asignación.

```

TED I42 traducido      52 SMKRSRQENMRIEAE-AMAHCLMLLLARMNNNTCXXXXXXXXXXXXXXXXFECKTCDKRFPSF 228
Prupe.2G230800.1     2  TMKRSITEMRELDRLTMANC-LMLLSRGSMDH-HQYDTFSASPTRVFECKTCNRQFPSF 59
      .**** *                *. *  ****.*
      *****:..****

TED I42 traducido     229 QALGGHRASH 258
Prupe.2G230800.1     60 QALGGHRASH 69
      *****

```

**Figura 6.1 Alineamiento en blastx entre la secuencia traducida a partir del TED I42 y la proteína *PpZAT12*.** “\*” indica residuos idénticos; “:”, sustituciones conservadas; “.”, sustituciones semiconservadas; y “-” ausencia de residuos.

La búsqueda de proteínas similares en identidad en la especie modelo *A. thaliana*, rindió como resultado a *ZAT12/RHL41* (At5g59820.1) y el blastp recíproco (At5g59820.1 < Prupe.2G230800.1) confirma estos resultados aunque en las búsquedas también surgen otros péptidos de ambas especies con arquitecturas similares. El mismo resultado se obtiene mediante blastn del TED I42 sobre la totalidad de transcritos anotados en el organismo modelo *A. thaliana* (TAIR).

Al buscar anotaciones funcionales y dominios conservados en los dos genes ortólogos, de ahora en más denominados *PpZAT12* y *AtZAT12*, las mismas no se encontraron para el gen de duraznero. Sin embargo, múltiples términos GO están anotados y algunos de ellos verificados experimentalmente para *AtZAT12* (tabla 6.1).

**Tabla 6.1 Anotaciones recopiladas de *PpZAT12* y *AtZAT12***

Gen	Términos GO			Dominios conservados
	Proceso Biológico	Componente Subcelular	Función Molecular	
<i>PpZAT12</i> Prupe.2G230800 ppa011762m.g	Sin anotaciones funcionales			PF13912 Dos dedos de Zn del tipo C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> (47-74, 101-128) Motivo EAR (170-174)
<i>AtZAT12</i> <i>RHL41</i> At5g59820	Aclimatación a frío (9631), calor (10286) y fotosintética (9643) Respuesta hiperosmótica (42538), a frío (9409), luz (9416), calor (9408), UV-B (10224), heridas (9611), JA (9753) y estrés oxidativo (6979) e hídrico (9414)	Núcleo (5634)	Unión a Zn (8270) Factor de transcripción (3676, 3700)	PF13912 Dos dedos de Zn del tipo C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> (39-66, 82-109) Motivo EAR (141-145)

### 6.3.1.1. PpZAT12 como proteína ZFP de la familia C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>

Las ZFPs C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> poseen dos ZFs (incluidos los genes ZAT de *A. thaliana*; Zn finger of *Arabidopsis thaliana*) y es la familia de mayor abundancia en varias especies vegetales (Meissner y Michael, 1997). En la base de datos PlantTFDB, *A. thaliana* posee 100 miembros mientras que *P. persica* posee 82.

Los ZFs tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (tipo TFIIIA) son uno de los motivos de unión a ADN mejor caracterizados y están representados por el consenso CX<sub>2-4</sub>CX<sub>3</sub>FX<sub>3</sub>QALGGHX<sub>3-5</sub>H, en el que el par de Cys y el par de His conservadas se unen tetraédricamente al ión Zn<sup>2+</sup> (Pabo y col., 2001). El motivo QALGGH es esencial para la unión a ADN (Kubo y col., 1998). Hasta el momento, no se ha demostrado la unión de AtZAT12 al ADN, aunque la misma ha sido descrita en parálogos (Hiratsu y col., 2002; Sakamoto y col., 2004).

Adicionalmente, en este tipo de proteínas se encuentran motivos B-box (con alto contenido de Arg y Lys), potencial señal de localización nuclear presente en la proteína ZAT10 aunque ausente en AtZAT12. Por último, es común la presencia de secuencias L-box (EX<sub>2</sub>AXCLX<sub>2</sub>L) y EAR ((F/L)XLX(F/L), (F/L)DLN(F/L) o DLNXXP), que se creen participantes en interacciones proteína-proteína y/o mantienen el plegamiento estructural (Sakamoto y col., 2004). Por su parte, el motivo EAR (ERF-associated Amphiphilic Repression motif), ubicado en la zona C-terminal de proteínas ERF de clase II y ZFPs como ZAT6/7/10/11/12/17/18, fue probado (para NtERF3, AtERF3, ZAT10, SUP y otras proteínas) de poseer actividad represora de la transcripción (Ohta y col., 2001; Hiratsu y col., 2002; Sakamoto y col., 2004; Kagale y Rozwadowski, 2010, 2011, Kagale y col., 2010). En el caso de AtZAT12, Le y col. (2016) determinaron la funcionalidad del EAR motif para mediar su interacción en la epidermis radicular de *A. thaliana* con el regulador de la respuesta a la deficiencia de hierro FIT.

El gen *PpZAT12* posee 1413 pb, se ubica en la hebra positiva del cromosoma 2 del genoma de *P. persica*, es monoexónico, con UTRs 3' y 5' de 69 y 750 pb, respectivamente. El ADN codificante, de 594 pb, se traduciría en una proteína de 197 aminoácidos con un pI predicho de 9,5. *AtZAT12*, también monoexónico, posee 816 pb, se ubica en el cromosoma 5 y sus UTRs poseen 101 (5') y 226 (3') pb. Su ADNc, de 489 pb, codifica para una proteína de 162 residuos y con pI de 9,5. Ninguno presenta variantes transcripcionales. En las figuras 6.2a y b se presentan un esquema de la arquitectura de AtZAT12 (azul) y PpZAT12 (naranja), destacando dominios conservados y residuos de Ser fosforilados de AtZAT12 en una proteómica nuclear (Jones y col.,

2009), y un alineamiento de las mismas con dos ortólogos con funcionalidad estudiada: ZFP179 de *O. sativa* y BcZAT12 de *B. carinata*.

a.



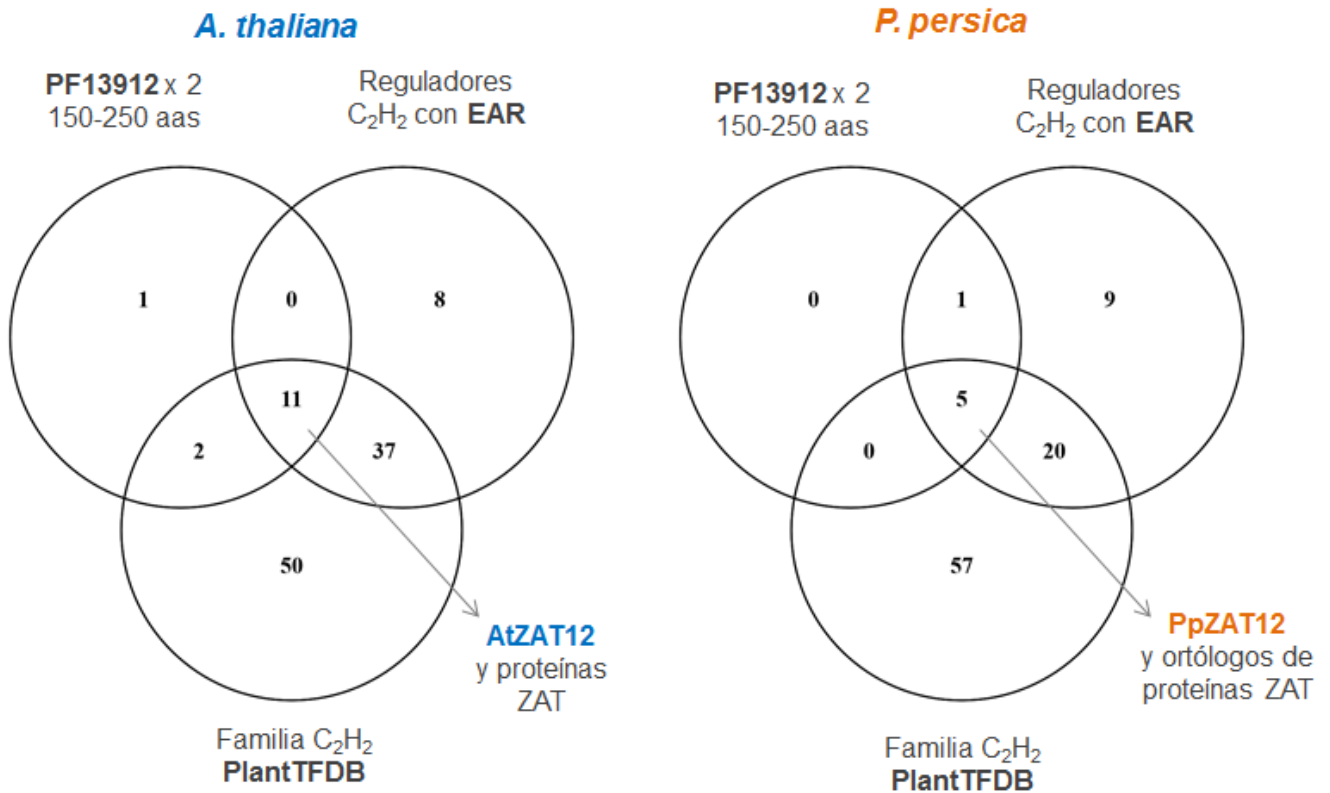
b.

	L-box AXCLXXL	ZFP1 CXXCXXXFXXXQ	
AtZAT12	---MVAISEIKSTVDVT- <b>ANCLMLL</b> SRVGQENVN----GGDQKRVT <b>CKTCLKQFH</b> S <b>FQ</b>	52	
PpZAT12	MTMKRSITEMRELDRLTMA <b>ANCLMLL</b> SRGSHDHHQYDTFSASPTRV <b>FKTCNRF</b> FP <b>SFQ</b>	60	
BcZAT12	---MVAISEIKSTVETAA <b>ANCLMLL</b> SRVGQENVN----GGSAKRVFT <b>CKTCLKEFH</b> S <b>FQ</b>	53	
ZFP179 (Os)	MTITREEAESKEMESLRVH <b>SALLSL</b> SSPAASASQPTSSSSTTEGV <b>FKTCSKR</b> FP <b>SFQ</b>	60	
	:* :. *..*: ** . . : .. ** ** ** :.* ** *		
	ALGGHXXXH	ZFP2 CXXCXXXFXXXQALGGHX	
AtZAT12	<b>ALGGHRA</b> SHKKP-----NNDALSSGLMKVKVTSS-----HP <b>CPICGVEFPMGQALGGHM</b>	101	
PpZAT12	<b>ALGGHRA</b> SHKKPRLMGSGDGNSSNGSDQSQSQGSPPKPKTHE <b>CNICGLEFAIQALGGHM</b>	120	
BcZAT12	<b>ALGGHRA</b> SHKKP-----NENELSGLMKKTASSS-----HP <b>CPICGVEFPMGQALGGHM</b>	102	
ZFP179 (Os)	<b>ALGGHRT</b> SHTRLQAKLLSDPAAAAAAAERDRAR-----VHE <b>CAVCGVEFPMGQALGGHM</b>	115	
	*****:*.: .: :. . . . * * :*:*: :*****		
	XXH	LXLXL	
AtZAT12	<b>RRHR</b> -----NES-----GAAGGALVTRALLPEPTVTTLKKSSSGKRVAC <b>LDLSL</b> GMVDN	150	
PpZAT12	<b>RRHR</b> SALSNNNTSQYSDSNSNSVLSLPQAPMFQVLKKTNSGRRVM <b>LDLNL</b> TPLEN	180	
BcZAT12	<b>RRHR</b> -----NES-----GGAG-ALVTRELLPEALMTLKKSSSG-RLAC <b>LDLSL</b> GMVEN	149	
ZFP179 (Os)	<b>RRHR</b> -----GETGTTTVVLADADDSSGATVPQPPEP----MP <b>DLNYP</b> PLED	157	
	**** . :. * . . :. :. ** . :.:		
AtZAT12	LNLKLELGRTVY----- 162	<b>DLNXXP</b>	
PpZAT12	DLKILQIGKAAPLVGFS 197	EAR motif	
BcZAT12	LNLKLELGRPVC----- 161		
ZFP179 (Os)	AGDGSEPELLNLLV--- 171		
	:		

■ ZF tipo C2H2    ■ Motivo EAR    ■ L-box    ■ Ser fosforilables

**Figura 6.2 Motivos aminoacídicos conservados en proteínas ZAT12.** a) Esquemas de la arquitectura de las proteínas ZAT12 en estudio. Se destacan ZFs C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (azul para AtZAT12 y naranja para PpZAT12) y en rojo, Ser fosforilables en el ZF1 de AtZAT12 (Jones y col., 2009) y conservados en PpZAT12. b) Alineamiento entre secuencias proteicas de PpZAT12 y AtZAT12 y ortólogos de interés (ClustalW). BcZAT12 (ABB5254.1; *B. carinata*), ZFP179 (AAL76091.1; *O. sativa*). Se destacan: L-box en celeste, ZF1 y 2 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> en verde, motivos EAR en gris y residuos de Ser fosforilables de ZF1 en rojo. "\*" indica residuos idénticos; ":", sustituciones conservadas; ".", sustituciones semiconservadas; "-" ausencia de residuos.

Con el fin de recopilar las proteínas similares en arquitectura a AtZAT12 en *A. thaliana* y PpZAT12 en duraznero, se realizaron búsquedas de la siguiente manera. Se obtuvieron de Phytozome las proteínas con dos dominios ZF del tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> a través de su identificador en PFAM (PF13912), se filtraron por longitud de 150 a 250 residuos y se contrastaron con el grupo de reguladores transcripcionales con motivo EAR (Kagale y col., 2010) y con los FTs anotados como parte de la familia C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> en PlantTFDB. Para el caso de duraznero, se obtuvieron ortólogos a los reguladores transcripcionales con EAR reportados. La figura 6.3 muestra los resultados obtenidos.



**Figura 6.3 Búsqueda de proteínas con arquitectura similar a las proteínas ZAT12 en los genomas de *A. thaliana* y *P. persica*.** Se contrastaron los grupos de proteínas con dos dominios PF13912 anotados, largo entre 150 y 250 aminoácidos, motivo EAR en reguladores transcripcionales reportado por Kagale y col. (2010) o sus ortólogos en duraznero y pertenencia a la familia C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> anotada en PlantTFDB. ZAT, Zn finger of Arabidopsis Thaliana.

Cabe destacar que una menor cantidad de miembros de este subset se podría haber encontrado debido a la falta de anotaciones. Nuevas búsquedas, manejando directamente los consensos de los motivos podrían ampliar los resultados.

Las proteínas encontradas demuestran la posible redundancia funcional de esta subfamilia de productos génicos C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, lo que dificulta su estudio. Sin embargo, profundizar en las diferencias entre los miembros de cada subset ZAT permitió identificar aquellas proteínas con mayor identidad de secuencia respecto a AtZAT12 o PpZAT12, permitiendo construir grupos relacionados a AtZAT12 y PpZAT12. Adicionalmente, se realizó la recopilación de información de expresión génica en frutos, llevada a cabo como se mencionó anteriormente (Gismondi y col., enviado). Estas informaciones pueden observarse en la tabla 6.2.

**Tabla 6.2 Información de expresión génica en duraznos de ortólogos a proteínas ZAT**

Producto génico	Alias	Maduración	Refrigeración / Respuesta a frío	Tratamiento térmico / Respuesta a calor
At5g59820.1	AtZAT12	-	I	I
At3g46090.1	ZAT7 [6]	-	-	
At2g28710.1	ZAT17	-	R	I
At3g53600.1	ZAT18	-	I	-
At2g37430.1	ZAT11 [7]	-	I	I
Prupe.2G230800.1	PpZAT12	A [1]	I [3]	-
Prupe.6G249300.1	-	-	-	-
Prupe.6G084100.1	-	-	-	-
Solyc05g054650.1.1	SIZAT11-like	-	-	-
At1g27730.1	ZAT10, STZ [8]	-	I	I
At5g43170.1	AZF3 [8]	-	I	I
Prupe.8G142400.1	-	-	I [3]	-
Prupe.1G424300.1	-	-	A [4]	-
Solyc01g107170.2.1	SIZF2 [9]	-	-	-
Solyc04g077980.1.1	SIZF1	A, blanco de RIN [2]	R, cambios epigenéticos [5, 1]	I [5]

Respuesta a frío y calor obtenida de ExPath, ColdArrayDB, BAR y Shi y col., 2017. 1. Zhang y col., 2016. 2. Zhong y col., 2013. 3. Wang y col., 2017. 4. Pons y col., 2014. 5. Cruz-Mendivil y col., 2015. 6. Ciftci-Yilmaz y col., 2007. 7. Ohta y col., 2001. 8. Sakamoto y col., 2004. 9. Hichri y col., 2014. I, inducido; R, reprimido; A, afectado.

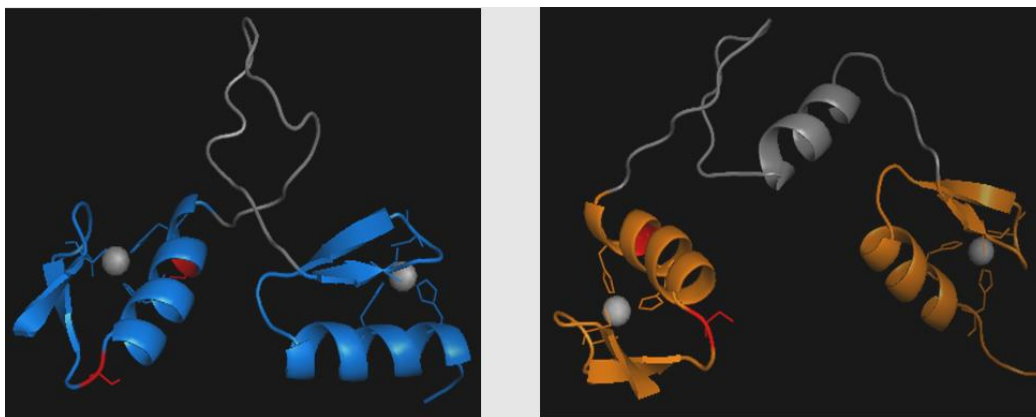
Los resultados recopilados en la tabla anterior revelan que PpZAT12, el gen bajo estudio en el presente trabajo, ya ha sido identificado a nivel transcripcional en frutos de duraznos como inducido por frío de manera similar a AtZAT12, ZAT10 y otras proteínas ZAT (excepto ZAT17), en órganos de Arabidopsis. Sin embargo, otros ZFPs con arquitectura similar, aunque relacionados en identidad a ZAT10, también poseen expresión afectada durante la refrigeración, sugiriendo que complejas redes transcripcionales se activan en frutos en respuesta al frío (Pons y col., 2014). Respecto a lo último se ha reportado la aparición de motivos DRE en los promotores de *PpCBFs*, sugiriendo una autoregulación inexistente en *A. thaliana* (Artlip y col., 2013).

Un dato interesante es que otros ZFPs de la misma familia, en *A. thaliana* o *S. lycopersicum*, fueron también caracterizados a nivel molecular como represores (ZAT10, AZF3, ZAT11, SIZF2).

### 6.3.1.2. Predicción de la estructura tridimensional de las proteínas ZAT12

Con el fin de evaluar la estructura tridimensional de las proteínas en estudio, su putativa estructuración en ZFs y revelar la ubicación de motivos importantes en regiones particulares, se realizaron búsquedas de proteínas con estructura resuelta y similar, mediante la herramienta HHPRED. Entre otros, se encontró un péptido con estructura similar que consiste en el dominio de múltiples ZFs de PRDM9 (PDB ID 5E19), una proteína humana de unión a ADN y rol transcripcional. El alineamiento estructural revela que la estructura principal de las proteínas ZAT12 podría consistir únicamente en los ZFs. Nuevas búsquedas se realizaron con subregiones de las proteínas, en especial con aquellas conteniendo los motivos EAR. Sin embargo, ninguna estructura resuelta se alinea con esta región y, basándonos en la literatura, es alta la probabilidad de que cumplan su función en interacción con otros péptidos debido a su disposición desplegada (Kagale y col., 2010).

En la figura 6.4, se pueden visualizar las estructuras modeladas por homología de la región de los ZFs de AtZAT12 y PpZAT12, utilizando el molde de PRDM9.



**Figura 6.4 Modelado por homología de los dos dominios ZF C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> de las proteínas ZAT12.** Se observan a izquierda AtZAT12 (ZFs en azul) y a derecha, PpZAT12 (ZFs en naranja). Se destacan iones Zn<sup>2+</sup>, regiones inter-ZF en gris y residuos de Ser fosforilables en rojo en ZF1. Se utilizó el software Modeller 9.17 (Webb y Sali, 2014) y el molde 5E19 (Human PRDM9 ZnF Domain with Associated Recombination Hotspot DNA Sequence).

La evaluación de los modelos obtenidos ha permitido observar que la diferencia en la región inter-ZFs que poseen los ortólogos AtZAT12 y PpZAT12, puede implicar la adopción de distintas estructuras. Las mismas, para el caso de ZFPs que utilizan sus ZFs para interactuar con el ADN, pueden significar distintas afinidades y/o la unión a distintos motivos. Sin embargo, estudios particulares como delecciones de dichas regiones o mutaciones de residuos esenciales para la estructura diferencial, y sus caracterizaciones bioquímicas *in vitro*, podrían demostrar las hipótesis discutidas.

### 6.3.2. Estudios de los niveles de ARNm *PpZAT12* en *P. persica* mediante RT-qPCR

La técnica de RT-qPCR fue aplicada para analizar la presencia y cuantificar la cantidad relativa de transcritos *PpZAT12* en muestras biológicas de interés de *P. persica*. Se utilizaron órganos provenientes de diferentes variedades que se mantienen actualmente en el INTA San Pedro. Adicionalmente, se caracterizó la respuesta del transcrito *AtZAT12* en *A. thaliana*, bajo estímulos similares a su ortólogo, en busca de confirmar experimentalmente similitudes en su comportamiento.

#### 6.3.2.1. Análisis en hojas adultas, flores abiertas y frutos cosechados

Se analizó la presencia del transcrito *PpZAT12* en hojas, flores y frutos cosechados de la variedad Dixiland. La figura 6.5 revela los resultados obtenidos.



**Figura 6.5** Expresión transcripcional normalizada de *PpZAT12* en hojas, flores abiertas y frutos de duraznero cv. Dixiland. Se analizaron hojas adultas, flores abiertas y mesocarpio de frutos cosechados, luego de aplicar el mismo método de extracción de ARN total, adaptado de Meisel y col. (2008). La expresión se calculó mediante la fórmula  $2^{-\Delta Cq}$  (Cq, ciclo de cuantificación) y se normalizó a aquella correspondiente al gen de referencia *PpDNarep*. Se muestran los promedios y los desvíos obtenidos a partir de al menos tres réplicas biológicas. El asterisco indica el valor significativamente diferente ( $p < 0,05$ ).

De los resultados, se destaca que el gen *PpZAT12* posee expresión ubicua a nivel transcripcional en los órganos evaluados. Esto revela que este locus podría cumplir una función común en estos tres órganos de duraznero en condiciones normales. Adicionalmente, este rasgo lo asemeja a su ortólogo en *A. thaliana*, para el cual se han descripto roles en tejidos fotosintéticos (Vogel y col., 2005; Davletova y col., 2005b) y radicales (Le y col., 2016).

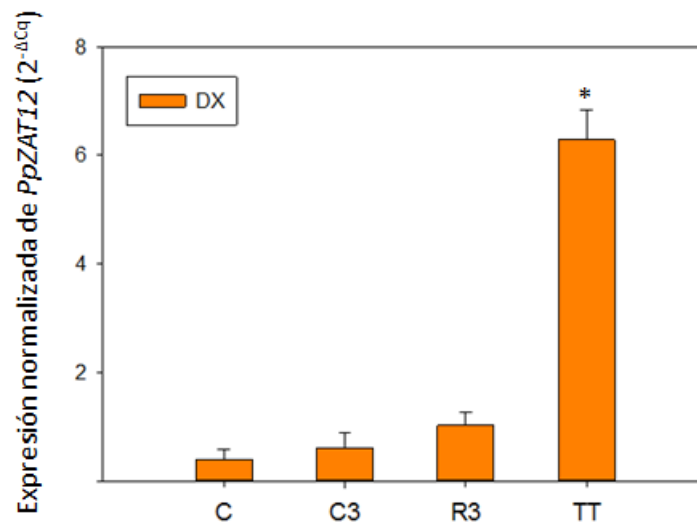


### 6.3.2.2. Análisis en frutos expuestos a tratamiento térmico

Se utilizaron muestras de duraznos cv. Dixiland bajo tratamiento térmico. La figura 3.2a detalla, mediante un esquema, el diseño experimental utilizado. Los resultados del análisis se observan en la figura 6.6.

El transcripto *PpZAT12* se indujo frente tratamiento térmico por 3 d, respecto a las condiciones cosecha y de mantenimiento de la fruta a 20 °C por el mismo período. Estos resultados validan lo reportado en el manuscrito de Lauxmann y col. (2012) mediante otro método transcriptómico (Differential Display). Adicionalmente, refuerzan la idea de que este FT cumpliría un rol luego de la aplicación de este tipo de tecnología poscosecha, preventiva del daño por frío en duraznos. En el capítulo 4, *PpZAT12* (TED I42) se categorizó dentro de los grupos I e I2.

A diferencia de *PpTRAF*, la refrigeración en estos pocos d no indujo sus niveles en esta variedad categorizada como intermedia en cuanto a su susceptibilidad al CI (Genero y col., 2016).



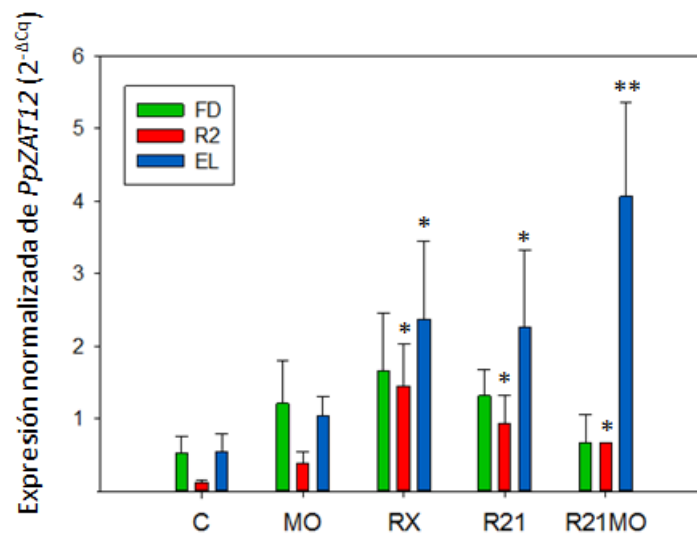
**Figura 6.6** Expresión transcripcional de *PpZAT12* en duraznos cv. Dixiland durante la cosecha, vida de estantería, refrigeración y tratamiento térmico. Se analizaron frutos recién cosechados (C), almacenados durante 3 d a 20 °C (C3), refrigerados a 0 °C por 3 d (R3) o expuestos a tratamiento térmico por 3 d (TT). La expresión se calculó mediante la fórmula  $2^{-\Delta Cq}$  (Cq, ciclo de cuantificación) y se normalizó a aquella correspondiente al gen de referencia *PpDNArep*. Se graficaron los promedios y los desvíos obtenidos a partir de al menos tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

### 6.3.2.3. Análisis en frutos de diversas variedades expuestos a refrigeración

Trabajando con variedades de duraznero con susceptibilidad contrastante frente al daño por frío (Genero y col., 2016), se realizaron análisis de RT-qPCR destinados a evaluar la existencia de cambios en los niveles del ARNm *PpZAT12* relacionados con los fenotipos variedad-dependiente.

El diseño experimental ideado para la toma de muestras es visible en la figura 3.2b. Luego, la figura 6.7 muestra los resultados obtenidos luego de llevar a cabo reacciones de RT-qPCR en tres variedades clasificadas como resistente (EL), intermedia (R2) y susceptible (FD) al CI.

El período de almacenamiento a 20 °C hasta maduración organoléptica (MO) que se asemeja al período de estantería no produjo cambios en los niveles del transcripto *PpZAT12* (respecto a C) para ninguna de las variedades en estudio. Se observó inducción del mismo luego del almacenamiento refrigerado corto (RX) y 21 d (respecto a C y MO) en las variedades EL y R2, mientras que no hubo cambios significativos en la variedad susceptible FD. En el momento en que los síntomas del CI se evidencian (R21MO), los niveles de ARNm *PpZAT12* permanecen inducidos en EL y R2, con respecto a C y MO, siendo aún mayores en el caso de la variedad resistente.



**Figura 6.7 Expresión transcripcional de *PpZAT12* en duraznos en condiciones de cosecha, maduración y refrigeración.** Se analizaron frutos de las variedades Flordaking (FD), Rojo2 (R2) y Elegant Lady (EL), cosechados (C), almacenados durante X d a 20 °C hasta madurez organoléptica (MO), refrigerados a 0 °C por X d (RX) o 21 d (R21), o refrigerados a 0 °C por 21 d y luego almacenados a 20 °C hasta madurez organoléptica (R21MO). La expresión se calculó mediante la fórmula  $2^{-\Delta Cq}$  (Cq, ciclo de cuantificación) y se normalizó a aquella correspondiente al gen de referencia *PpDNArep*. Se graficaron los promedios y los desvíos obtenidos a partir de al menos tres réplicas biológicas. Los análisis estadísticos se han realizado a un factor con los valores de cada variedad. Los asteriscos indican valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

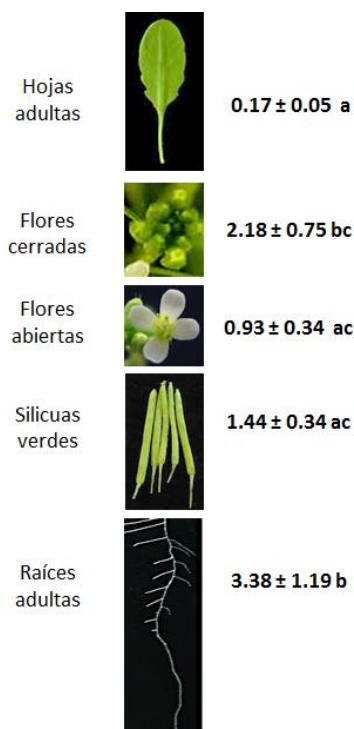
Estos resultados aportan importantes evidencias para un posible rol de este FT frente al CI debido a que, a nivel transcripcional, se ha demostrado su inducción luego de la aplicación de la estrategia preventiva TT y su expresión diferencial en la variedad menos susceptible EL. Asimismo, podría ser responsable de ciertos cambios moleculares que harían a las diferencias de susceptibilidad al CI, mediante la regulación de sus blancos (Bustamante y col., 2016). La indagación de esos blancos en frutas es de sumo interés para profundizar estas hipótesis.

### 6.3.3. Estudios de los niveles de ARNm *AtZAT12* en *A. thaliana Col-0* mediante RT-qPCR

En la introducción del presente capítulo y en la tabla 6.2 se han recopilado datos de expresión génica de *AtZAT12* frente a diversos estímulos ambientales, justificando su utilización como gen de respuesta general y sistémica. En el presente trabajo, decidimos confirmar estos resultados en nuestro sistema de cultivo vegetal, estableciendo condiciones para llevar a cabo experimentos para la caracterización de las proteínas ZAT12.

#### 6.3.3.1. Análisis en diferentes órganos

Se analizó la presencia del transcrito *AtZAT12* en hojas verdes, flores abiertas, flores cerradas, silicuas verdes y raíces. La figura 6.8 revela los resultados obtenidos.

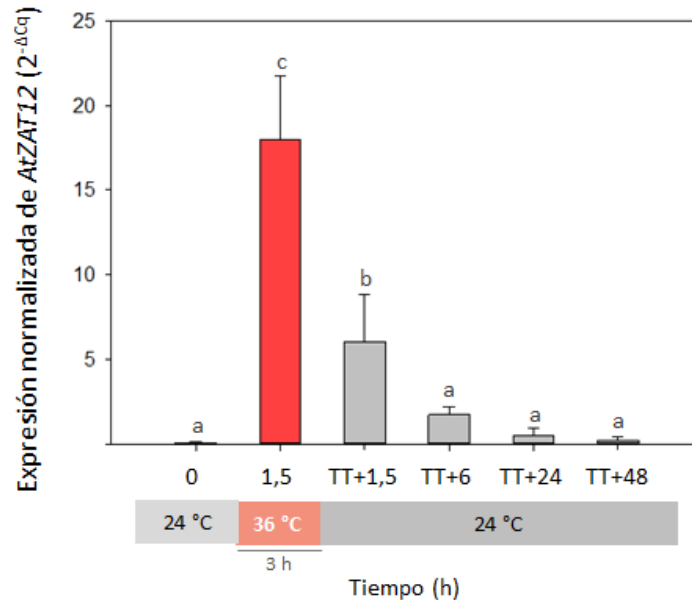


**Figura 6.8** Expresión transcripcional normalizada de *AtZAT12* en hojas adultas, flores cerradas y abiertas, silicuas verdes y raíces adultas de *A. thaliana Col-0*. Se analizaron los mencionados órganos a partir de plantas de 30 d cultivadas en suelo. El método de extracción de ARN total fue el descrito por el fabricante para Trizol (Roche) excepto para silicuas (se utilizó el protocolo de Oñate-Sánchez y col., 2008). La expresión se calculó mediante la fórmula  $2^{-\Delta Cq}$  (Cq, ciclo de cuantificación) y se normalizó a aquella correspondiente al gen de referencia *UBQ10*. Se muestran los promedios y los desvíos obtenidos a partir de al menos tres réplicas biológicas. Letras diferentes indican valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Coincidiendo con lo reportado en la literatura y en diferentes bases de datos de expresión transcripcional, el transcrito es ubicuo en los órganos analizados aunque se encuentra en mayor proporción en raíces. No se descarta la existencia de variaciones adicionales a lo largo del desarrollo.

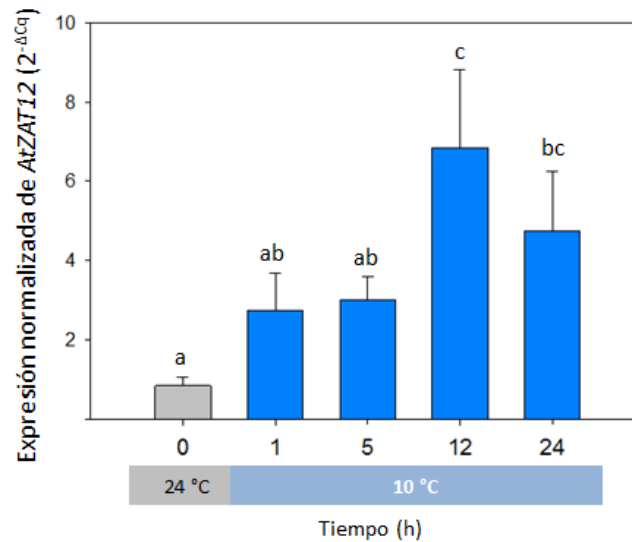
### 6.3.3.2. Análisis en hojas expuestas a estímulos de temperatura

Luego, evaluamos el comportamiento del ARNm *AtZAT12* frente a las condiciones de trabajo en nuestro laboratorio, proponiéndonos comparar la respuesta de ambos sistemas biológicos (*P. persica* y *A. thaliana*) a estímulos de temperatura. Los resultados obtenidos para altas temperaturas se visualizan en la figura 6.9 mientras que los equivalentes para un tratamiento en frío se pueden observar en la figura 6.10.



**Figura 6.9** Expresión génica de *AtZAT12* a nivel de transcritpo en *A. thaliana Col-0* frente a altas temperaturas y en recuperación. Plántulas de 10 d cultivadas en MS-agar fueron expuestas por 3 h a 36 °C (tratamiento térmico, TT) y se tomaron muestras foliares antes (0), durante (1,5) y seguido el TT, a diferentes tiempos de recuperación a 24 °C (TT+1,5, TT+6, TT+24 y TT+48). La expresión se calculó mediante la fórmula  $2^{-\Delta Cq}$  (Cq, ciclo de cuantificación) y se normalizó a aquella correspondiente al gen de referencia *UBQ10*. Se graficaron los promedios y desvíos de los resultados obtenidos a partir de al menos tres réplicas biológicas. Letras distintas indican valores estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Se puede observar una importante inducción del transcritpo *AtZAT12* frente al tratamiento de altas temperaturas, congruente con lo reportado y accesible a partir de las bases de datos de expresión y con los resultados de Davletova y col. (2005b), Suzuki y col. (2008) y Perez-Salamó y col. (2014). En estos trabajos, se describe la regulación transcripcional de *AtZAT12* en genotipos relativos a HSF4a/HSF21, implicado en la señalización debida al calor (e iniciada por el FT MBF1c) y EROs, y se detalla que este HSF interacciona con MPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases) para movilizar el transcriptoma en respuesta al estrés oxidativo.



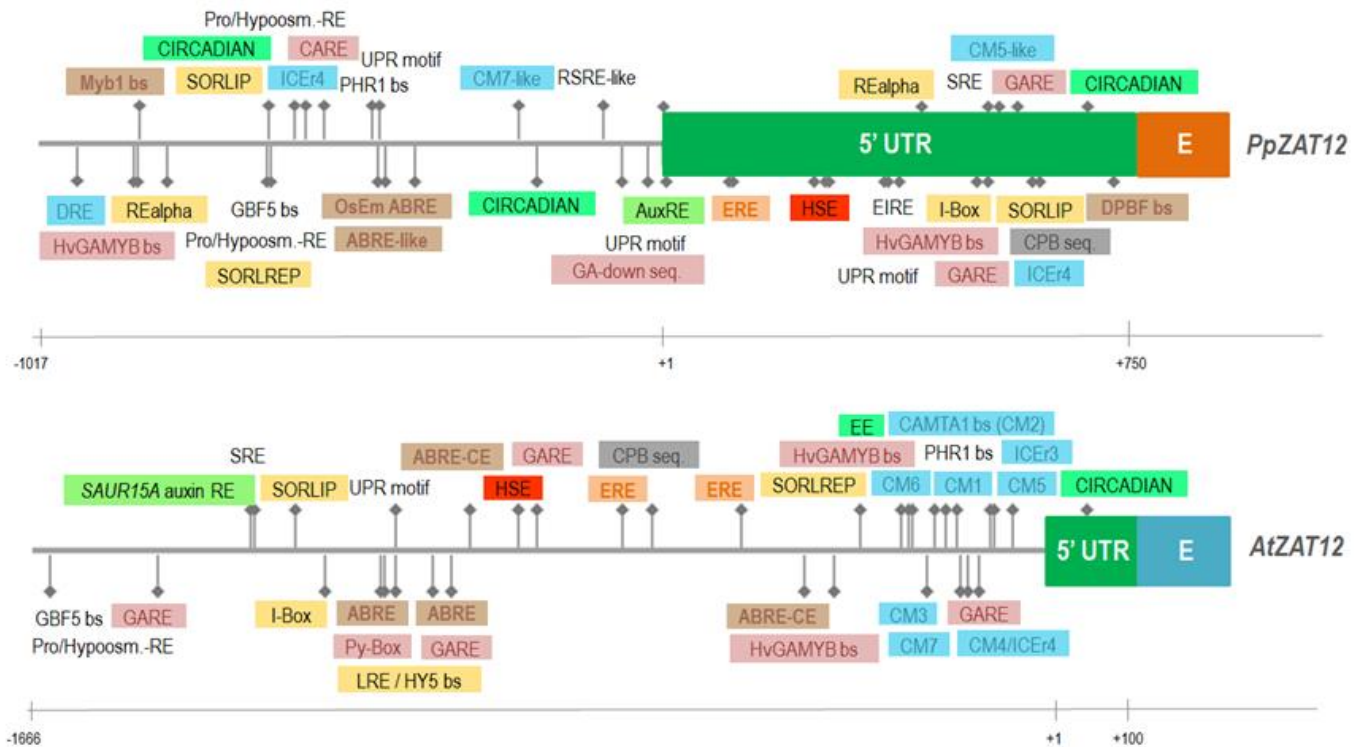
**Figura 6.10** Expresión génica de *AtZAT12* a nivel de transcripción en *A. thaliana Col-0* frente a bajas temperaturas. Plantas de 25 d cultivadas en suelo fueron expuestas por 24 h a 10 °C y se tomaron muestras foliares antes (0) del mismo y a las 12 y 24 h de iniciada la incubación. La expresión se calculó mediante la fórmula  $2^{-\Delta Cq}$  (Cq, ciclo de cuantificación) y se normalizó a aquella correspondiente al gen de referencia *UBQ10*. Se graficaron los promedios y desvíos de los resultados obtenidos a partir de al menos tres réplicas biológicas. El asterisco indica el valor estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ).

Los resultados obtenidos luego de tratamiento en frío revelan la inducción esperada del ARNm *AtZAT12* como se ha reportado en diversos trabajos (Fowler y Thomashow, 2002; Fowler y col., 2005; Vogel y col., 2005; Shi y col., 2017). Sin embargo, es destacable que la cinética podría estar afectada por la intensidad del estímulo, retrasando el pico de inducción y señalando un posible efecto de dosis en cuanto a los requisitos moleculares para garantizar el aumento del transcripción *AtZAT12*.

Ambos rasgos transcripcionales de *AtZAT12* frente a la temperatura como estímulo posibilitan destacar su similitud con lo observado para *PpZAT12*, sugiriendo la conservación de los requisitos para garantizar la activación de su inicio transcripcional y/o de mecanismos que aumenten la estabilidad de su mensajero. De la misma manera, sugieren una similitud en cuanto al rol de los ARNms requeridos en altos niveles luego de la exposición a altas y bajas temperaturas.

#### **6.3.4. Análisis *in silico* de la región del inicio transcripcional de los genes *PpZAT12* y *AtZAT12***

Debido al interés en este gen marcador general y sistémico de estrés, múltiples trabajos han estudiado *in silico* y experimentalmente la región promotora del gen *AtZAT12* (Rizhsky y col., 2004; Davletova y col., 2005a; Benedict y col., 2006; Walley y col., 2007; Doherty y col., 2009; Ben Daniel y col., 2016). En la figura 6.11 se presenta un esquema de la región promotora y 5' UTR de los genes *AtZAT12* y *PpZAT12*, resultado de una búsqueda de motivos lineales en la herramienta *cisAnalyzer* y su base de motivos PASP db.



**Figura 6.11** Esquemas simplificados de las regiones de inicio transcripcional de *PpZAT12* y *AtZAT12*. Se realizaron análisis en busca de motivos conocidos incluidos en PASP db, desde - 1017 hasta +750 para *PpZAT12* y desde -1666 hasta +100 pb para *AtZAT12*, incluyendo 5'UTRs. Se señalan con rombos las posiciones de los elementos *cis* encontrados. Diferentes colores representan grupos de motivos relacionados: celeste, frío; amarillo, luz; naranja, Et; verde, ritmo circadiano; marrón, sequía y ABA; verde claro, auxinas; rosa, GA; gris, CKs; rojo, calor; sin color, sitios para familias de FTs. bs; binding site (sitio de unión para FT).

Se puede observar la presencia de elementos *cis* clásicos de respuesta a fitohormonas y a diferentes estímulos en ambas regiones regulatorias. Es notable la similitud no solo en la presencia sino también en las posiciones de muchos sitios, por ejemplo: CIRCADIAN, ICEr4, GARE, ERE, ABRE. Esto podría indicar que procesos moleculares relacionados actúen sobre ambos inicios transcripcionales en *A. thaliana* y *P. persica*. Sin embargo, la conservación de la presencia (y no necesariamente posición) también puede ser importante como lo es para PHR1bs, HSE y CPB seq.

Doherty y col. (2009) demostraron que varios CMs (CM1-7) se encuentran conservados en presencia pero no en arreglo en los promotores de *AtZAT12* y el FT de respuesta clásica al frío *CBF2*. La conservación de estos motivos en *PpZAT12* junto a sitios de unión a ICE1 (ICEr4, ICEr3; Benedict y col., 2006) u otros MYCbs (no mostrados) podría explicar al menos en parte la respuesta al frío observada mediante RT-qPCR (fig. 6.7). Asimismo, la diferencia en la posición de los mismos podría no tener importancia biológica según lo observado por Doherty y col. (2009) (*AtZAT12* y *CBF2* son inducidos por estímulo de bajas temperaturas). En el árbol de la figura 4.5

dilucidamos posibles ortólogos funcionales a ICE1 de *A.thaliana* en duraznero que podrían pensarse como reguladores corriente arriba de *PpZAT12*.

Sin embargo, una importante distinción hay que realizar respecto a la presencia de DRE en el promotor de *PpZAT12*, que podría contribuir a los mecanismos de inducción por frío. Como se mencionó anteriormente se ha observado la presencia de este motivo en los promotores de *PpCBFs* (Artlip y col., 2013), señalando la posible autoregulación de los mismos y la complejidad de su red transcripcional respecto a la extensivamente estudiada en *A. thaliana*. Adicionalmente, se ha reportado un posible rol represor que *AtZAT12* ejercería sobre los niveles transcripcionales de *CBF2* (Vogel y col., 2005), lo que podría estar afectado por este DRE que indicaría regulación cruzada. Más aún, no se debe descartar la posibilidad de que al mencionado DRE se unan otros FTs como en el caso de *ZFP179* (ortólogo de *ZAT12*), que a través del DRE GCCGAC en su promotor, es regulado por *SERF1*, un FT que actúa en la tolerancia al estrés salino (Schmidt y col., 2013).

HSE es el elemento de unión de FTs HSFs (Nover y col., 2001). *AtZAT12* se induce por estrés oxidativo, señalización retrógrada plástica y diversos estímulos que podrían dar lugar a la producción de EROs (alta intensidad de luz, alta salinidad, estímulos bióticos, entre otros) (Walley y col., 2007). Davletova y col. (2005b) y Pérez-Salamó y col. (2014) han evidenciado la movilización de *AtZAT12* en genotipos con niveles afectados del sensor redox HSF21, lo que sugiere la acción (no probada experimentalmente) de este regulador sobre su promotor. Sin embargo, las familias de HSFs en *A. thaliana* y *P. persica* contienen 25 y 45 miembros, respectivamente (PlantTFDB), por lo que más de un miembro podría estar regulando a los genes en estudio, garantizando su expresión frente al calor.

Un caso interesante es la presencia común de elementos ERE, de respuesta al Et. Wang y col. (2017) han determinado roles positivos de Et y ERFs, movilizados por el tratamiento poscosecha LTC (Low Temperature Conditioning), sobre el pardeamiento interno de duraznos. Por otro lado, esta fitohormona ha sido caracterizada como antagonista de la tolerancia al congelamiento en *A. thaliana* (Shi y col., 2012). Los promotores tienen elementos *cis* de unión a ERFs por lo que su posible regulación por Et también puede señalarse y su relación con la exposición a bajas temperaturas también podría explicarse como mediada por estos mecanismos.

Otros elementos *cis* a destacar son *PHR1bs*, *ABRE*, *EE* y *CIRCADIAN* debido a que se ha reportado su unión a los FTs correspondientes en búsquedas de simple híbrido (Y1H) llevadas a cabo sobre el promotor de *AtZAT12* y se conservan en el promotor de su ortólogo en duraznero (Nagel y col., 2015; Ben Daniel y col., 2016).

Por último no se descarta la intervención en el inicio transcripcional de elementos *cis* en regiones más distales y/o corriente abajo, aunque resulta interesante la ausencia de intrones.

#### **6.3.4.1. Comparación de secuencias promotoras y codificantes de *PpZAT12*, provenientes de las variedades en estudio**

Con el interés de determinar mutaciones que justifiquen las importantes diferencias transcripcionales encontradas en las variedades bajo estudio, se clonaron y secuenciaron regiones regulatorias de *PpZAT12* a partir de ADN genómico proveniente de las mismas. Se amplificaron 1861 pb (ver tabla 3.9 por cebadores) incluyendo el 5' UTR y no se observaron diferencias en las estructuras primarias. Esto indicaría que otros elementos, mecanismos epigenéticos, modificaciones en expresión y/o activación de elementos *trans*, y/o regulaciones postranscripcionales podrían intervenir de manera variedad-específica para afectar sus niveles de transcripto y, por ende, posiblemente su funcionalidad en células frutales.

Tampoco se han observado diferencias en las secuencias codificantes al ser clonadas a partir de las variedades seleccionadas.

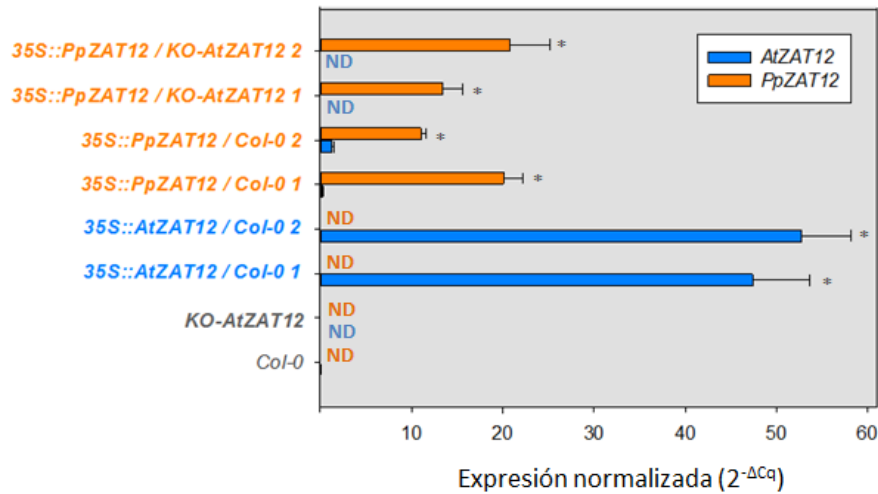
#### **6.3.5. Caracterización fenotípica de genotipos de *A. thaliana* relativos a *AtZAT12* y *PpZAT12*, obtenidos en la presente tesis**

Con el fin de profundizar el conocimiento de los mecanismos moleculares de acción de los FTs ZAT12 en estudio en un sistema vegetal conocido, se obtuvieron líneas transgénicas de *A. thaliana* con pérdida y ganancia de función de *AtZAT12* y *PpZAT12*. Se adquirieron comercialmente semillas mutantes en *AtZAT12* (CS352165, de ahora en más *KO-AtZAT12*) y se procedió a transformar óvulos (Floral Dip) para expresar constitutivamente *AtZAT12* en el genotipo *Col-0* (*35S::AtZAT12/Col-0*) o *PpZAT12* sobre *Col-0* (*35S::PpZAT12/Col-0*) y *KO-AtZAT12* (*35S::PpZAT12/KO-AtZAT12*). Se utilizó el vector binario pGREENII portador de *AtZAT12* o *PpZAT12* bajo el promotor *35S* y el terminador 3' *ocs*.

Luego de la correspondiente selección de homocigotas mutantes y sobreexpresantes, que permitió obtener diferentes líneas independientes de trabajo para cada genotipo (excepto el mutante, ver sección 3.10), se verificaron los niveles de los transcriptos *AtZAT12* y *PpZAT12* en hojas adultas de los mismos (fig. 6.12). Se confirmó que los genotipos construidos presentan niveles de transcriptos que lograron ser disminuidos (*AtZAT12*) por la inserción del ADN-T (*KO-AtZAT12*) o aumentados por encima de los niveles naturales de *Col-0* (ambos, en los genotipos sobreexpresantes bajo el promotor *35S*). Es destacable también que el diseño de primers para RT-



qPCR no presentó amplificaciones cruzadas y que la ausencia de *AtZAT12* no genera ningún mecanismo que impida generar un aumento de los niveles de *PpZAT12*.



**Figura 6.12** Expresión génica de *AtZAT12* y *PpZAT12* a nivel de transcritos en *A. thaliana Col-0* y en los genotipos relacionados a *AtZAT12* y *PpZAT12*. Se tomaron muestras de hojas adultas (30 d) de los diferentes genotipos construidos. La expresión se calculó mediante la fórmula  $2^{-\Delta Cq}$  (Cq, ciclo de cuantificación) y se normalizó a aquella correspondiente al gen de referencia *UBQ10*. Se graficaron los promedios y los desvíos de los resultados obtenidos a partir de al menos tres réplicas biológicas, de una o dos líneas independientes construidas. Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ) respecto a *Col-0*. ND, No Detectado.

### 6.3.5.1. Caracterización fenotípica de líneas con pérdida de función de *AtZAT12* y ganancia de función de *AtZAT12* y *PpZAT12*, cultivadas en condiciones normales

Es interesante destacar que rasgos particulares en la morfología de las hojas, incluyendo curvatura y coloración oscura, se pudieron evidenciar durante la selección de los genotipos sobreexpresantes, siendo más claros para las líneas *35S::AtZAT12* en la generación T2 homocigota, aunque desde la heterocigosis para las líneas *35S::PpZAT12/Col-0* y */KO-AtZAT12*. Adicionalmente, fueron parámetros para el mismo procedimiento de selección. Estos detalles se pueden visualizar en las figuras 6.13 y 6.15a.

A modo cualitativo y en general, no se observaron rasgos fenotípicos diferenciales de plantas *KO-AtZAT12* respecto a *Col-0*, considerando individuos cuyo crecimiento y desarrollo se observó en condiciones normales (24 °C y fotoperíodo 16 h luz/ 8 h oscuridad).

Sin embargo, las plantas con niveles aumentados de los transcritos *ZAT12* presentan un retardo importante en el desarrollo y un menor tamaño con respecto a *Col-0*. Asimismo, se observó un retraso en la floración y la senescencia, y un aumento en la cantidad de hojas (que condice con el alargamiento de la fase vegetativa). La tabla 6.3 muestra parámetros de desarrollo recopilados para los diferentes genotipos en estudio. Por otro lado, las líneas sobreexpresantes presentan raíces de menor tamaño, hojas curvadas hacia arriba (hiponásticas) y con bordes

cloróticos, y, en etapas reproductivas, silicuas que apuntan hacia abajo, menor producción de semillas y semillas abortivas.

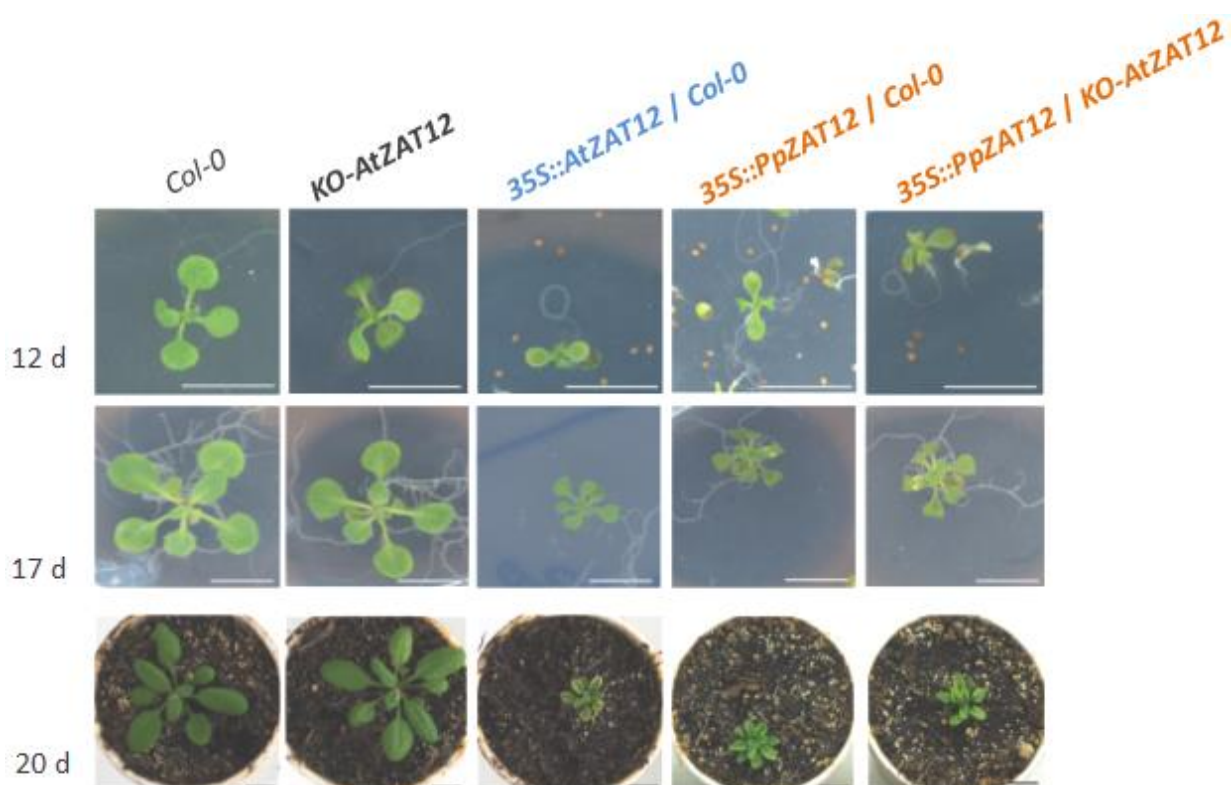
**Tabla 6.3 Parámetros de desarrollo de los genotipos relacionados *AtZAT12* y *PpZAT12***

Genotipo	Floración (d) *	Senescencia (d) **
<i>35S::PpZAT12 / KO-AtZAT12</i>	57 ± 4	92 ± 5
<i>35S::PpZAT12 / Col-0</i>	54 ± 1	87 ± 3
<i>35S::AtZAT12 / Col-0</i>	35 ± 2	71 ± 4
<i>KO-AtZAT12</i>	22 ± 1	51 ± 2
<i>Col-0</i>	21 ± 1	50 ± 3

\* considerada al elongarse 1 cm el tallo floral

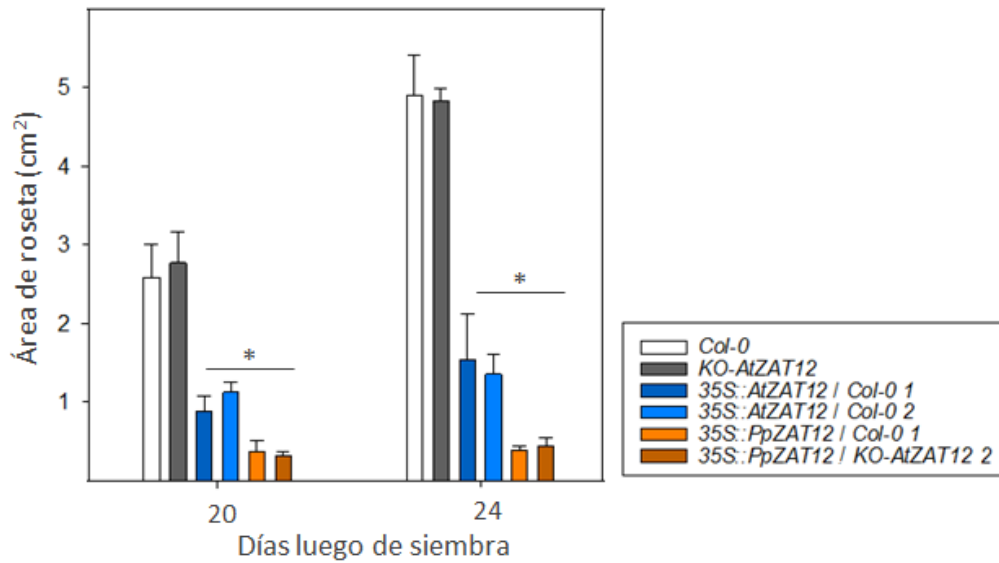
\*\* considerado al evidenciarse la planta senescente en su totalidad

Las diferentes imágenes agrupadas en la figura 6.13 señalan los rasgos principales de los fenotipos asociados a la expresión constitutiva de los genes *At* o *PpZAT12* en el sistema vegetal de *A. thaliana*. Se recopilaron imágenes desde el crecimiento en placa hasta el traspaso a suelo. Los fenotipos descritos se observaron en al menos dos líneas diferentes para cada constructo x genotipo base, sin embargo, para fines prácticos, las imágenes refieren a una línea en particular para cada caso.



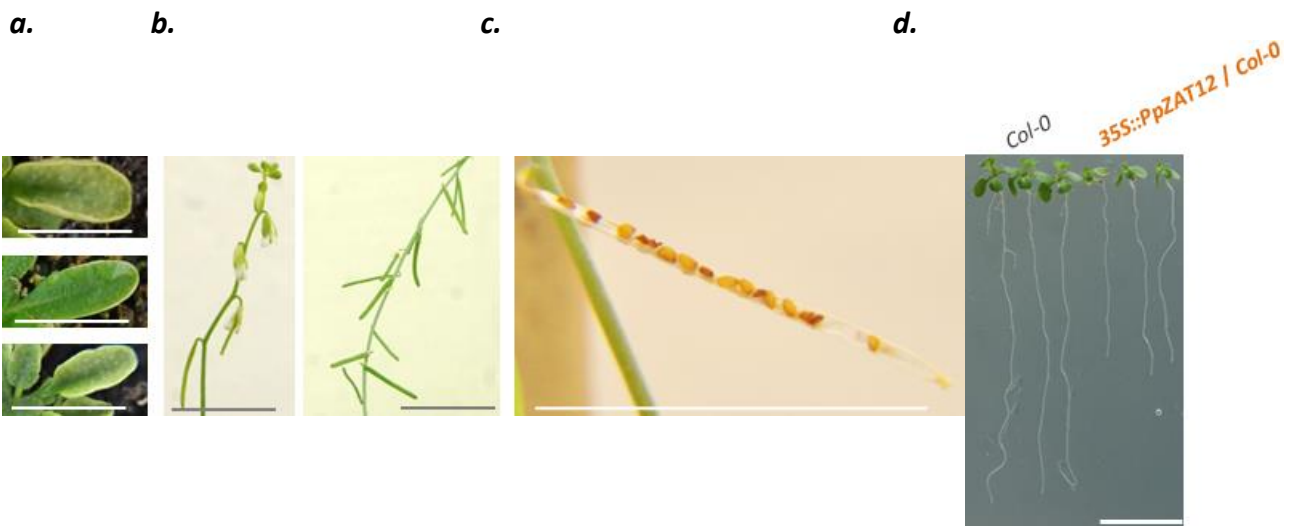
**Figura 6.13 Retraso en crecimiento y menor tamaño de líneas sobreexpresantes de *AtZAT12* o *PpZAT12*.** Se observan crecimientos en placa y suelo. Es evidente el menor tamaño de las líneas con ganancia de función durante la fase de crecimiento vegetativa. Las barras indican 1 cm.

Adicionalmente, se realizaron determinaciones del área de roseta en dos momentos del desarrollo para las líneas en estudio. La figura 6.14 permite ver los resultados obtenidos.



**Figura 6.14 Determinación del área de roseta de los genotipos relativos a los genes ZAT12.** Se tomaron fotografías calibradas y se midieron en el software ImageJ. Se graficaron los promedios y desvíos de los resultados obtenidos a partir de al menos tres réplicas biológicas, de una o dos líneas independientes construidas. Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ) respecto a *Col-0*.

En la figura 6.15, se detallan otros rasgos llamativos asociados a las líneas transgénicas sobreexpresantes construidas: raíces jóvenes de menor tamaño (*d*), hojas curvadas hacia arriba y con bordes cloróticos (*a*), silicuas que apuntan hacia abajo (*b*), producción de semillas afectada (*c*). Si bien se muestran algunos individuos o líneas, hay similitudes en los fenotipos discutidos entre las líneas con ganancia de función de *At* y *PpZAT12*



**Figura 6.15 Características fenotípicas particulares de líneas sobreexpresantes de *AtZAT12* o *PpZAT12*.** *a*) Hojas curvadas hacia arriba y con bordes cloróticos (35 d). *b*) Silicuas que apuntan hacia abajo de *35S::AtZAT12 / Col-0* (50 d). *c*) Producción de semillas por silicua y semillas abortivas en *35S::PpZAT12 / Col-0* (65 d). *d*) Raíces jóvenes de plantas *35S::PpZAT12 / KO-AtZAT12* (11 d). Las barras indican 1 cm.

A partir de las figuras y la tabla anterior, se puede observar una importante similitud de los fenotipos de *35S::AtZAT12* y *35S::PpZAT12* lo cual podría sugerir rasgos comunes en funcionalidad a nivel molecular, activos en este sistema vegetal.

Adicionalmente, pueden señalarse algunas diferencias entre los genotipos relativos a *AtZAT12* y *PpZAT12*, que pueden atribuirse exclusivamente a rasgos distintivos de sus productos génicos. Una observación interesante es el efecto de dosis de las copias de *35S::AtZAT12*. Mientras que el fenotipo drástico de ganancia de función de *PpZAT12* pudo observarse desde la heterocigosis, la figura 6.16a demuestra cómo el mismo se acentúa debido a la sobreexpresión de *AtZAT12* cuando el estado es de homocigosis. La curvatura de las hojas se mantiene pero el tamaño es menor para las plantas homocigotas. Otra diferencia importante entre los genotipos asociados a los ortólogos es el hecho de que en homocigosis, las líneas *35S::AtZAT12* equiparan su tamaño de roseta a *Col-0* cuando cambian a desarrollo reproductivo (fig. 6.16b), produciendo más silicuas y semillas que las líneas *35S::PpZAT12*, las cuales continúan su desarrollo aún cuando *Col-0* ha alcanzado etapas avanzadas de la senescencia de (fig. 6.16c).

**a.**



**b.**



**c.**



**Figura 6.16 Fenotipos adicionales de plantas *35S::AtZAT12* y *35S::PpZAT12* adultas en comparación a *Col-0*.** **a)** Efecto de dosis de *35S::AtZAT12* en el tamaño general. Plantas de 30 d. Las líneas transgénicas en heterocigosis solamente poseen curvatura de las hojas respecto a *Col-0*. **b)** Fase reproductiva de plantas *35S::AtZAT12* respecto a *Col-0*. Plantas de 51 d. Es detectable que el tamaño de roseta se equipara respecto al de *Col-0* en la fase reproductiva, rasgo que no se observa en las líneas *35S::PpZAT12*. **c)** Tamaño máximo de roseta que adquieren las líneas *35S::PpZAT12*. Plantas de 57 d. Se observa el importante retraso en desarrollo de las líneas *35S::PpZAT12* respecto a *Col-0*. Barras indican 1 cm.

Es interesante destacar que si bien la expresión constitutiva de estos factores puede comprometer aspectos fisiológicos y moleculares no relacionados con los roles moleculares de estos FTs (debido a introducir cambios radicales en su presencia espacio-temporal en estos organismos transgénicos), nos centramos en la similitud de los fenotipos de *35S::AtZAT12* y *35S::PpZAT12* debido a que la misma podría sugerir mecanismos moleculares de acción comunes.

### 6.3.6. Evaluación de determinantes moleculares con expresión génica diferencial en genotipos relativos a *AtZAT12* y *PpZAT12*

Para caracterizar a nivel molecular los genotipos relativos a genes *ZAT12* construidos, se llevaron a cabo análisis *in silico* así como también transcriptómicos y proteómicos en los mismos.

#### 6.3.6.1. Análisis de niveles de transcritos de ARNms afectados en *35S::AtZAT12*

Rizhsky y col., (2004), Vogel y col. (2005) y Davletova y col. (2005b) determinaron transcriptomas de plántulas con genotipo *35S::AtZAT12* (con 15, 10 y 5 d de edad, respectivamente), identificando numerosos ARNms con expresión modificada por la mencionada ganancia de función. Vogel y col., (2005), en particular, definieron el posible regulón de *AtZAT12* durante la aclimatación al frío, ortogándole el segundo rol en importancia en este proceso.

*In silico*, recopilamos y contrastamos los genes modificados en *35S::AtZAT12* con bases de datos de expresión en frío derivadas de Vogel y col (2005), ExPath y Shi y col. (2017), así como también con la presentada por Pons y col. (2014) con regulones relacionados a la aclimatación al frío. Los resultados se observan en la tabla 6.4.

**Tabla 6.4 Recopilación de información relacionada a los ARNms afectados en *35S::AtZAT12***

Grupo de ARNms según expresión en <i>35S::AtZAT12</i>		Regulon(es) en frío (Boyce y col., 2003; Pons y col., 2014) CBF ICE1 HOS9 ESK1 SRF6 MYB-MYC	Expresión de ARNm en frío (ExPath; Vogel y col., 2005; Shi y col., 2017)	
			Inducidos	Reprimidos
Inducidos	148	43 (excepto SRF6)	49	22
Reprimidos	512	90	125	130

Es interesante observar que hay mayoría de transcritos regulados negativamente por la ganancia de función de *AtZAT12*. Esto condice con su posible rol represor (Vogel y col., 2005). También son más los ARNms reprimidos por *AtZAT12* y modificados por frío. Estos contrastes refuerzan la idea de una funcionalidad de *AtZAT12* en frío. En la presente tesis, decidimos seleccionar y evaluar algunos de estos posibles blancos (directos o indirectos) de *AtZAT12*

mediante RT-qPCR en hojas adultas de los genotipos en estudio. La tabla 6.5 muestra los genes evaluados, con anotaciones funcionales y pertenencia a algún otro regulón del frío.

**Tabla 6.5 Transcritos afectados en 35S::AtZAT12 a evaluar en este trabajo**

Transcripto(s)		Descripción	35S::AtZAT12	Regulon en frío	Expresión en frío
<b>AZI3</b>	At4g12490.1	<b>AZelaic acid - Induced 3</b> Inhibidor bifuncional/Proteína de transferencia de lípidos/Proteína de la familia albúmina 2S de almacenamiento en semilla. Priming contra patógenos, inducibles por AzA	UP	CBF (UP)	UP
<b>SOC1</b>	At2g45660.1 y .2	<b>Suppressor of Overexpression of CO 1</b> Proteína MADS/AGL20-like. Floración	DOWN	ESK1	UP
<b>PAP1</b>	At1g56650.1	<b>Production of Anthocyanin Pigment 1</b> FT de la familia MYB. Síntesis de antocianinas	UP	ESK1	UP
<b>DWF1</b>	At3g19820.1, .2 y .3	<b>DWarF1</b> . Proteína de elongación celular. Primer paso en la síntesis de BRs	DOWN	-	-
<b>ACO1</b>	At2g19590.1 y .2	<b>ACc Oxidase 1</b> Similar a ACO1. Síntesis de Et	DOWN	MYB-MYC	DOWN
<b>PMEI</b>	At5g20740.1 y .2	<b>Pectin MEthylesterase Inhibitor 1</b> Inhibidor Enzimático de actividad PME	UP	-	-
<b>NAP</b>	At1g69490.1	<b>NAC-like (NAC029) AP3/PI-activaed</b> Dominio No Apical Meristem (NAM) Inducida por homeóticos AP3 y PI en primordio floral y asociada a senescencia foliar y frutal (es un SAG)	DOWN	ESK1	UP

ACC, ácido 1-AminoCiclopropano-1-Carboxílico; AGL, AGamous-Like; AzA, ácido AZelaico; BR, BRasinosteroides; SAG, Senescence-Associated Gene.

Luego, la figura 6.17 muestra los resultados experimentales obtenidos por nuestro grupo. En el caso de los transcritos *DWF1*, *AZI3* y *SOC1*, los resultados confirman lo esperado según los reportes de genotipos 35S::AtZAT12 en al menos una de las líneas sobreexpresantes analizadas.

Un caso llamativo es *NAP* que presentó altos niveles únicamente en hojas de las líneas 35S::PpZAT12 y no se observaron cambios para la mutante o 35S::AtZAT12, a pesar de haberse reportado reprimido en plántulas. *NAP*, un FT NAC, está asociado positivamente a la senescencia foliar y de silicuas, debido a que en hojas genera un aumento del ARNm de la enzima biosintética de ABA, AAO3 (Abscisic Aldehyde Oxidase 3), y de la fitohormona, inductora del proceso (Kou y col., 2012; Yang y col., 2014). Por ello, un posible aumento de su funcionalidad en líneas 35S::PpZAT12 contrasta con su importante retardo en la senescencia, indicando que otras vías inducidas por *PpZAT12* pueden afectarla negativamente a pesar del aumento de *NAP*. También se



puede destacar que *NAP*, al ser inducido por frío (tabla 6.5), podría tener roles en la respuesta a bajas temperaturas. Más aún, se han reportado roles en respuestas a estrés osmótico y en la regulación del FT *AREB1*, implicado en las respuestas a alta salinidad (Seok y col., 2017).



**Figura 6.17** Expresión génica relativa a *Col-0* de putativos blancos de *AtZAT12* a nivel de transcripción en *A. thaliana Col-0* y en los genotipos relacionados a *AtZAT12* y *PpZAT12*. Se tomaron muestras de hojas adultas (30 d) de los diferentes genotipos construidos. La expresión se calculó mediante la fórmula  $2^{-\Delta Cq}$  ( $Cq$ , ciclo de cuantificación), se normalizó a aquella correspondiente al gen de referencia *UBQ10* y se relativizó al promedio obtenido para *Col-0* (marcado en cada gráfico como la unidad). Se graficaron los promedios y desvíos de los resultados obtenidos a partir de al menos tres réplicas biológicas, de una o dos líneas independientes construidas. Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ) respecto al valor de *Col-0*. OE, línea sobreexpresante de *AtZAT12* o *PpZAT12*.

Por otro lado, mientras que *ACO1* no presentó cambios en los genotipos y *PAP1* disminuyó en todos ellos (aunque se describió inducido), *PMEI* solo se indujo significativamente en *KO-AtZAT12* y *35S::PpZAT12/KO-AtZAT12*, sin ser afectado en *35S::PpZAT12/Col-0*, lo que podría indicar que no es afectado por la ganancia de función de *AtZAT12* o *PpZAT12*.

Los ARNm *DWF1*, *AZI3* y *SOC1* son buenos candidatos como genes corriente abajo de la acción de *At* y *PpZAT12* por lo que los efectos sobre los primeros, activos en genotipos OEs, podrían deberse a mecanismos moleculares conservados entre los FTs ortólogos en estudio.

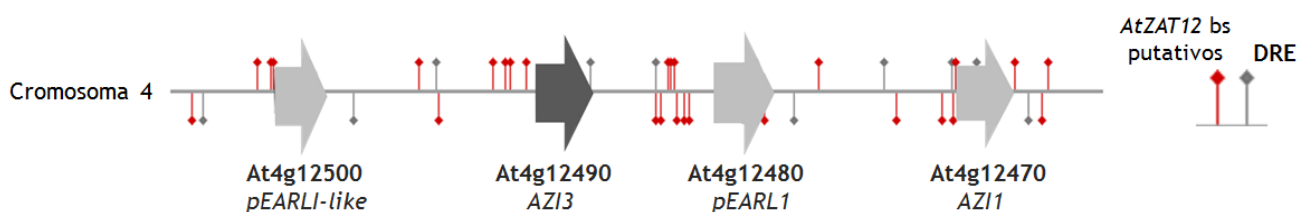
El gen *SOC1* es un FT del tipo AGAMOUS (MADS box) que integra múltiples señales derivadas de fotoperíodo, temperatura, hormonas y edad. *CO* (*CONSTANS*) y *FLC* (*Flowering Locus C*), dos FTs reguladores de floración antagonistas, regulan a *SOC1*. Cuando *SOC1* es activado en el ápice caulinar, el mismo induce a *LFY*, un gen de identidad de meristema floral (Lee y Lee, 2010), entre otros blancos (Immink y col., 2012). Nuestros resultados sugieren una disminución en los niveles del ARNm *SOC1* en hojas de los genotipos sobreexpresantes, que contrasta con los mayores niveles que posee *KO-AtZAT12*, con respecto a *Col-0*. El efecto sobre *SOC1* podría explicar, al menos en parte, el retardo en la floración de las OEs, aunque se desconoce qué señal/es y/o que mecanismos que intervengan en la expresión de este regulador central estarían afectados en los genotipos en estudio. No se puede describir lo mismo para el caso de *KO-ATZAT12*, ya que a pesar de poseer niveles afectados de *SOC1*, no presentó diferencias en el tiempo de floración respecto a la línea *Col-0*. Nuevas mediciones podrían llevarse a cabo en tejidos de los diferentes genotipos en estadio de floración.

El ARNm *DWF1* codifica para una  $\Delta(24)$ -esterol- $\Delta(24)$ -reductasa, localizada en RE y membrana plasmática (Silvestro y col., 2013), que cataliza la conversión de 24-metilenecolesterol a campesterol, paso inicial en la síntesis de brasinosteroides (BRs), importantes promotores del crecimiento. Genotipos mutantes en este gen poseen mayor número de hojas, hojas más redondeadas, roseta compacta, floración y senescencia retrasadas, y menor tamaño general, esto último relacionado con una disminución de la elongación celular, debida a la deficiencia de BRs (Schröder y col., 2014; Saini y col., 2015). Una caída importante de *DWF1* se observó en las líneas sobreexpresantes (lo que posiblemente conlleve una deficiencia de BRs en estos sistemas), mientras que el fenotipo opuesto se obtuvo para la línea mutante de pérdida de función. La disminución de *DWF1* podría explicar el menor tamaño de estas plantas y contribuir al retraso en la floración y senescencia, y a efectos en su acción cruzada con otras hormonas (Saini y col., 2015), aunque verificar los niveles de BRs sería interesante para confirmarlo. Por otro lado, la



conservación del efecto sobre este transcripto por parte de la expresión constitutiva de ambos genes *ZAT12* indica su mecanismo molecular común (a través de ZFs y/o EAR motif), aunque no se observaron fenotipos asociados al posible aumento de su funcionalidad en individuos *KO-AtZAT12*. Otro aspecto interesante a remarcar acerca del posible nivel afectado de BRs en genotipos relacionados a los ortólogos *ZAT12* es su capacidad de inducir tolerancia a estrés por temperatura y otros estímulos. Se cree que el efecto positivo es estrictamente dependiente de la concentración y que podría basarse en su acción cruzada con otras fitohormonas (Ahammed y col., 2015) y en la modulación de enzimas detoxificadoras de EROs (Vardhini y Anjum, 2015).

Un transcripto con comportamiento interesante es *AZI3*, *AZa-induced 3* (AzA, ácido azelaico). Vogel y col. (2005) lo reportaron junto a *pEARLI* (*EARLY arabidopsis aluminium Induced 1*), *AZI1* y *pEARLI-like* como blancos de los regulones *ZAT12* y *CBF*, e inducidos por frío. Los genes mencionados se encuentran en un cluster genómico junto a otros cinco loci que codifican para proteínas similares. Las mismas son proteínas ricas en hidroxiprolina que se ubican en RE, plasmodesmos, membrana plastídica externa y otros sitios de contacto membranosos para participar en el intercambio de lípidos, en especial de AzA, una señal derivada de la oxidación de galactolípidos plastídicos y sistémica para la defensa vegetal frente a patógenos (Cecchini y col., 2015). De la misma manera, se han asociado a otras respuestas frente a estrés que derivan en la remodelación de lípidos de la membrana plastídica externa, tales como bajas temperaturas y salinidad (Moellering y col., 2010). Adicionalmente, estas proteínas son capaces de conferir tolerancia al congelamiento en células de levadura y vegetales, y de otorgar ventajas durante la germinación en frío (Xu y col., 2011a y b). Esto se condice con la acción positiva de *AtZAT12* en la aclimatación al frío y propone una posible similitud por parte de *PpZAT12* en duraznos. La figura 6.18 muestra el análisis de la región genómica de los genes *AZI*, señalando elementos *cis* DRE y aquellos enriquecidos en promotores afectados por la sobreexpresión de *AtZAT12* y por frío (son posibles sitios de unión de *AtZAT12* u otro/s factor/es corriente abajo del mismo, no probados experimentalmente; Vogel y col., 2005). Es interesante la acumulación de estos motivos, lo que sugeriría un efecto importante de los FT *ZAT12* en el inicio transcripcional de este grupo de genes en esta región genómica. Nuevos experimentos permitirán verificar estas hipótesis y, por otra parte, la conservación de estos mecanismos en frutos de durazno.



**Figura 6.18 Análisis de elementos *cis* en regiones regulatorias de genes *AZIs*.** Cuatro de los nueve genes monoexónicos codificantes de *AZIs* o productos génicos relacionados, se señalan en gris. Rombos en rojo representan elementos *cis* putativos de unión a *AtZAT12*, mientras que aquellos grises son DREs.

De manera adicional, podrían intervenir en la elongación celular en hojas y en el retraso en la floración observado, dado que se reportó que plantas con niveles disminuidos de *AZIs* florecen tempranamente, y poseen bajos niveles de *FLC* y aumentos de *SOC1* y *FT* (Shi y col., 2011). Esta observación también podría indicar que la regulación de *SOC1* en los genotipos en estudio se debe, al menos en parte, a los roles de *AZIs*.

### 6.3.6.2. Proteómica diferencial de hojas adultas en floración de los genotipos en estudio

Para profundizar en los efectos debidos a los FTs en cuestión, exploramos las diferencias a nivel peptídico (proteínas solubles) entre los genotipos relativos a los genes *ZAT12* ortólogos. Aplicamos un enfoque proteómico de LFQ y LC-MS/MS mediante el servicio de CEQUIBIEM, sobre muestras de hoja de roseta adultas de los genotipos en estadio de floración (ver la sección 3.12.2). Los genotipos de trabajo fueron: *Col-0* (floración aproximada a los 21 d), *KO-AtZAT12* (22 d), *35S::AtZAT12/Col-0* (35 d), *35S::PpZAT12/Col-0* (54 d) y *35S::PpZAT12/KO-AtZAT12* (55 d).

Fue de interés realizar las siguientes comparaciones estadísticas de los niveles cuantificados de péptidos: *KO-AtZAT12* vs. *Col-0*, *35S::AtZAT12/Col-0* vs. *Col-0*, *35S::PpZAT12/KO-AtZAT12* vs. *KO-AtZAT12* y *35S::PpZAT12/KO-AtZAT12* vs. *Col-0*. Luego de la identificación (ProteomeDiscoverer) y análisis estadísticos (Perseus), los resultados obtenidos rindieron 488 péptidos diferenciales (PEDs,  $p < 0.05$  y  $\log_2$  fold change  $> 2$  ó  $< -2$ ) en al menos una de las comparaciones realizadas. Los mismos se pueden observar en la **tabla suplementaria SXII**.

Seguidamente se conformaron grupos basados en la expresión de los péptidos en los genotipos. *KO-AtZAT12*\_PEDs y *35S::AtZAT12*\_PEDs provienen, como es esperado, de las correspondientes comparaciones con *Col-0*, su genotipo de base. Sin embargo, para obtener *35S::PpZAT12*\_PEDs se sumaron los PEDs que provienen de la comparación de *35S::PpZAT12/KO-AtZAT12* con su genotipo de base *KO-AtZAT12* y también aquellos diferenciales respecto a *Col-0*, no modificados de igual manera en la comparación *KO-AtZAT12* vs. *Col-0*.

En el caso de un PED, por ejemplo disminuido en la comparación *35S::PpZAT12/KO-AtZAT12* vs. *Col-0* y también disminuido en *KO-AtZAT12* vs. *Col-0*, primero se verificó la comparación inicial *35S::PpZAT12/KO-AtZAT12* vs. *KO-AtZAT12*, quedando dentro del grupo *35S::PpZAT12\_PEDs\_R* solamente si esta última era significativamente menor, evidenciando un efecto de la sobreexpresión. Si bien la mayoría de PEDs con efecto del genotipo mutante no poseían efecto adicional de la ganancia de función de *PpZAT12*, quedaron 2 PEDs inducidos (inducidos en *35S::PpZAT12/KO-AtZAT12* vs. *Col-0*, *KO-AtZAT12* vs. *Col-0* y en *35S::PpZAT12/KO-AtZAT12* vs. *KO-AtZAT12*) y 1 reprimido en estas mencionadas categorías.

Los resultados, junto a contrastes con otras bases, se pueden visualizar en la tabla 6.6.

**Tabla 6.6 Grupos de PEDs en los genotipos relativos a genes *ZAT12***

Grupo			Transcriptómica <i>35S::AtZAT12</i> *	Regulon(es) en frío **	Expresión en frío		
					ARNm ***		Péptido ****
					I	R	
<i>KO-AtZAT12</i> _PEDs	I	52	1 R y 1 I	3	2	6	7
	R	68	8 R y 2 I	5	6	4	4
<i>35S::AtZAT12</i> _PEDs	I	82	6 R y 6 I	13	6	8	5
	R	61	8 R y 1 I	6	5	6	5
<i>35S::PpZAT12</i> _PEDs	I	243	17 R y 13 I	26	30	23	23
	R	105	9 R y 4 I	12	8	21	7

\* Transcriptómicas *35S::AtZAT12*: Rizhsky y col., 2004, Vogel y col., 2005 y Davletova y col., 2005b.

\*\* Regulones en frío: *srf6* (Boyce y col., 2003) y demás detallados por Pons y col., 2014.

\*\*\* Información de expresión a nivel de ARNm en frío: ExPath, Vogel y col., 2005, Shi y col., 2017

\*\*\*\* Péptido de expresión afectada en frío. Información de PPDB: Kawamura y Uemura, 2003; Minami y col., 2009; Li y col., 2011; Li y col., 2012; Takahashi y col., 2016

Las discrepancias entre las reportadas transcriptómicas y los datos proteómicos del genotipo *35S::AtZAT12* podrían deberse a, además de las condiciones experimentales, el estadio de desarrollo utilizado, sugiriendo que múltiples efectos moleculares serían generados por la modificación genotípica a lo largo del desarrollo. Por otra parte, modificaciones transcripcionales pueden no encontrar su correspondencia con cambios a nivel peptídico si son blancos de mecanismos post-transcripcionales. Cabe destacar que la verificación de moléculas diferenciales a nivel proteómico además del transcriptómico puede conferir mayor información a la hora de concluir acerca de los efectos del genotipo y/o tratamiento en estudio.

Ningún péptido correspondiente a los transcritos analizados en la sección 6.3.6.1 fue identificado en el enfoque proteómico como afectado. Si bien los casos de ARNm modificados en niveles menores podrían ser dificultosos de revelar por la técnica proteómica utilizada, es llamativa la ausencia de AZI3 y/o proteínas relacionadas. Cabe destacar el posible efecto de la formación de grandes complejos multiproteicos por parte de AZIs, la interacción con membranas internas y externas y con pared celular, y sus importantes glicosilaciones (Pitzschke y col., 2014), que podrían dificultar su extracción y posterior análisis.

Los subgrupos de PEDs con expresión afectada por la ganancia de función y, adicionalmente, por bajas temperaturas conforman el regulón de *AtZAT12* y *PpZAT12* a nivel peptídico. Dentro del grupo de PEDs inducidos por frío y en *35S::AtZAT12* únicamente, podemos destacar a RD29A/LTI78 (Low Temperature-Induced 78) mientras que, como reprimido en este mismo genotipo y en frío, a CYP38, una ciclofilina que funciona en el ensamblado y mantención del fotosistema II (Sirpiö y col., 2008). Por su parte, los genotipos transgénicos con expresión heteróloga de *PpZAT12* también presentan péptidos diferenciales únicos. Un péptido que se induce, cuya expresión aumenta en frío (a nivel de transcritos y proteína), y aumenta también en *35S::AtZAT12* (reportado previamente) es AIR12 (Auxin-Induced in Root cultures 12), un citocromo *b* regulador del estado redox de apoplasto y actor en la tolerancia a patógenos (Costa y col., 2015). De manera opuesta, este genotipo presentó como reprimidos y reducidos en frío a HSP70, FTSH1 metaloproteasa involucrada en la reparación del PSII (Zaltsmann y col., 2005) y a la lipooxigenasa LOX2, que actúa en la oxidación de lípidos plastídicos frente a patógenos (Zoeller y col., 2012).

Seguidamente, es interesante remarcar aquellos PEDs con tendencias comunes en ambas líneas con ganancia de función. Estos PEDs son buenos candidatos de ubicarse corriente abajo de *AtZAT12* y *PpZAT12*. La tabla 6.7 los recopila, remarcando los contrastes con otras bases.

**Tabla 6.7 Intersección de PEDs de los genotipos *35S::AtZAT12* y *35S::PpZAT12***

Grupo			<i>35S::PpZAT12</i> / <i>KO-AtZAT12</i> vs. <i>35S::AtZAT12</i> / <i>Col-0</i>	Transcriptómica <i>35S::AtZAT12</i> *	Regulon(es) en frío **	Expresión en frío		
						ARNm ***		Péptido ****
						I	R	
<i>35S::AtZAT12</i> _PEDs	_I	39	6 I	3	9	5	4	3
y <i>35S::PpZAT12</i> _PEDs	_R	16	2 R	3	3	2	5	1

\* Transcriptómicas *35S::AtZAT12*: Rizhsky y col., 2004, Vogel y col., 2005 y Davletova y col., 2005b.

\*\* Regulones en frío: srf6 (Boyce y col., 2003) y demás detallados por Pons y col., 2014.

\*\*\* Información de expresión a nivel de ARNm en frío: ExPath, Vogel y col., 2005, Shi y col., 2017

\*\*\*\* Péptido de expresión afectada en frío. Información de PPDB: Kawamura y Uemura, 2003; Minami y col., 2009; Li y col., 2011; Li y col., 2012; Takahashi y col., 2016

Destacamos los péptidos inducidos en ambos genotipos y también inducidos (a nivel de ARNm) en condiciones de bajas temperaturas, dado que los mismos podrían ser regulados positivamente por la acción de *ZAT12* en estas condiciones. Entre ellos, encontramos una proteína LEA (Late Embryogenesis Abundant) citosólica y con alta expresión en flores y silicuas (Candat y col., 2014), una PR2 (Pathogenesis Related 2) involucrada en la deposición de calosa durante la respuesta a patógenos (Oide y col., 2013), y una chalcona isomerasa CHI que podría contribuir a la protección antioxidante aumentando los niveles de flavonoides y participar en la elongación celular afectada por quercetinas (Lewis y col., 2011). Un caso más es el de CSDP1, mencionada en el capítulo 5: una ARN chaperona involucrada en adecuar la traducción a bajas temperaturas, señalando un importante subregulón dependiente de ambas *AtZAT12* y *PpZAT12* para la tolerancia al frío (Juntawong y col., 2013).

También se podría destacar al PED correspondiente a la peroxidasa de pared celular PRX34, con niveles peptídicos afectados por frío, y relacionada con la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como molécula señalizadora durante la defensa (Mammarella y col., 2015). Por otro lado, se ha descrito su intervención negativa en la elongación celular por lo que un exceso en su efecto conduce a fenotipos enanos posiblemente mediante la inactivación de auxinas promotoras del crecimiento (Passardi y col., 2006; Zhang y col., 2014), lo que hemos observado en la presente tesis para líneas sobreexpresantes de *ZAT12*.

Como reprimido en los genotipos con ganancia de función así como en frío a nivel de ARNm, mencionamos a At14a-Like1 o AFL1, una nueva proteína transmembrana de señalización y con rol positivo para el crecimiento vegetal frente a estímulos de sequía (Kumar y col., 2015).

### **6.3.6.3. Recopilaciones y análisis de información funcional sobre los grupos de PEDs relativos a los genotipos de *ZAT12***

Nos hemos centrado en la relación entre los PEDs identificados y la posible acción protectora de *AtZAT12* y *PpZAT12* frente a estímulos de bajas temperaturas; sin embargo, el análisis de anotaciones funcionales (obtenidas de MapMan y AgriGO) permitió obtener resultados adicionales acerca de los fenotipos observados, que suponen un primer acercamiento hacia la caracterización molecular de estos genotipos.

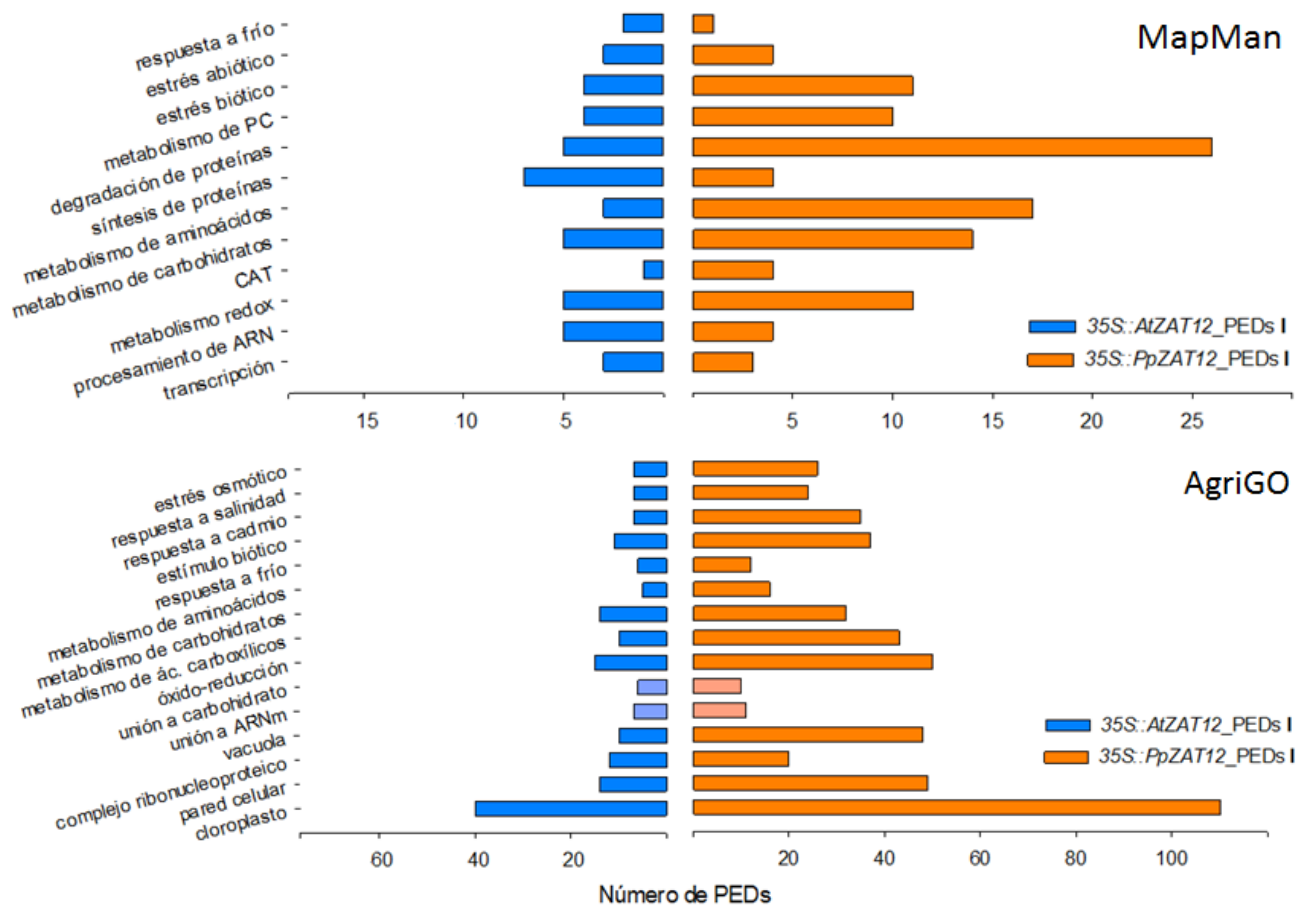
*KO-AtZAT12* posee numerosos PEDs respecto a *Col-0* a pesar de no evidenciar un fenotipo morfológico en las condiciones de crecimiento. Se observaron numerosos PEDs inducidos en esta mutante relacionados con funciones plastídicas, indicando la posible represión de los mismos por parte de *AtZAT12* en las plantas salvajes. Destacamos también a proteínas LHC del fotosistema II, a

SAL1/HOS2/FRY1 (nucleótido-fosfatasa), parte del sistema de señalización retrógrada por 3'-fosfoadenosina 5'-fosfato (PAP) (Estavillo y col., 2011), y TSN2 (Tudor-SN protein 2), implicada en la regulación post-transcripcional en gránulos de estrés de ARNms de proteínas a secretar (Gutierrez-Beltran y col., 2015). Por otro lado, dentro de aquellas funciones enriquecidas entre los PEDs disminuidos en *KO-AtZAT12*, podemos destacar la respuesta a varios estímulos estresores, el metabolismo de proteínas (incluyendo síntesis, plegamiento, modificaciones y degradación) y el metabolismo de EROs. Nuevamente, hay enriquecimiento de PEDs plastídicos en este grupo, indicando la prevalencia de la acción de *ZAT12* sobre esta organela. En particular, mencionamos a SUPERROOT1 (SUR1) y UGT74B1 cuyas mutaciones sobreproducen auxinas (ya que intervienen en su homeostasis al participar del metabolismo de sus glucosinolatos; Malka y Cheng, 2017), a DHAR3, requerida para la tolerancia a alta intensidad lumínica (Noshi y col., 2016), y a la isomerasa de puentes disulfuro PDIL, también plastídica, que es inducida por estrés a nivel del RE y participa en la reducción de la síntesis de la proteína D1 del PSII (Wittenberg y col., 2014).

Estos resultados, que reflejan importantes diferencias moleculares entre el genotipo mutante y *Col-0*, invitan a realizar nuevos experimentos en pos de contribuir al conocimiento de *AtZAT12* en su sistema natural.

La figura 6.19 muestra los resultados obtenidos para los *35S::AtZAT12\_PEDs* y *35S::PpZAT12\_PEDs* inducidos, en AgriGO y MapMan. Los mismos se pueden consultar en la **tabla suplementaria SXIII**.

A partir de la información obtenida, podemos destacar que la ganancia de función de ambos genes *ZAT12* interfiere con múltiples procesos plastídicos, afecta el metabolismo de carbohidratos y proteínas (síntesis y degradación), e interacciona con diferentes sistemas encargados del procesamiento de ARNs e incluso de la transcripción, con la posibilidad de ampliar los efectos al englobar también a otros reguladores de la expresión génica. El alcance que tiene sobre plástidos es importante debido a que se identificaron PEDs con funciones que abarcan desde el procesamiento de ARNs, traducción y degradación de proteínas plastídicas, hasta el metabolismo redox y la síntesis de metabolitos secundarios en esta organela.



**Figura 6.19 Gráficos de anotaciones comunes de MapMan y términos GO de AgriGO de PEDs inducidos en 35S::AtZAT12 y 35S::PpZAT12.** Se graficaron los números de PEDs según sus anotaciones de MapMan (arriba) o sus términos GO (abajo). Se consideraron las anotaciones comunes para los PEDs inducidos en 35S::AtZAT12 y 35S::PpZAT12, aunque información más detallada se puede consultar en la tabla suplementaria SXIII y se menciona en el texto. Adicionalmente, solo se graficaron aquellos términos GO estadísticamente enriquecidos en proporción respecto al genoma de *A. thaliana*. CAT, ciclo de los ác. tricarbóxicos, PC, pared celular.

En particular, se identificaron los siguientes PED en ambos genotipos: PCK1 (PEP Carboxiquinasa 1, parte del metabolismo de carbohidratos), CYSD2 (que actúa en la generación de sulfuros en citosol con fines de señalización; Gotor y col., 2015) y BGAL8 junto a PR2 (mencionada previamente). En cuanto a PEDs incluidos en la categoría de estrés biótico, podemos mencionar a PR2 y al inhibidor de tripsina KT11, el cual participaría adicionalmente en la elongación celular mediante su rol a nivel de pared celular (Irshad y col., 2008). Recordamos a CSP1, incluida en estímulos abióticos y frío así como también a MLP-related (Major Latex Protein-related).

Adicionalmente, es destacable la presencia común de PEDs relacionados a la transcripción, entre los cuales destacamos a WHYRLY 1 (WHY1). Inicialmente se descubrió como proteína de interacción con telómeros y con un rol en la regulación de su homeostasis (Yoo y col., 2007). Sin embargo, reportes posteriores lo demostraron como represor (por unión a promotor) de una kinesina *KP1* (Xiong y col., 2009), y lo propusieron como señal dependiente del estado redox

fotosintético ya que es movilizado de cloroplasto a núcleo para activar genes (Isemer y col., 2012; Foyer y col., 2014). De manera interesante, este regulador también se ha relacionado con la senescencia foliar, su mutante posee senescencia temprana y la función que lo asocia a la misma es su comprobada unión al y acción represora sobre el promotor de *WRKY53*, siendo este último FT responsable de la senescencia (Miao y col., 2013). La inducción de este regulador en plantas sumada quizás a otros mecanismos que aumenten su estabilidad y/o función (por ende su acción negativa en el desarrollo la senescencia) en el tiempo, podría implicarlo en la extensión del ciclo de vida de las plantas *35S::AtZAT12* y *35S::PpZAT12*.

Otra de las anotaciones enriquecidas fueron las relacionadas a unión y procesamiento de ARNs. Se identificaron 16 PEDs en *35S::AtZAT12\_* y/o *35S::PpZAT12\_* PEDs. Destacamos a la RBP (RNA-Binding Protein) CP31B plastídica, en común en ambos genotipos junto a la mencionada CSP1. Luego, de los 16 identificados, un PED es de splicing, tres son plastídicos (incluyendo una DEAD-box ARN helicasa), uno es un factor de elongación traduccional, tres son ribosomales, TSN2 ya fue mencionado (y su rol en gránulos de estrés), y restan otros PEDs que mencionaremos luego.

Como parte del metabolismo redox, podemos mencionar a PRX34 (ya detallados ciertos roles), tiorredoxinas como TRX5 y peroxidasas dependientes de TRX como TPX1, que modulan señalizaciones basadas en EROs para el desarrollo y respuestas a estrés (Qi y col., 2017).

Si bien ambos genotipos presentaron péptidos involucrados en la síntesis proteica, sólo se encontraron PEDs comunes implicados en la degradación de proteínas. Entre ellos, se identificó a la Ser proteasa SERPIN y a las proteínas RAD23C y UBC35, involucradas en la degradación de proteínas mediante ubiquitinación y proteasoma. UBC35 es requerida para el normal desarrollo radicular ya que regula a proteínas Aux/IAA, modulando la respuesta a auxinas (Wen y col., 2014).

Finalmente, hay otros procesos representados por PEDs inducidos en ambos genotipos en estudio incluyendo: síntesis de flavonoides (CHI, mencionada anteriormente), homeostasis de auxinas mediada por glucosinolatos, síntesis de ácidos grasos (LACS4), degradación de nucleótidos y, entre otros, la inducción de la proteína plastídica LEJ1/CBSX2 que activa el sistema de TRXs de cloroplastos, influyendo en el crecimiento (Yoo y col., 2011).

Es interesante remarcar que procesos adicionales se encuentran enriquecidos en la sobreexpresante de *PpZAT12*; entre ellos: respuesta antioxidante, defensa, respuesta a CK, envejecimiento, plegamiento proteico, señalización, cofactores. Algunos PEDs inducidos particularmente en el genotipo relativo a *PpZAT12* son: las RBPs GRP7 y LSM2, implicadas en el transporte de ARNs al citosol y en la aclimatación al frío (Kwak y col., 2011), y en el splicing (Perea-

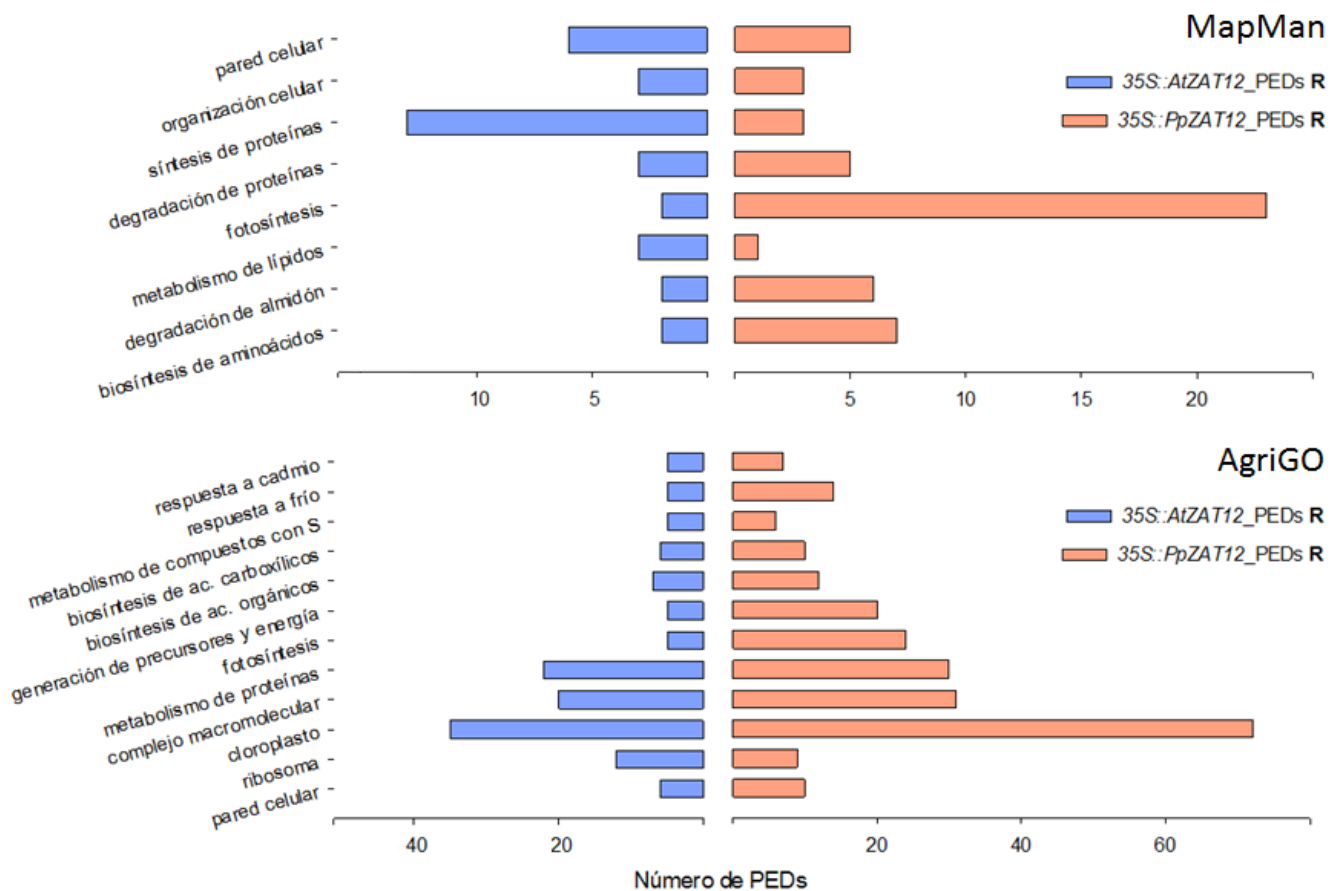


Resa y col., 2012), respectivamente; y las proteínas FAMT (SA), ACO2 (biosíntesis de Et), OPR3 (biosíntesis de JA), IAR3 y AIR12 (auxinas), relacionadas al metabolismo de hormonas.

COS1 (COI1-), por su parte, es una lumazina/riboflavina sintasa (parte de la categoría de metabolismo de cofactores y vitaminas) que actúa corriente abajo en la vía de JAs, suprimiendo los procesos mediados por COI1, incluida la senescencia (Xiao y col., 2004). Su inducción podría contribuir al fenotipo de senescencia retrasada exacerbado en las plantas *35S::PpZAT12*.

Se suman también componentes de señalización representados por la calmodulina CAM5 y la MAP quinasa MPK4, regulador de la señalización retrógrada plastídica para fotosíntesis, crecimiento y respuestas inmunes (Gawroński y col., 2014), y relacionada a una cascada de señalización debida a rigidización de membrana por bajas temperaturas (Furuya y col., 2014).

La figura 6.20 muestra los resultados de AgriGO y MapMan para los *35S::AtZAT12* y *35S::PpZAT12*\_PEDs reprimidos. Se pueden consultar en la **tabla suplementaria SXIII**.



**Figura 6.20 Gráficos de anotaciones comunes de MapMan y términos GO de AgriGO de PEDs reprimidos en *35S::AtZAT12* y *35S::PpZAT12*.** Se graficaron los números de PEDs según sus anotaciones de MapMan (arriba) o sus términos GO (abajo). Se consideraron las anotaciones comunes para los PEDs reprimidos en *35S::AtZAT12* y *35S::PpZAT12*, aunque información más detallada se puede consultar en la tabla suplementaria SXIII y se menciona en el texto. Adicionalmente, solo se graficaron aquellos términos GO estadísticamente enriquecidos en proporción respecto al genoma de *A. thaliana*.

Las anotaciones recopiladas en común para PEDs reducidos en los genotipos en estudio revelan nuevamente que la mayoría de los procesos biológicos enriquecidos son relativos a plástidos y que prima una caída importante en la generación de energía y precursores para el aumento de biomasa. Estos resultados concuerdan con ciertos rasgos fenotípicos de mutantes con deficiencia en BRs, fitohormonas promotoras del crecimiento, lo cual podría explicarse a través de la observada reducción transcripcional del gen *DWF1* (fig. 6.17; Schröder y col., 2014). En particular, van de la mano con la gran disminución en la fijación de CO<sub>2</sub>, avalada por la caída de PEDs componentes de ambos fotosistemas. PSAA (que compone el centro de reacción del PSI) se reprime en ambos genotipos con ganancia de función, aunque entre los *35S::PpZAT12*\_PEDs R hubo múltiples péptidos (23) relacionados con la estructura de fotosistemas y el ciclo de Calvin. Otro PED reducido fue VAR2/FTSH2, que junto a FTSH1 (mencionada antes), 5 y 8 forman complejos en la membrana tilacoide y se involucran en la reparación del PSII (Aluru y col., 2006).

Un proceso relacionado a la función fotosintética es la síntesis plastídica de tetrapirroles, representado por GUN4, únicamente afectado en *35S::AtZAT12*, y CHL12, en *35S::PpZAT12*. Ambas proteínas participan en el paso de protoporfirina IX a Mg-protoporfirina IX, con CHL12 como parte del complejo Mg quelatasa y GUN4 como regulador de su actividad. Sus reducciones a nivel peptídico van de la mano con la caída de PEDs vinculados con la fotosíntesis; sin embargo, dado que la acumulación de intermediarios tetrapirrólicos en mutantes *gun* (*genomes uncoupled*) inicia la señalización retrógrada que regula la transcripción nuclear de genes fotosintéticos, puede que este sea un mecanismo regulatorio operando en estos genotipos (Terry y Smith, 2013). Adicionalmente, el ARNm *AtZAT12* posee su expresión afectada en *gun1* y *abi4* (Koussevitzky y col., 2007), lo que podría indicar una compleja interacción entre este FT y proteínas GUN.

Por otro lado, mutantes deficientes en BRs poseen reducida acumulación de almidón, pudiendo ser causa del menor crecimiento (Schröder y col., 2014). Nuestros genotipos presentaron una consistente represión de PEDs relacionados con la degradación de este polímero: BAM5 ( $\beta$ -amilasa) y la glucano-fosforilasa PHS1 disminuyeron en ambos genotipos, mientras que SEX1 se vio notoriamente afectada en *35S::PpZAT12* (Streb y Zeeman, 2012). Schröder y col. (2014) reportaron que mutantes tanto en la síntesis como en la degradación de almidón (incluido *sex1*) son enanos debido a las menores tasas de crecimiento dadas por la rápida movilización (positiva o negativa) del polisacárido durante la noche; apoyando lo observado en nuestros datos proteómicos. Los PEDs que representan ambos procesos, fotosíntesis y degradación de almidón, demuestran que los efectos de *PpZAT12* fueron más intensos que aquellos debidos a *AtZAT12*.

Un dato interesante que suma a lo anterior es la represión de TRIP1 (TGF-beta receptor interacting protein 1), sustrato citosólico de la quinasa BRI1, implicado en la señalización de BRs (Bajwa y col., 2013). Esto refuerza las ideas anteriores aunque no fue identificado en *35S::PpZAT12*.

Mencionamos a la biosíntesis de aminoácidos como otro proceso anabólico reducido en los genotipos de ganancia de función, con PEDs en común como ASN2 y OASB, para asparagina y cisteína, respectivamente.

Respecto a la síntesis proteica, es interesante la identificación de más PEDs reprimidos y relacionados con la traducción en *35S::AtZAT12*, respecto a *35S::PpZAT12*, y más aún que la mayoría de ellos correspondan a proteínas ribosomales plastídicas. Nuevamente, se observa que los procesos afectados en estas plantas confluyen en esta organela.

Otros péptidos comúnmente reducidos y destacables son: proteínas de la pared celular (lo cual refleja el importante efecto sobre su metabolismo en relación a la expansión celular en estos genotipos), proteínas involucradas en la asimilación del azufre (SIR, sulfito reductasa, en *35S::AtZAT12* y 3 APSs, ATP sulfurilasas) y diferentes GSTs (glutatión S transferasas).

Adicionalmente, es de interés mencionar la reducción de las catalasas CAT1 y 2 sumada a la inducción de CAT3 (no mencionada) en plantas *35S::PpZAT12*, lo que se ha reportado en etapas de senescencia (Zimmermann y col., 2006), sugiriendo que ciertos mecanismos se han mantenido respecto a las plantas salvajes aunque el proceso se vea retrasado.

A partir de los gráficos de enriquecimiento, se observa que los efectos comunes discutidos fueron, en general, más pronunciados para la ganancia de función de *PpZAT12* que para su ortólogo *AtZAT12*. Esto mismo se evidencia en la tabla 6.6. Entre las anotaciones exclusivas de los *35S::PpZAT12*\_PEDs I, se hace evidente que la expresión heteróloga de este FT ha logrado modificar la expresión de más PEDs dentro de los procesos discutidos así como también otros, incluidos aquellos que involucran respuestas a múltiples estreses. Esto puede relacionarse a una insensibilidad del producto génico de *PpZAT12* a los mecanismos de regulación del FT endógeno *AtZAT12* en *A. thaliana* y/o a una mejor capacidad del mismo para llevar a cabo su rol de regulador transcripcional. Esto último avalado por el hecho de que muchos PEDs esperados en base a la información transcripcional para *AtZAT12* no se identificaron para el mismo y sí se vieron diferenciales en líneas *35S::PpZAT12*.

Además de generar nuevas hipótesis, futuras validaciones de los PEDs a nivel transcripcional y su organización en redes de regulación integrando lo obtenido con literatura adicional permitirán dilucidar cascadas moleculares sensibles a los FTs ZAT12 en estudio.

A modo de conclusión, la ganancia de función de los dos genes *ZAT12* produjo extensivos efectos a nivel peptídico respecto a los genotipos base que acompañan y justifican los drásticos fenotipos observados (como la caída en fotosíntesis), proponen complejas redes regulatorias corriente abajo a *AtZAT12* (que incluyen diferentes señalizaciones hormonales y retrógradas desde el cloroplasto, y metabolismo de ARN, de hormonas y de EROs) en hojas adultas de su sistema endógeno, así como también validan al menos en parte su funcionalidad propuesta, y sugieren roles para *PpZAT12* de duraznero en la respuesta a numerosos estímulos estresores.

#### **6.3.6.4. Delimitación del posible regulón de *PpZAT12*. Análisis de la información relativa a su expresión en frutos**

Muchos de los *35S::PpZAT12*\_PEDs identificados fueron comunes a aquellos encontrados en *35S::AtZAT12*, mientras que otros fueron específicos del genotipo construido para el FT de *P. persica*. Esta es la única evidencia de un grupo de genes regulados (directa o indirectamente) por el FT *PpZAT12*.

En base a esto y suponiendo la conservación de mecanismos moleculares de regulación que *PpZAT12* ejercería, procedimos a buscar posibles genes ortólogos en duraznero a los identificados en *A. thaliana* como *35S::PpZAT12*\_PEDs (sección 6.3.6.2) y como blancos afectados a nivel transcripcional (sección 6.3.6.1). La búsqueda se realizó como en otros casos, mediante la herramienta disponible en Biomart, Phytozome.

Luego, el contraste de los identificadores de duraznero encontrados, con aquellos recopilados en las bases de datos de Gismondi y col. (enviado), y con la base de determinantes construida en la presente tesis en respuesta al tratamiento térmico (capítulo 4), permitieron clasificarlos según su expresión en frutos, sumando evidencias adicionales que permitirán su evaluación futura en frutos en poscosecha.

La tabla 6.8 contiene la información recopilada y clasificada.

Como se puede ver, la mayoría de los PEDs poseen expresión en frutos, incluso en condiciones de tratamiento térmico. Hay que reconocer que los péptidos identificados poseen presencia mayoritaria en extractos solubles de hoja de *A. thaliana*, por lo que su presencia en frutos puede ser abundante también.

Tabla 6.8 Expresión en frutos de ortólogos de ARNms y PEDs afectados en *35S::PpZAT12*

Transcripto / Grupo de PEDs		Ortólogo(s) en <i>P. persica</i>	Maduración	Refrigeración	Tratamiento térmico
<i>pEARLI-like</i>	At4g12500.1				
<b>AZI3</b>	At4g12490.1	Prupe.5G073000 Prupe.5G073100 Prupe.5G073200 Prupe.5G073300 Prupe.5G073400 Prupe.5G073500	-	-	-
<i>pEARLI1</i>	At4g12480.1				
<i>AZI1</i>	At4g12470.1				
<b>SOC1</b>	At2g45660.1/2				
<b>DWF1</b>	At3g19820.1/2/3	Prupe.1G345300	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>
<b>NAP</b>	At1g69490.1	Prupe.1G277500	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>
<b>PAP1</b>	At1g56650.1	Prupe.6G176200	<b>Presente</b>	-	-
<i>PMEI</i>	At5g20740.1/2	Prupe.7G193700	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>
<b>35S::PpZAT12_PEDs</b>	I 243	248	<b>157</b>	<b>165</b>	<b>121</b>
	R 105	104	<b>78</b>	<b>81</b>	<b>63</b>

En negrita, ARNms o PEDs evaluados en la presente tesis. Se adicionaron genes *AZIs* que comparten contexto genómico con *AZI3*

Es interesante remarcar que dos *35S::PpZAT12\_PEDs* inducidos poseen ortólogos en duraznero que se identificaron como inducido (MDAR2, I7 de nuestra base; MonoDehidroAscorbato Reductasa 2) y reprimido (GRP7, Spot 86) frente a TT, la misma condición en la que fue detectado el ARNm *PpZAT12*. Por otro lado, los ortólogos en *P. persica* de dos *35S::PpZAT12\_PEDs* reprimidos, se identificaron como inducido por TT (HSP70, I39 de nuestra base) o reducido por el mismo tratamiento (ATP5CS, *PpP5CS2*;  $\Delta$ 1-Pirrolina-5-Carboxilato Sintasa 2). Esta información es de interés ya que los determinantes fueron identificados y evaluados en las mismas muestras en las que se detectó a *PpZAT12*.

La razón por la que no se han encontrado evidencias de expresión de las proteínas *AZIs* y *PpAZIs* en frutos podría ser su particular inducción en tejidos foliares. Búsquedas adicionales indicaron que proteínas similares en funcionalidad se han detectado y están incluidas en nuestras bases de determinantes de frutos (en maduración, refrigeración y tratamiento térmico), indicando que roles moleculares similares pueden ser de importancia en estos órganos y bajo estos

estímulos. Expandir las búsquedas a otros órganos de duraznero podría arrojar evidencias que sugieran la regulación de las PpAZIs identificadas como ortólogas por PpZAT12, con fines de respuesta inmune, por ejemplo. Otro detalle a considerar es que la asignación de ortólogos no es directa para familias con numerosos miembros y que poseen en el genoma evidentes y frecuentes duplicaciones génicas (al comparar clusters de genes de diferentes especies).

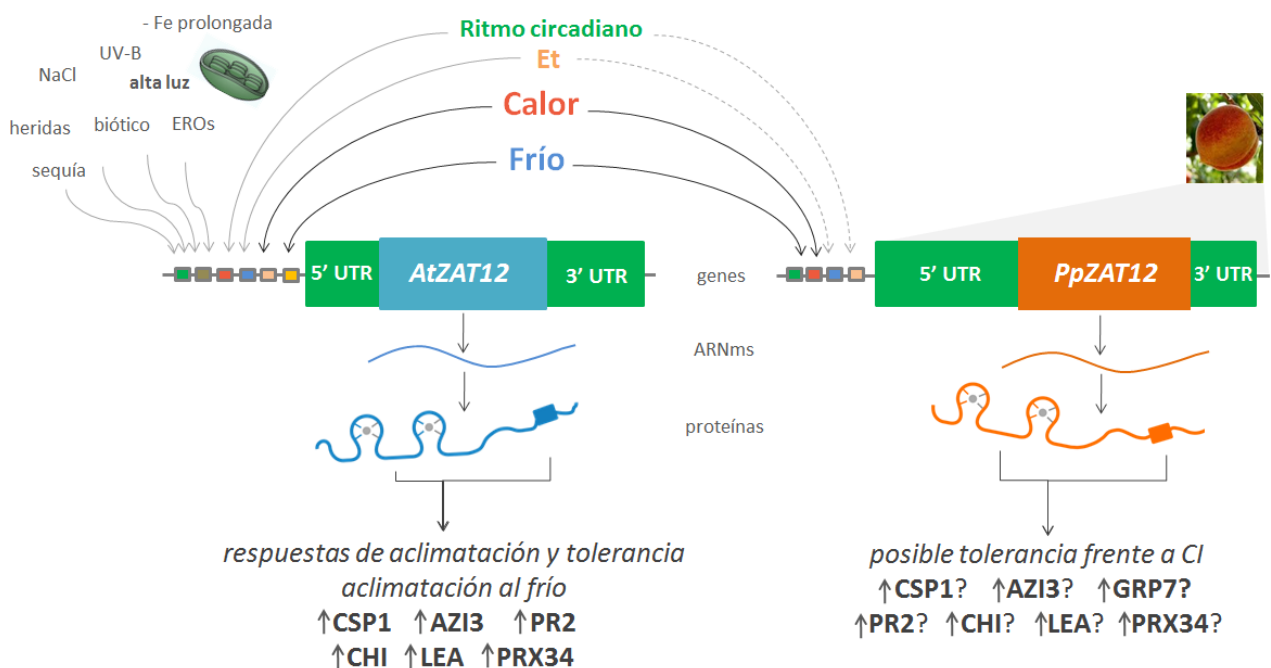
Es interesante destacar que *DWF1* posee su ortólogo con expresión en frutos, lo que sugiere su rol en frutos de durazno y una función para los BRs derivada. La aplicación exógena de BRs acelera la maduración de tomates, aumentando la producción de Et (aumenta los niveles de ARNm de ACSs y ACOs) y el contenido de licopenos así como también generando la degradación de clorofilas (Zhu y col., 2015). En frutillas, los niveles de BRs y la expresión de *FaBR11*, su receptor, son inducidos en estadíos tardíos del desarrollo, mientras que el silenciamiento del último (RNAi) afectó negativamente la coloración de las frutas, demostrando el rol de estas hormonas en la maduración (Chai y col., 2013). Sin embargo, la interacción con otras hormonas no se ha investigado en frutos al detalle (McAtee y col., 2013).

Por otro lado, el ortólogo del FT *NAP* también posee información de expresión en frutos en las condiciones poscosecha revisadas, lo que podría relacionarse con su rol positivo en la senescencia de silicuas en *A. thaliana* (Kou y col., 2012) y/o con su acción negativa en la tolerancia a la alta salinidad (Seok y col., 2017). En nuestros resultados, se vió inducido exclusivamente por *PpZAT12* en hojas adultas, lo que invita a analizarlo experimentalmente en duraznos junto a su posible relación a *PpZAT12*.

Mediciones adicionales, validaciones a nivel de ARNm en el sistema de *A. thaliana* y estudios de expresión en muestras de duraznos, así como también estudios en otros frutos, podrán dilucidar si la información recopilada refleja efectivamente una conservación en la regulación por parte de los FTs *ZAT12* y sus roles en la protección frente al daño por frío en duraznos.

## 6.4. Conclusiones

Los resultados obtenidos respecto a *PpZAT12* sugieren un rol para este gen y su producto génico en la protección frente al daño por frío en duraznos. Diversos enfoques permitieron dilucidar estas evidencias (fig 6.21): su **inducción transcripcional debida a tratamiento térmico** previo a la refrigeración y sus **niveles de ARNm aumentados luego de refrigeración prolongada en variedades con susceptibilidad disminuida a la harinosidad**. La ubicuidad del transcripto *PpZAT12* en hojas y flores de duraznero, adicionalmente sugieren roles para este factor de transcripción en otros procesos fisiológicos de importancia para duraznero como organismo.



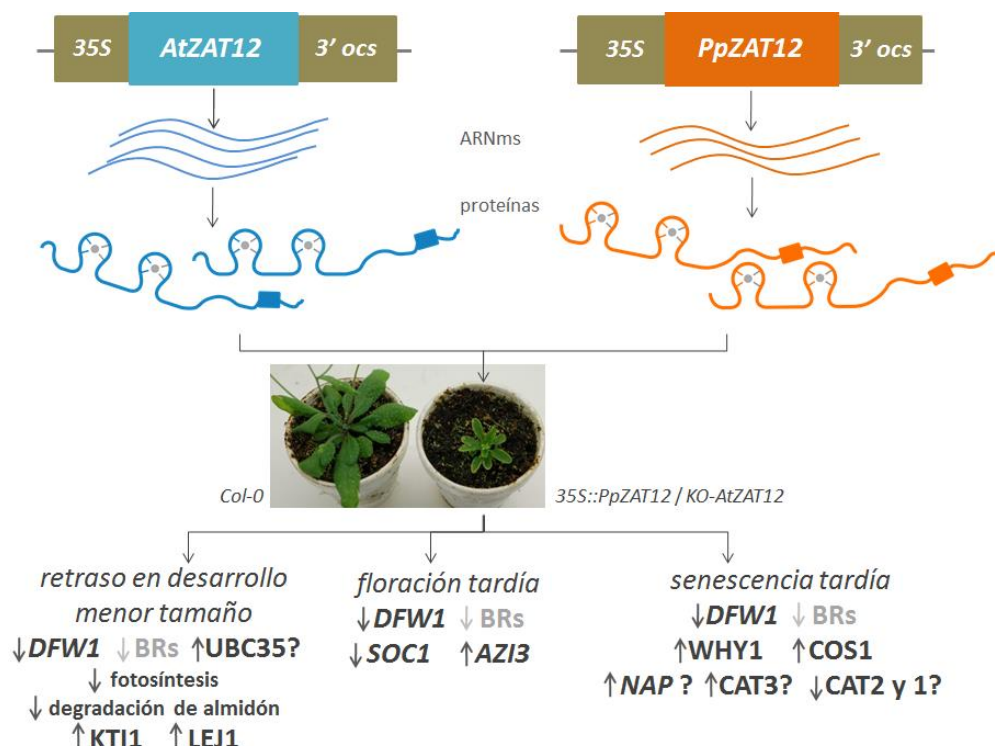
**Figura 6.21** Esquema propuesto acerca del funcionamiento de *AtZAT12* y *PpZAT12* en respuesta a la temperatura en los sistemas vegetales en estudio. Se pueden visualizar ciertos factores confirmados o putativos de participar en los aumentos de niveles transcripcionales de *AtZAT12* y *PpZAT12*. Se señalan características génicas, dominios peptídicos (ZFs y motivo EAR) y se representa cualitativamente la presencia y no arreglo de elementos *cis* en regiones regulatorias aunque no se descarta la presencia de otros motivos en otras regiones proximales o distales. Se señalan roles biológicos para los productos génicos y posibles blancos que contribuirían a los mismos. Flechas en líneas de puntos indican procesos propuestos; flechas continuas en negro, procesos probados en la presente tesis; flechas en gris, procesos confirmados en otros trabajos.

Por otra parte, el impedimento de obtener genotipos modificados por ganancia y/o pérdida de función de un gen particular en duraznero, dispararon estudios funcionales en la especie modelo *A. thaliana*. El ortólogo a *PpZAT12*, *AtZAT12*, presentó inducciones a nivel transcripcional por temperatura, lo que condice con múltiples reportes que lo describen como marcador de estrés sistémico frente a una amplia variedad de estímulos. Las importantes **similitudes en arquitectura génica, en las respuestas frente a temperatura y a nivel fenotípico de genotipos con ganancia de función de los genes *ZAT12* sugieren la conservación de los roles que**

estos ortólogos podrían desempeñar en sus particulares sistemas celulares, a través de la acción de su motivo represor EAR y/o interactuando con sitios específicos en el ADN.

La ganancia de función de genes *ZAT12* en *A. thaliana* produjo fenotipos drásticos respecto a *Col-0*, avalando que *PpZAT12* se vale de similares mecanismos moleculares para ejercer su rol *in vivo*. Un primer enfoque para su caracterización a nivel molecular detectó posibles causas de los rasgos observados y sugiere que complejas redes regulatorias se ubican corriente abajo a *ZAT12* para llevar a cabo respuestas a estrés y/o de desarrollo (fig. 6.22). Los putativos blancos poseen roles en el metabolismo de fitohormonas (BRs, CKs, Et, AUX, JA, SA), respuesta a estrés, procesamiento de ARN, señalizaciones retrógradas cloroplasto-núcleo, fotosíntesis y metabolismo del carbono. Los resultados contribuyen a reportes de *AtZAT12*, suman evidencias a su rol en hojas adultas y sugieren blancos similares para *PpZAT12* en *P. persica*.

Nuevos experimentos podrían confirmar el rol de *PpZAT12* como determinante positivo para gatillar respuestas de protección frente al daño por frío en duraznos. Asimismo, estos estudios invitan a realizar nuevas investigaciones sobre la conservación de la funcionalidad positiva de ortólogos *ZAT12* en contra de estímulos negativos en otros sistemas vegetales, redundando en mejoras en otros rasgos agronómicos de interés.



**Figura 6.22** Esquema propuesto acerca de las respuestas frente a la ganancia de función de *AtZAT12* y *PpZAT12* en *A. thaliana*. Se visualizan características de los constructos obtenidos y transformados para la obtención de plantas transgénicas con expresión constitutiva de los genes *ZAT12*. Adicionalmente, se pueden ver rasgos de los productos génicos de los genes en estudio (ZFs y motivo EAR). Se señalan blancos identificados a nivel transcripcional o peptídico que podrían intervenir con efectos sobre el desarrollo y respuestas a estrés. En gris se observan procesos propuestos en la presente tesis; en negro, procesos confirmados en la misma.



*Conclusiones generales*



## 7. Conclusiones generales

Los experimentos y resultados descritos en el presente trabajo resaltan la importancia de llevar a cabo estudios funcionales centrados en determinantes génicos provenientes de órganos vegetales de importancia, tomando como herramientas a las especies modelo aunque focalizando en aquellas de interés agronómico. Asimismo, se destaca el rol de herramientas bioinformáticas y bases de datos para recopilar información con el fin dilucidar rasgos de interés en los sistemas biológicos, la necesidad de adecuarlas a especies de interés agronómico y su importancia como puntapié inicial de nuevas hipótesis en biología molecular.

Diversos mecanismos moleculares se han descrito y actualmente múltiples tipos de moléculas adquirieron importancia en la protección de los duraznos frente al daño por frío. De manera similar, otros procesos involucrados en la llegada de los alimentos frescos al consumidor pueden comprometer su calidad y valor nutricional y por ello es de interés su estudio y la identificación de variedades con ventajas aprovechables.

En la presente tesis, se profundizó en la caracterización *in silico* y funcional de determinantes implicados en la protección frente a CI.

Las moléculas identificadas y analizadas en respuesta al tratamiento térmico fueron caracterizadas en cuanto a sus rasgos genómicos y anotaciones funcionales, agrupadas en base a su expresión génica en TT y en numerosos artículos de investigación en frutas, y su inicio transcripcional estudiado en detalle. El análisis permitió **identificar a ciertas familias de factores de transcripción cuyos miembros serían putativos actores** en los procesos en estudio, por lo que se vuelven blancos de futuros trabajos y partícipes de nuevas hipótesis para descifrar mecanismos **subyacentes a las respuestas a temperatura durante la poscosecha**.

Por otro lado, se han caracterizados funcionalmente dos reguladores de la expresión génica en diferentes niveles, señalando procesos moleculares que pueden ser de importancia en la determinación de la susceptibilidad y la tolerancia que los sistemas celulares de la fruta poseen en su manipulación poscosecha.

**PpZAT12, un factor de transcripción con de la familia C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>**, fue analizado en comparación a su ortólogo *AtZAT12*, marcador de estrés general y sistémico de *A. thaliana*. Hemos sumado evidencias en cuanto a la conservación de sus rasgos génicos, de su inducción transcripcional en

diferentes órganos y por similares tratamientos de bajas y altas temperaturas, así como también de putativos procesos biológicos blanco cuando se expresan constitutivamente en *A. thaliana*. Estos resultados, junto a la diferencia en la expresión de *PpZAT12* en variedades con susceptibilidad contrastante al CI, lo proponen como un factor transcripcional **con un rol en la protección frente al CI en duraznos y en la aclimatación a diferentes estímulos de estrés.**

La proteína con función desconocida, ***PpTRAF* y, adicionalmente, su ortólogo en la especie *A. thaliana*, *AtTRAF***, fueron estudiados y presentamos una primer recopilación de evidencias que apuntan a la dilucidación de su funcionalidad molecular y biológica. Los productos génicos de estos genes, los cuales se inducen en ambas especies frente a temperatura, poseen ZFs tipo TRAF (Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor) en tándem y su **funcionalidad como proteínas de unión a ARN y chaperonas de estos ácidos nucleicos, incluso en condiciones de bajas temperaturas**, ha sido **verificada *in vivo* en sistemas bacterianos**. Una mayoritaria localización nuclear (aunque mencionamos también cierta posible ubicación en citosol y RE) se ha evidenciado para los ortólogos. Más aún, la leve aunque reproducible acción de *AtTRAF* en la elongación de raíz primaria y en la germinación a bajas temperaturas, explorada mediante líneas con pérdida y ganancia de su función, permitió relacionarla con estos procesos. La integración de los resultados obtenidos sugiere que ***PpTRAF* en duraznos y *AtTRAF* en raíces, hojas y semillas en germinación, podrían desempeñar roles en el metabolismo del ARN frente a estímulos de temperatura que comprometan el normal desarrollo de estos órganos y la protección frente a CI** en las variedades en estudio. Más aún, destacamos a las mismas como poseedoras de una nueva arquitectura con rol ARN chaperona.

Finalmente, los resultados obtenidos en la presente tesis sugieren que procesos moleculares conservados pueden desarrollarse en respuesta a estímulos de temperatura en frutos de *P. persica* y diversos órganos de *A. thaliana*, permitiendo a las células aclimatarse y/o resistir en contra de desórdenes agronómicos indeseados como el daño por frío.

## *Referencias*

## 8. Referencias

- Abo-Ogiala, A., Carsjens, C., Diekmann, H., Fayyaz, P., Herrfurth, C., Feussner, I. y Polle, A. (2014) Temperature-induced lipocalin (TIL) is translocated under salt stress and protects chloroplasts from ion toxicity. *J. Plant Physiol.* 171 (3-4), 250-259.
- Agarwal, M., Hao, Y., Kapoor, A., Dong, C-H., Fujii, H., Zheng, X. y Zhu, J-K. (2006a) A R2R3 type Myb transcription factor is involved in the cold regulation of *cbf* genes and in acquired freezing tolerance. *J. Biol. Chem.* 281(49), 37636-37645.
- Agarwal, P. K., Agarwal, P., Reddy, M. K. y Sopory, S. K. (2006b) Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep.* 25(12), 1263-1274.
- Ahammed, G. J., Xia, X. J., Li, X., Shi, K., Yu, J. Q. y Zhou, Y. H. (2015) Role of brassinosteroid in plant adaptation to abiotic stresses and its interplay with other hormones. *Curr. Protein Pept. Sci.* 16(5), 462-473.
- Alaei, H., Baeyen, S., Maes, M., Höfte, M. y Heungens K. (2009) Molecular detection of *Puccinia horiana* in *Chrysanthemum x morifolium* through conventional and real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* 76(2), 136-145.
- Altube, H., Budde, C., Ontivero, M. y Rivata, R. (2001) Determinación de los índices de cosecha de duraznos cvs. Flordaking y San Pedro. *Agricultura Técnica*, 61(2), 140-150.
- Aluru, M. R., Yu, F., Fu, A., y Rodermel, S. (2006) *Arabidopsis* variegation mutants: new insights into chloroplast biogenesis. *J. Exp. Bot.* 57(9), 1871-1881.
- Amme, S., Matros, A., Schlesier, B. y Mock, H. P. (2006) Proteome analysis of cold stress response in *Arabidopsis thaliana* using DIGE-technology. *J. Exp. Bot.* 57(7), 1537-1546.
- An, C. y Mou, Z. (2011) Salicylic acid and its function in plant immunity. *J. Integr. Plant Biol.* 53(6), 412-428.
- Artlip, T.S., Wisniewski, M. E., Bassett, C. L. y Norelli, J. L. (2013) CBF gene expression in peach leaf and bark tissues is gated by a circadian clock. *Tree Physiol.* 33, 866-877.
- Arús, P., Verde, I., Sosinski, B., Zhebentyayeva, T. y Abbott, A. G. (2012). The peach genome. *Tree Genet. Genomes.* 8, 531-547.
- Baerenfaller, K., Hirsch-Hoffmann M., Svozil, J., Hull, R., Russenberger, D., Bischof, S., Lu, Q., Gruissem, W. y Baginsky, S. (2011) pep2pro: a new tool for comprehensive proteome data analysis to reveal information about organ-specific proteomes in *Arabidopsis thaliana*. *Integr. Biol (Camb).* 3(3), 225-237.

- Bajwa, V. S., Wang, X., Blackburn, R. K., Goshe, M. B., Mitra, S. K., Williams, E. L., Bishop, G. J., Krasnyanski, S., Allen, G., Huber, S. C. y Clouse, S. D. (2013) Identification and functional analysis of tomato BRI1 and BAK1 receptor kinase phosphorylation sites. *Plant Physiol.* 163(1), 30-42.
- Bassett, C. L., Wisniewski, M. E., Artlip, T. S., Richart, G., Norelli, J. L. y Farrell, R. E. Jr. (2009) Comparative expression and transcript initiation of three peach dehydrin genes. *Planta*, 230(1), 107-118.
- Bassett, C. L., Fisher, K. M. y Farrell, R. E. Jr. (2015) The complete peach dehydrin family: characterization of three recently recognized genes. *Tree Genet. Genomes*, 11, 126.
- Bassi D. y Monet R. (2008) Botany and Taxonomy. En: The peach: botany, production and uses. Editores: Layne DR. y Bassi D: CABI publishing, Oxfordshire, pp. 1-37.
- Ben Daniel, B. H., Cattan, E., Wachtel, C., Avrahami, D., Glick, Y., Malichy, A., Gerber, D. y Miller, G. (2016) Identification of novel transcriptional regulators of Zat12 using comprehensive yeast one-hybrid screens. *Physiol Plant.* 157(4), 422-441.
- Benedict, C., Geisler, M., Trygg, J., Huner, N. y Hurry, V. (2006) Consensus by democracy. Using meta-analyses of microarray and genomic data to model the cold acclimation signaling pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 141, 1219-1232.
- Bianchi, V., Rubio, M., Trainotti, L., Verde, I., Bonghi, C., Martínez-Gómez, P. (2015) *Prunus* transcription factors: breeding perspectives. *Plant Sci.* 6, 443.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T. G., Bertoni, M., Bordoli, L. y Schwede, T. (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucl. Acid Res.* 42(W1): 252-258.
- Bishop, G. A. (2004) The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B cell function. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 775-786.
- Boca, S., Koestler, F., Ksas, B., Chevalier, A., Leymarie, J., Fekete, A., Mueller, M. J. y Havaux, M. (2013) Arabidopsis lipocalins AtCHL and AtTIL have distinct but overlapping functions essential for lipid protection and seed longevity. *Plant Cell Environ.* 37, 2, 368-381.
- Bocca, S. N., Magioli, C., Mangeon, A., Junqueira, R. M., Cardeal, V., Margis, R. y Sachetto-Martins, G. (2005) Survey of glycine-rich proteins (GRPs) in the Eucalyptus expressed sequence tag database (ForEST). *Genet Mol Biol*, 28(3 SUPPL.), 608-624.
- Bogamuwa, S. P. y Jang, J. C. (2014) Tandem CCH zinc finger proteins in plant growth, development and stress response. *Plant Cell Physiol.* 55(8), 1367-1375.

Bolt, S., Zuther, E., Zintl, S., Hinch, D. K. y Schmölling, T. (2017) ERF105 is a transcription factor gene of *Arabidopsis thaliana* required for freezing tolerance and cold acclimation. *Plant, Cell Environ.* 40, 108-120.

Bonghi, C., Trainotti, L., Botton, A., Tadiello, A., Rasori, A., Ziliotto, F., Zaffalon, V., Casadoro, G. y Ramina, A. (2011) A microarray approach to identify genes involved in seed-pericarp cross-talk and development in peach. *BMC Plant Biol.* 11, 107.

Borsani, J., Budde, C. O., Porrini, L., Lauxmann, M. A., Lombardo, V. A., Murray, R. E., Andreo, C. S., Drincovich, M. F., y Lara, M. V. (2009). Carbon metabolism of peach fruit after harvest: identification of key enzymes involved in organic acid and sugar level modifications. *J. Exp. Bot.* 60, 1823-1837.

Böttcher, C., Burbidge, C. A., Boss, P. K. y Davies, C. (2015) Changes in transcription of cytokinin metabolism and signalling genes in grape (*Vitis vinifera* L.) berries are associated with the ripening-related increase in isopentenyladenine. *BMC Plant Biol.* 15,223.

Botton, A., Rasori, A., Ziliotto, F., Moing, A., Maucourt, M., Bernillon, S., Deborde, C, Petterle, A., Varotto, S. y Bonghi, C. (2016) The peach HECATE3-like gene FLESHY plays a double role during fruit development. *Plant Mol. Biol.* 91, 97-114.

Bourgeois, C. F., Mortreux, F. y Auboeuf, D. (2016) The multiple functions of RNA helicases as drivers and regulators of gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17(7), 426-438.

Boyce, J. M., Knight, H., Deyholos, M., Openshaw, M. R., Galbraith, D. W., Warren, G., Knight, M. R. (2003) The *sfr6* mutant of *Arabidopsis* is defective in transcriptional activation via CBF/DREB1 and DREB2 and shows sensitivity to osmotic stress. *Plant J.* 34(4), 395-406.

Boycheva, S., Daviet, L., Wolfender, J. L. y Fitzpatrick, T. B. (2014) The rise of operon-like gene clusters in plants. *Trends Plant Sci.* 19(7), 447-459.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Brandi, A., Spurio, R., Gualerzi, C.O. y Pon, C.L. (1996) Massive presence of the *Escherichia coli* 'major cold-shock protein' CspA under non-stress conditions. *EMBO J.* 18 (6), 1653-1659.

Brandi F., Bar E., Mourgues F., Horvath G., Turcsi E., Giuliano G., Liverani A., Tartarini S., Lewinsohn E. y Rosati C. (2011) Study of Redhaven peach and its white-fleshed mutant suggests a key role of CCD4 carotenoid dioxygenase in carotenoid and norisoprenoid volatile metabolism. *BMC Plant Biol.* 1, 124.

Brinker, M., Brosché, M., Vinocur, B., Abo-Ogiala, A., Fayyaz, P., Janz, D., Ottow, E. A.,

Cullmann, A. D., Saborowski, J., Kangasjärvi, J., Altman, A. y Polle, A. (2010) Linking the salt transcriptome with physiological responses of a salt-resistant *Populus* species as a strategy to identify genes important for stress acclimation. *Plant Physiol.* 154(4), 1697-1709.

Brkljacic, J. y Grotewold, E. (2017) Combinatorial control of plant gene expression. *Biochim. Biophys. Acta.* 1860(1), 31-40.

Brown, R., Wang, H., Dennis, M., Slovin, J. y Turechek, W. W. (2016) The effects of heat treatment on the gene expression of several heat shock protein genes in two cultivars of strawberry. *Int. J. Fruit Sci.* 16(1), 239-248.

Brummell, D. A. y Harpster, M. H. (2001) Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 47, 311-340.

Brummell, D. A., Dal Cin, V., Lurie, S., Crisosto, C.H. y Labavitch, J.M. (2004) Cell wall metabolism during the development of chilling injury in cold-stored peach fruit: association of mealiness with arrested disassembly of cell wall pectins. *J. Exp. Bot.* 155, 2041-2052.

Brummell, D. A. (2006). Cell wall disassembly in ripening fruit. *Funct. Plant Biol.* 33, 103-119.

Budde, C.O., Lucangeli, C.D., Polenta, G.V. y Murray, R.E. (2002) Golpe de altas temperaturas aplicado en poscosecha afectó la calidad de melocotón. *Información Técnica Económica Agraria*, 98, 95-107.

Budde, C. O., Polenta, G., Lucangeli, C. D. y Murray, R. E. (2006) Air and immersion heat treatments affect ethylene production and organoleptic quality of 'Dixiland' peaches. *Post. Biol. Technol.* 41, 32-37.

Budde, C.O. (2008) Efecto de diferentes condiciones de estrés poscosecha sobre el metabolismo de compuestos carbonados durante la maduración organoléptica de duraznos. Tesis doctoral. Director: Drincovich, M. F. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.

Bustamante, C. A., Budde, C. O., Borsani, J., Lombardo, V. A., Lauxmann, M. A., Andreo, C. S., Lara, M. V. y Drincovich, M. F. (2012) Heat treatment of peach fruit: modifications in the extracellular compartment and identification of novel extracellular proteins. *Plant Physiol. Biochem.* 60, 35-45.

Bustamante, C. A., Monti, L. L., Gabilondo, J., Scossa, F., Valentini, G., Budde, C. O., Lara, M.V., Fernie, A. R. y Drincovich, M.F. (2016) Differential metabolic rearrangements after cold storage are correlated with chilling injury resistance of peach fruits. *Front. Plant Sci.* 7, 1478.

Bustamante, C. A., Brotman, Y., Monti, L. L., Gabilondo, J., Budde, C. O., Lara, M.V., Fernie,



- A. R. y Drincovich, M.F. (2017) Differential lipidome remodelling during post harvest of peach varieties with different susceptibility to chilling injury. *Physiol. Plant.* 1399-3054.
- Byrne, D. H., Raseira, M. C. B., Bassi, D., Piagnani, M. C., Gasic, K., Reighard, G. L., Moreno, M. A., y Perez-Gonzalez, S., (2012) Peach. En: Badenes, M. L., Byrne, D. H. (Eds.). *Fruit Breeding*. 1ed. Springer, Boston, MA, pp. 505-569.
- Candat, A., Paszkiewicz, G., Neveu, M., Gautier, R., Logan, D. C., Avelange-Macherel, M. H., y Macherel, D. (2014) The ubiquitous distribution of late embryogenesis abundant proteins across cell compartments in Arabidopsis offers tailored protection against abiotic stress. *Plant Cell.* 26(7), 3148-3166.
- Casadevall, R., Rodriguez, R. E., Debernardi, J. M., Palatnik, J. F., y Casati, P. (2013) Repression of Growth Regulating Factors by the MicroRNA396 Inhibits Cell Proliferation by UV-B Radiation in Arabidopsis Leaves. *Plant Cell.* 25(9), 3570-3583.
- Cecchini, N. M., Steffes, K., Schläppi, M. R., Gifford, A. N. y Greenberg, J. T. (2015) Arabidopsis AZI1 family proteins mediate signal mobilization for systemic defence priming. *Nat. Commun.* 6, 7658.
- Chai, Y.-M., Zhang Q., Tian L., Li C. L., Xing Y., Qin L. y Shen, Y.-Y. (2013) Brassinosteroid is involved in strawberry fruit ripening. *Plant Growth Regul.* 69, 63-69.
- Charron, J. B., Ouellet, F., Pelletier, M., Danyluk, J., Chauve, C. y Sarhan, F. (2005) Identification, expression, and evolutionary analyses of plant lipocalins. *Plant Physiol.* 139, 2017-2028.
- Charron, J. B., Ouellet, F., Houde, M. y Sarhan, F. (2008) The plant Apolipoprotein D ortholog protects Arabidopsis against oxidative stress. *BMC Plant Biol.* 8, 86.
- Chen, H., Hwang, J. E., Lim, C. J., Kim, D. Y., Lee, S. Y. y Lim, C. O. (2010) Arabidopsis DREB2C functions as a transcriptional activator of HsfA3 during the heat stress response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 401(2), 238-244.
- Chen, M., Tan, Q., Sun, M., Li, D., Fu, X., Chen, X., Xiao, W., Li, L. y Gao, D. (2016) Genome-wide identification of WRKY family genes in peach and analysis of WRKY expression during bud dormancy. *Mol. Genet. Genomics.* 291(3), 1319-1332.
- Cheng, C., Yun, K.-Y., Ransom, H.W., Mohanty, B., Bajic, V.B., Jia, Y., Yun, S.J. y de los Reyes, B.G. (2007) An early response regulatory cluster induced by low temperature and hydrogen peroxide in seedlings of chilling-tolerant japonica rice. *BMC Genomics*, 8, 175.
- Cheng, M.-C., Liao, P.-M., Kuo, W.-W. y Lin, T.-P. (2013) The Arabidopsis ETHYLENE

RESPONSE FACTOR1 regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different cis-acting elements in response to different stress signals. *Plant Physiol.* 162, 1566-1582.

Chi, W.-T., Fung, R.W.M., Liu, H.-C., Hsu, C.-C. y Charng, Y.-Y. (2009) Temperature-induced lipocalin is required for basal and acquired thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.* 32, 917-927.

Chien, C.-H., Chow, C.-N., Wu, N.-Y., Chiang-Hsieh, Y.-F., Hou, P.-F. y Chang, W.-C. (2015). ExPath: a database of comparative expression analysis inferring metabolic pathways for plants. *BMC Genomics.* 16(Suppl 2), S6.

Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B.H., Hong, X., Agarwal, M. y Zhu, J. K. (2003) ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Genes Dev.* 17(8), 1043-1054.

Chinnusamy, V., Zhu, J. y Zhu, J-K. (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.* 12(10) 444-451.

Chou, K.-C. y Shen, H.-B. (2010) Plant-mPLOC: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization. *PLoS ONE*, 5: e11335.

Chow, C. N., Zheng, H. Q., Wu, N. Y., Chien, C. H., Huang, H. D., Lee, T. Y., Chiang-Hsieh, Y. F., Hou, P. F., Yang, T. Y. y Chang, W. C. (2016) PlantPAN 2.0: an update of plant promoter analysis navigator for reconstructing transcriptional regulatory networks in plants. *Nucl. Acid Res.* 44(D1), 1154-1160.

Ciftci-Yilmaz, S., Morsy, M. R., Song, L., Coutu, A., Krizek, B. A., Lewis, M. W., Warren, D., Cushman, J., Connolly, E. L. y Mittler, R. (2007) The EAR-motif of the Cys2/His2-type zinc finger protein Zat7 plays a key role in the defense response of Arabidopsis to salinity stress. *J. Biol. Chem.* 282(12), 9260-9268.

Cirilli, M., Flati, T., Gioiosa, S., Tagliaferri, I., Ciacciulli, A., Gao, Z., Gattolin, S., Geuna, F., Maggi, F., Bottoni, P., Rossini, L., Bassi, D., Castrignano, T. y Chillemi, G. (2017) PeachVar-DB: a curated collection of genetic variations for the interactive analysis of peach genome data. *Plant Cell Physiol.* pcx183.

Clough, S. J. y Bent, A. F. (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 16(6), 735-743.

Costa, A., Barbaro, M. R., Sicilia, F., Preger, V., Krieger-Liszkay, A., Sparla, F., De Lorenzo, G. y Trost, P. (2015) AIR12, a b-type cytochrome of the plasma membrane of Arabidopsis thaliana is a negative regulator of resistance against Botrytis cinerea. *Plant Sci.* 233:32-43.

- Cruz-Mendivil, A., López-Valenzuela, J.A., Calderón-Vázquez, C.L., Vega-García, M.O., Reyes-Moreno, C. y Valdez-Ortiz, A. (2015) Transcriptional changes associated with chilling tolerance and susceptibility in Micro-Tom tomato fruit using RNA-Seq. *Post. Biol. Tech.* 99, 141-151.
- Cunha L., Berlingieri M., Mattiuz B., Nogueira R. y Durigan J. (2007) Caracterização da curva de maturação de pêssegos "Aurora-1", na região de Jaboticabal-Sp. *Rev. Bras. Frutic.* 29(3), 661-665.
- Dardick, C. D., Callahan, A. M., Chiozzotto, R., Schaffer, R. J., Piagnani, M. C. y Scorza, R. (2010) Stone formation in peach fruit exhibits spatial coordination of the lignin and flavonoid pathways and similarity to Arabidopsis dehiscence. *BMC Biology*, 8, 13.
- Davik, J., Koehler, G., From, B., Torp, T., Rohloff, J., Eidem, P., Wilson, R. C., Sonsteby, A., Randall, S. K. y Alsheikh, M. (2013) Dehydrin, alcohol dehydrogenase, and central metabolite levels are associated with cold tolerance in diploid strawberry (*Fragaria* spp.). *Planta*. 237, 265-277.
- Davletova, S., Rizhsky, L., Liang, H., Shengqiang, Z., Oliver, D., Coutu, J., Shulaev, V., Schlauch, K. y Mittler, R. (2005a) Cytosolic Ascorbate Peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. *Plant Cell*. 17, 268-281.
- Davletova, S., Schlauch, K., Coutu, J. y Mittler, R. (2005b) The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139(2), 847-856.
- Dawson, D. M., Melton, L. D. y Watkins, C. B. (1992) Cell wall changes in nectarines (*Prunus persica*): Solubilization and depolymerization of pectic and neutral polymers during ripening and in mealy fruit. *Plant Physiol.* 100, 1203-1210.
- Desikan, R., A-H-Mackerness, S., Hancock, J.T. y Neill, S.J. (2001) Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* 127(1), 159-172.
- Doherty, C.J., Van Buskirk, H.A., Myers, S.J. y Thomashow, M.F. (2009) Roles for Arabidopsis CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. *Plant Cell*. 21, 972-984.
- Dong, C.-J. y Liu, J.-Y. (2010) The Arabidopsis EAR-motif-containing protein RAP2.1 functions as an active transcriptional repressor to keep stress responses under tight control. *BMC Plant Biol.* 10, 47.
- Edgar, R. C. (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*. 32, 1792-1797.

- Englbrecht, C. C., Schoof, H. y Böhm, S. (2004) Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the *Arabidopsis thaliana* genome. *BMC Genomics*. 5(1), 39.
- Eremina, M., Rozhonl, W. y Poppenberger, B. (2015) Hormonal control of cold stress responses in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 73(4), 797-810.
- Estavillo, G. M., Crisp, P. A., Pornsiriwong, W., Wirtz, M., Collinge, D., Carrie, C., Giraud, E., Whelan, J., David, P., Javot, H., Brearley, C., Hell, R., Marin, E. y Pogson, B. J. (2011) Evidence for a SAL1-PAP chloroplast retrograde pathway that functions in drought and high light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 23(11), 3992-4012.
- Fan, Z. Q., Kuang, J. F., Fu, C. C., Shan, W., Han, Y. C., Xiao, Y. Y., Ye, Y. J., Lu, W. J., Lakshmanan, P., Duan, X. W. y Chen, J. Y. (2016) The banana transcriptional repressor MaDEAR1 negatively regulates cell wall-modifying genes involved in fruit ripening. *Front Plant Sci.* 7, 1021.
- Faoro, C. y Ataide, S. F. (2014) Ribonomic approaches to study the RNA-binding proteome. *FEBS Lett.* 588(20), 3649-3664.
- Farinati, S., Rasori, A., Varotto, S. y Bonghi, C. (2017) Rosaceae fruit development, ripening and post-harvest: an epigenetic perspective. *Front. Plant Sci.* 8, 1247.
- Faust, M. y Timon, B. (1995) Origin and dissemination of peach. *Hortic. Rev. (Am. Soc. Hortic. Sci.)*. 17, 331-379.
- Feng, X-M., Zho, Q., Zhao, L-L., Qiao, Y., Xie, X-B., Li, H-F., Yao, Y-X., You, C-X. y Hao, Y-J. (2012) The cold-induced basic helix-loop-helix transcription factor gene MdbHLH1 encodes an ICE-like protein in apple. *BMC Plant Biol.* 12, 22.
- Fideghelli, C. (1987) El melocotonero. Mundi-Prensa. Madrid. España.
- Finn, R. D., Clements, J. y Eddy, S. R. (2011) HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucl Acid Res.* 39(Suppl 2), 29-37.
- Finn, R. D., Coghill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G.A., Tate, J. y Bateman, A. (2016) The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucl Acid Res.* 44(Database Issue), 279-285.
- Fowler, S., Cook, D. y Thomashow, M.F. (2005) Low temperature induction of *Arabidopsis* CBF1, 2, and 3 is gated by the circadian clock. *Plant Physiol* 137, 961-968.
- Fowler, S. y Thomashow, M. F. (2002) *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell*. 14(8), 1675-1690.

Foyer, C. H., Karpinska, B. y Krupinska, K. (2014) The functions of WHIRLY1 and REDOX-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1 in cross tolerance responses in plants: a hypothesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369(1640), 20130226.

Fruk, G., Cemelík, Z., Jemric, T., Hribar, J. y Vidrih, R. (2014) Pectin role in woolliness development in peaches and nectarines: A review. *Sci. Hortic.* 180, 1-5.

Furuya, T., Matsuoka, D. y Nanmori, T. (2014) Membrane rigidification functions upstream of the MEKK1-MKK2-MPK4 cascade during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 588(11), 2025-2030.

Gawroński, P., Witoń, D., Vashutina, K., Bederska, M., Betliński, B., Rusaczonek, A. y Karpiński, S. (2014) Mitogen-activated protein kinase 4 is a salicylic acid-independent regulator of growth but not of photosynthesis in *Arabidopsis*. *Mol. Plant.* 7(7), 1151-1166.

Genero, M., Gismondi, M., Monti, L., Gabilondo, J., Budde, C.O., Andreo, C.S., Lara, M.V., Drincovich, M.F. y Bustamante, C.A. (2015) Cell-wall related genes studies on peach cultivars with differential susceptibility to woolliness: looking for gene markers of tolerance. *Plant Cell Rep.* 35(6), 1235-1246.

Giovannoni, J. J. (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell.* 16, S170-S180.

Gismondi, M. (2013) Expresión de transcritos involucrados en la protección al daño por frío en variedades de durazno con distinta susceptibilidad. Tesina de licenciatura en Biotecnología. Director: Bustamante, C. A. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.

Gismondi, M., Daurelio, L. D., Monti, L. L., Lara, M. V., Drincovich, M.F. y Bustamante, C.A. In silico characterization of peach heat treatment-responsive gene promoters. *cisAnalyzer*: a novel tool for motif finding, enrichment, cooccurrence, and discovery. (manuscrito enviado).

Goldenberg, D., Azar, I. y Oppenheim, A.B. (1996) Differential mRNA stability of the *cspA* gene in the cold-shock response of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 19, 241-248.

Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N. y Rokhsar D.S. (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.* 40, D1178-1186.

Gong, Z., Dong, C., Lee, H., Zhu, J., Xiong, L. y Gong, D. (2005) A DEAD box RNA helicase is essential for mRNA export and important for development and stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 17(1), 1-12.

- González-Agüero, M., Pavez, L., Ibáñez, F., Pacheco, I. y Campos-Vargas, R. (2008) Identification of woolliness response genes in peach fruit after post-harvest treatments. *J. Exp. Bot.* 59, 1973-1986.
- Gotor, C., Laureano-Marín, A. M., Moreno, I., Aroca, Á., García, I. y Romero, L. C. (2015) Signaling in the plant cytosol: cysteine or sulfide? *Amino Acids.* 47(10), 2155-2164.
- Goulas, E., Schubert, M., Kieselbach, T., Kleczkowski, L. A., Gardeström, P., Schröder, W. y Hurry, V. (2006) The chloroplast lumen and stromal proteomes of *Arabidopsis thaliana* show differential sensitivity to short- and long-term exposure to low temperature. *Plant J.* 47(5), 720-734.
- Graether, S. P. y Boddington, K. F. (2014) Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. *Front Plant Sci.* 5,576.
- Guan, Q., Wu, J., Zhang, Y., Jiang, C., Liu, R., Chai, C. y Zhu, J. (2013). A DEAD box RNA helicase is critical for pre-mRNA splicing, cold-responsive gene regulation, and cold tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 25(1), 342-356.
- Gutierrez-Beltran, E., Moschou, P. N., Smertenko, A. P. y Bozhkov, P. V. (2015) Tudor staphylococcal nuclease links formation of stress granules and processing bodies with mRNA catabolism in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 27(3), 926-943.
- Ha, S., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. y Tran, L. S. (2012) Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends Plant Sci.* 17(3), 172-179.
- Haake, V., Cook, D., Riechmann, L., Pineda, O., Thomashow, M.F. y Zhang, J. Z. (2002) Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 130, 639-648.
- Hahn, A., Kilian, J., Mohrholz, A., Ladwig, F., Peschke, F., Dautel, R., Harter, K., Berendzen, K.W. y Wanke, D. (2013) Plant Core Environmental Stress Response genes are systemically coordinated during abiotic stresses. *Int. J. Mol. Sci.* 14(4), 7617-7641.
- Hannah, A. Heyer, G., e Hinch, D.K. (2005) A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 1(2): e26.
- Hao, Y., Hu, G., Breitel, D., Liu, M., Mila, I., Frasse, P., Fu, Y., Aharoni, A., Bouzayen, M. y Zouine, M. (2015) Auxin Response Factor SIARF2 is an essential component of the regulatory mechanism controlling fruit ripening in tomato. *PLoS Genet.* 11(12), e1005649.
- Hernández-Gras, F. y Boronat, A. (2015) A hydrophobic proline-rich motif is involved in the

intracellular targeting of temperature-induced lipocalin. *Plant Mol. Biol.* 88, 301-311.

Hichri, I., Muhovski, Y., Zizkova, E., Dobrev, P. I., Franco-Zorrilla, J. M., Solano, R., Lopez-Vidriero, I., Motyka, V. y Lutts, S. (2014) The *Solanum lycopersicum* Zinc Finger2 cysteine-2/histidine-2 repressor-like transcription factor regulates development and tolerance to salinity in tomato and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 164(4), 1967-1990.

Hiratsu, K., Ohta, M., Matsui, K. y Ohme-Takagi, M. (2002) The SUPERMAN protein is an active repressor whose carboxy-terminal repression domain is required for the development of normal flowers. *FEBS Letters.* 514, 351-354.

Horn, R., Lecouls, A. C., Callahan, A., Dandekar, A., Garay, L. y McCord, P. (2005) Candidate gene database and transcript map for peach, a model species for fruit trees. *Theoretical. Appl. Genet.* 110, 1419-1428.

Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C.J. y Nakai, K. (2007) WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* 35, 585-587.

Huang, S., Chen, X., Zhong, X., Li, M., Ao, K., Huang, J. y Li, X. (2016) Plant TRAF proteins regulate NLR immune receptor turnover. *Cell Host Microbe.* 19(2), 204-215.

Iida, A., Kzuoka, T., Torikai, S., Kikuchi, H. y Oeda, K. (2000) A zinc finger protein RHL41 mediates the light acclimatization response in *Arabidopsis*. *Plant J.* 24(2), 191-203.

Iezzoni, A., Weebadde, C. y Luby, J. (2010) RosBREED: enabling marker-assisted breeding in Rosaceae. *Acta Hort.* 859, 389-394.

Immink, R. G., Posé, D., Ferrario, S., Ott, F., Kaufmann, K., Valentim, F. L., de Folter, S., van der Wal, F., van Dijk, A. D., Schmid, M. y Angenent, G. C. (2012) Characterization of SOC1's central role in flowering by the identification of its upstream and downstream regulators. *Plant Physiol.* 160(1), 433-449.

Inoue, J., Ishida, T., Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Naito, A., Azuma, S. y Yamamoto, T. (2000). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp. Cell Res.* 254, 14-24.

Isemer, R., Mulisch, M., Schäfer, A., Kirchner, S., Koop, H. U., y Krupinska, K. (2012) Recombinant Whirly1 translocates from transplastomic chloroplasts to the nucleus. *FEBS Lett.* 586(1), 85-88.

Irshad, M., Canut, H., Borderies, G., Pont-Lezica, R. y Jamet, E. (2008) A new picture of cell wall protein dynamics in elongating cells of *Arabidopsis thaliana*: confirmed actors and newcomers. *BMC Plant Biol.* 8, 94.

- Jeon, J., Kim, N. Y., Kim, S., Kang, N. Y., Novák, O., Ku, S. J., Cho, C., Lee, D. J., Lee, E. J., Strnad M., Kim, J. (2010) A subset of cytokinin two-component signaling system plays a role in cold temperature stress response in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 285(30), 23371-23386.
- Jeon, J. y Kim, J. (2013) *Arabidopsis* Response Regulator1 and *Arabidopsis* Histidine Phosphotransfer Protein2 (AHP2), AHP3, and AHP5 function in cold signaling. *Plant Physiol.* 161, 408-424.
- Jin, J. P., Tian, F., Yang, D. C., Meng, Y. Q., Kong, L., Luo, J. C. y Gao, G. (2017). PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acid Res.* 45(D1), D1040-D1045.
- Jones, A. M., MacLean, D., Studholme, D. J., Serna-Sanz, A., Andreasson, E., Rathjen, J. P. y Peck, S. C. (2009) Phosphoproteomic analysis of nuclei-enriched fractions from *Arabidopsis thaliana*. *J. Proteomics.* 72(3), 439-451.
- Jones, D. T., Taylor, W. R. y Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences.* 8, 275-282.
- Jung, H., Crisp, P. A., Estavillo, G. M., Cole, B., Hong, F., Mockler, T. C., Pogson, B. J. y Chory, J. (2013a) Subset of heat-shock transcription factors required for the early response of *Arabidopsis* to excess light. *PNAS.* 110(35), 14474-14479.
- Jung, H. J., Jung Park, S. y Kang, H. (2013b) Regulation of RNA metabolism in plant development and stress responses. *J. Plant Biol.* 56, 123-129.
- Jung, S., Ficklin, S.P., Lee, T., Cheng, C.-H., Blenda, A., Zheng, P., Yu, J., Bombarely, A., Cho, I., Ru, S., Evans, K., Peace, C., Abbott, A.G., Mueller, L.A., Olmstead, M.A. y Main, D. (2014) The Genome Database for Rosaceae (GDR): year 10 update. *Nucleic Acids Res.* 42(Database), 1237-1244.
- Juntawong, P., Sorenson, R. y Bailey-Serres, J. (2013) Cold shock protein 1 chaperones mRNAs during translation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 74(6), 1016-1028.
- Kader, A. A. y Chordas, A. (1984) Evaluating the browning potential of peaches. *California Agric.* 38, 14-15.
- Kader A. A. y Mitchell C. (1989). Maturity and Quality. En: Peaches, plums and nectrines—Growing and handling for fresh market. JH LaRue y RS Johnson (Eds). Publ 3331. Univ. of California. pp. 191-196.
- Kader, A. A. (2002) Opportunities in using biotechnology to maintain postharvest quality and safety of fresh produce. *Hort. Sci.* 37, 467-468.



Kagale, S., Links, M. G. y Rozwadowski, K. (2010) Genome-wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 152(3), 1109-1134.

Kagale, S. y Rozwadowski, K. (2010) Small yet effective. The Ethylene-responsive element binding factor-associated Amphiphilic Repression (EAR) motif. *Plant Sign. Behav.* 5(6), 691-694.

Kagale, S. y Rozwadowski, K. (2011) EAR motif-mediated transcriptional repression in plants. An underlying mechanism for epigenetic regulation of gene expression. *Epigenetics.* 6(2), 141-146.

Kang, H., Park, S. J., Kwak, K. J. (2013) Plant RNA chaperones in stress response. *Trends Plant Sci.* 18(2), 100-106.

Kant, P., Kant, S., Gordon, M., Shaked, R., & Barak, S. (2007) STRESS RESPONSE SUPPRESSOR1 and STRESS RESPONSE SUPPRESSOR2, Two DEAD-box RNA helicases that attenuate *Arabidopsis* responses to multiple abiotic stresses. *Plant Physiol.* 145(3), 814-830.

Karlova, R., Chapman, N., David, K., Angenent, G. C., Seymour, G. B. y de Maagd, R. A. (2014) Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening. *J. Exp. Bot.* 65(16), 4527-4541.

Kawamura, Y. y Uemura, M. (2003) Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of *Arabidopsis* leaves associated with cold acclimation. *Plant J.* 36(2), 141-154.

Kazan, K. y Manners, J. M. (2013) MYC2: the master in action. *Mol. Plant.* 6(3), 686-703.

Kidokoro, S., Watanabe, K., Ohori, T., Moriwaki, T., Maruyama, K., Mizoi, J., Myint Phyu Sin Htwe, N., Fujita, Y., Sekita, S., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki K. (2015) Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression. *Plant J.* 81(3), 505-518.

Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., D'Angelo, C., Bornberg-Bauer, E., Kudla, J. y Harter, K. (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.* 50(2), 347-363.

Kim, J. (2016) CYTOKININ RESPONSE FACTORS gating environmental signals and hormones. *Trends Plant Sci.* 21(12), 993-996.

Kim, J. S., Park, S. J., Kwak, K. J., Kim, Y. O., Kim, J. Y., Song, J., Jang, B., Jung, C.-H. y Kang, H. (2007a) Cold shock domain proteins and glycine-rich RNA-binding proteins from *Arabidopsis*

*thaliana* can promote the cold adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 35(2), 506–516.

Kim, J. Y., Park, S. J., Jang, B., Jung, C., Ahn, S. J., Goh, C., Cho K, Han O y Han, O. (2007b). Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *The Plant J.* 50(11), 439-451.

Kim, K. C., Lai, Z., Fan, B. y Chen, Z. (2008) *Arabidopsis* WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense. *Plant Cell.* 20(9), 2357-2371.

Kim, Y. O., Kim, J. S. y Kang, H. (2005). Cold-inducible zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 42(6), 890-900.

Kim, Y. S., Lee, M., Lee, J. H., Lee, H. J. y Park, C. M. (2015) The unified ICE-CBF pathway provides a transcriptional feedback control of freezing tolerance during cold acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 89(1-2), 187-201.

Kizis, D. y Pages, M. (2002) Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. *Plant J.*, 30, 679-689.

Kou, X., Watkins, C. B. y Gan, S. S. (2012) *Arabidopsis* AtNAP regulates fruit senescence. *J. Exp. Bot.* 63(17), 6139-6147.

Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T. C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R. y Chory, J. (2007) Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science.* 316(5825), 715-719.

Kreps, J.A, Wu, Y., Chang, H-S., Zhu, T., Wang, X. y Harper, J.F. (2002) Transcriptome Changes for *Arabidopsis* in Response to Salt, Osmotic, and Cold Stress. *Plant Physiol.* 130, 2129-2141.

Kubo, K., Sakamoto, A., Kobayashi, A., Rybka, Z., Kanno, Y., Nakagawa, H., Takatsuji, H. (1998) Cys2/His2 zinc-finger protein family of petunia: evolution and general mechanism of target-sequence recognition. *Nucleic Acids Res.* 26(2), 608-615.

Kumar, M. N., Hsieh, Y. F. y Verslues, P. E. (2015) At14a-Like1 participates in membrane-associated mechanisms promoting growth during drought in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112(33), 10545-10550.

Kwak, K. J., Park, S. J., Han, J. H., Kim, M. K., Oh, S. H., Han Y. S. y Kang, H. (2011) Structural determinants crucial to the RNA chaperone activity of glycine-rich RNA-binding proteins 4 and 7 in

*Arabidopsis thaliana* during the cold adaptation process. *J. Exp. Bot.* 62(11), 4003-4011.

Kwak, K. J., Yeon, O. K. y Kang, H. (2005). Characterization of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration, or cold stress. *J. Exp. Bot.* 56(421), 3007-3016.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Laity, J.H., Lee, B.M., y Wright, P.E. (2001) Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11(1), 39-46.

Lamesch, P., Berardini, T.Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., Muller, R., Dreher, K., Alexander, D.L., Garcia-Hernandez, M., Karthikeyan, A.S., Lee, C.H., Nelson, W.D., Ploetz, L., Singh, S., Wensel, A. y Huala, E. (2011) The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Res.* 40, D1202–D1210.

Landick, R, Stewart, J., y Lee, D.N. (1990) Amino acid changes in conserved regions of the beta-subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase alter transcription pausing and termination. *Genes Dev.* 4, 1623-1636.

Lara, M. V., Borsani, J., Budde, C. O., Lauxmann, M. A., Lombardo, V. A., Murray, R. E., Andreo, C. S. y Drincovich, M. F. (2009) Biochemical and proteomic analysis of “Dixiland” peach fruit (*Prunus persica*) upon heat treatment. *J. Exp. Bot.* 60, 4315-4333.

Lara, M. V., Budde, C. O., Porrini, L., Borsani, J., Murray, R. E., Andreo, C. S. y Drincovich, M. F. (2011) Peach (*Prunus persica*) fruit response to anoxia: reversible ripening delay and biochemical changes. *Plant Cell Physiol.* 52, 392-403.

Laurens, F., Aranzana, M. J. y Arús, P. (2012) Review of fruit genetics and breeding programmes and a new European initiative to increase fruit breeding efficiency. *Acta Hort.* 92, 95-102.

Lauxmann, M.A., Brun, B., Borsani, J., Bustamante, C. A., Budde, C. O., Lara M.V. y Drincovich, M.F. (2012) Transcriptomic profiling during the post-harvest of heat-treated Dixiland *Prunus persica* fruits: common and distinct response to heat and cold. *PLoS ONE.* 7(12), e51052.

Lauxmann, M.A., Borsani, J., Osorio, S., Lombardo, V. A., Budde, C. O., Bustamante, C. A., Monti, L. L., Andreo, C. S., Fernie, A. R., Drincovich, M. F. y Lara M. V. (2014) Deciphering the metabolic pathways influencing heat and cold responses during post-harvest physiology of peach fruit. *Plant Cell Environ.* 37(3), 601-616.

Le, C. T. T., Brumbarova, T., Ivanov, R., Stoof, C., Weber, E., Mohrbacher, J., Fink-Straube,

C., y Bauer, P. (2016) ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA12 (ZAT12) Interacts with FER-LIKE IRON DEFICIENCY-INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR (FIT) linking iron deficiency and oxidative stress responses. *Plant Physiol.* 170(1), 540-557.

Lee, B-H., Lee, H., Xiong, L. y Zhu, J-K. (2002) A mitochondrial complex I defect impairs cold-regulated nuclear gene expression. *Plant Cell.* 14, 1235-1251.

Lee, J. y Lee, I. (2010) Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. *J. Exp. Bot.* 61(9), 2247-2254.

Lewallen, K., S. y Marini, R. P. (2003) Relationship between flesh firmness and ground color in peach as influenced by light and canopy position. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128(2), 163-170.

Lewis, D. R., Ramirez, M. V., Miller, N. D., Vallabhaneni, P., Ray, W. K., Helm, R. F., Winkel, B. S. y Muday, G. K. (2011) Auxin and ethylene induce flavonol accumulation through distinct transcriptional networks. *Plant Physiol.* 156(1), 144-164.

Li, B., Takahashi, D., Kawamura, Y. y Uemura, M. (2012) Comparison of plasma membrane proteomic changes of Arabidopsis suspension-cultured cells (T87 Line) after cold and ABA treatment in association with freezing tolerance development. *Plant Cell Physiol.* 53(3), 543-554.

Li, T., Xu, S. L., Oses-Prieto, J. A., Putil, S., Xu, P., Wang, R. J., Li, K. H., Maltby, D. A., An, L. H., Burlingame, A. L., Deng, Z. P. y Wang, Z. Y. (2011) Proteomics analysis reveals post-translational mechanisms for cold-induced metabolic changes in Arabidopsis. *Mol. Plant.* 4(2), 361-374.

Li, X., Chen, L., Forde, B. G. y Davies, W. J. (2017) The biphasic root growth response to abscisic acid in Arabidopsis involves interaction with ethylene and auxin signalling pathways. *Front. Plant Sci.* 8, 1493.

Li, X., Li, X., Li, M., Yan, Y., Liu, X. y Li L. (2016) Dual Function of NAC072 in ABF3-Mediated ABA-Responsive Gene Regulation in Arabidopsis. *Front Plant Sci.* 7, 1075.

Li, X., Xu, C., Korban, S.S. y Chen, K. (2010) Regulatory mechanisms of textural changes in ripening fruits. *Crit. Rev. Plant Sci.* 29(4), 222-243.

Liang, L., Zhang, B., Yin, X.-R., Xu, C.-X, Sun, C.-D. y Chen, K.-S. (2013) Differential expression of the CBF gene family during postharvest cold storage and subsequent shelf-life of peach fruit. *Plant Mol. Biol. Rep.* 31(6), pp. 1358-1367.

Libault, M., Wan, J., Czechowski, T., Udvardi, M. y Stacey, G. (2007) Identification of 118 Arabidopsis transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20(8), 900-11.

Lim, C. J., Yang, K. A., Hong, J. K., Choi, J. S., Yun, D. J., Hong, J. C., Chung, W. S., Lee, S. Y.,

- Cho, M. J. y Lim, C. O. (2006) Gene expression profiles during heat acclimation in *Arabidopsis thaliana* suspension-culture cells. *J. Plant Res.* 119(4), 373-383.
- Lin, M. y Olivier, D. J. (2008) The role of acetyl-Coenzyme A synthetase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 147, 1822-1829.
- Lin, Q., Jiang, Q., Lin, J., Wang, D., Li, S., Liu, C., Sun, C. y Chen, K. (2015) Heat shock transcription factors expression during fruit development and under hot air stress in Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan) fruit. *Gene.* 559(2), 129-136.
- Lin, Y., Lin, H., Lin, Y., Zhang, S., Chen, Y. y Jiang, X. (2016) The roles of metabolism of membrane lipids and phenolics in hydrogen peroxide-induced pericarp browning of harvested longan fruit. *Post. Biol. Tech.* 111, 53-61.
- Lindlof, A., Bräutigam, M., Chawade, A., Olsson, O. y Olsson, B. (2009) In silico analysis of promoter regions from cold-induced genes in rice (*Oryza sativa* L.) and *Arabidopsis thaliana* reveals the importance of combinatorial control. *Bioinformatics.* 25(11), 1345-1348.
- Liu, N., Zhong, N.-Q., Wang, G.-L., Li, L.-J., Liu, X.-L., He, Y.-K. y Xia, G.-X. (2007) Cloning and functional characterization of PpDBF1 gene encoding a DRE-binding transcription factor from *Physcomitrella patens*. *Planta.* 226, 827-838.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods,* 25, 402-408.
- Lombardo, V. A., Osorio, S., Borsani, J., Lauxmann, M. A., Bustamante, C. A., Budde, C. O., Andreo, C. S., Lara, M. V., Fernie, A. R. y Drincovich, M. F. (2011) Metabolic profiling during peach fruit development and ripening reveals the metabolic networks that underpin each developmental stage. *Plant Physiol.* 157(4), 1696-1710.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sanchez-Serrano, J.J. y Solano, R. (2004) JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell,* 16, 1938-1950.
- Lurie, S. (1998) Postharvest heat treatments. *Post. Biol. Technol.* 14, 257-269.
- Lurie, S. y Crisosto, C.H. (2005) Chilling injury in peach and nectarine. *Postharvest Biol Technol* 37, 195-208.
- Ma, Q., Suo, J., Huber, D. J., Dong, X., Han, Y., Zhang, Z. y Rao, J. (2014) Effect of hot water treatments on chilling injury and expression of a new C-repeat binding factor (CBF) in 'Hongyang' kiwifruit during low temperature storage. *Post. Biol. Technol.* 97, 102-110.
- Macheix, J. J., Sapis, J. C., Fleuriet, A. (1991) Phenolic compounds and polyphenoloxidase in

relation to browning in grapes and wines. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 30, 441-486.

Machuca, A., Matamoros, M., Jorquera, C., Obando, J., Luchsinger, L., Gil, M. y Escalona, V. (2010) Efecto de atmósfera modificada en durazno variedad Royal Glory mínimamente procesado en fresco. Centro de Estudios Postcosecha (CEPOC), Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile VI Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones.

Malka S. K. y Cheng, Y. (2017) Possible interactions between the biosynthetic pathways of indole glucosinolate and auxin. *Front. Plant Sci.* 8, 2131.

Mammarella, N. D., Cheng, Z., Fu, Z. Q., Daudi, A., Bolwell, G. P., Dong, X. y Ausubel, F. M. (2015) Apoplastic peroxidases are required for salicylic acid-mediated defense against *Pseudomonas syringae*. *Phytochem.* 112, 110-121.

Mangeon, A., Junqueira, R. M. y Sachetto-Martins, G. (2010) Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Signal. Behav.* 5(2), 99-104.

Maruyama, K., Todaka, D., Mizoi, J., Yoshida, T., Kidokoro, S., Matsukura, S., Takasaki, H., Sakurai, T., Yamamoto, Y.Y., Yoshiwara, K., Kojima, M., Sakakibara, H., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012) Identification of cis-acting promoter elements in cold- and dehydration-induced transcriptional pathways in *Arabidopsis*, rice, and soybean. *DNA Res.* 19, 37-39.

Matsuo, S., Kikuchi, K., Fukuda, M., Honda, I. y Imanishi, S. (2012) Roles and regulation of cytokinins in tomato fruit development. *J. Exp. Bot.* 63(15), 5569-5579.

Maulén A., Obando-Ulloa J., Barraza G., Machuca A., Peña-Neira A., Luchsinger L., Escalona V. (2012). Establecimiento de la composición de la atmósfera más adecuada para comercializar duraznos Royal Glory mínimamente procesados en Cascos. *Rev. Iberoamer. Tecnol. Postcosecha.* 13(2), 181-186.

Mazur, W. M., Uehara, M., Wahala, K., Adlercreutz, H. (2000) Phyto-oestrogen content of berries, and plasma concentrations and urinary excretion of enterolactone after a single strawberry-meal in human subjects. *Brit. J. Nutr.* 83, 381-387.

McAtee, P., Karim, S., Schaffer, R. y David, K. (2013) A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation, and ripening. *Front. Plant Sci.* 4, 79.

Meisel, L., Fonseca, B., González, S., Baezayates, R., Cambiazo, V., Campos, R., González, M., Orellana, A., Retamales, J. y Silva, H. (2005) A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomic analyses. *Biol. Res.* 38, 83-88.

Meissner, R. y Michael, A.J. (1997) Isolation and characterisation of a diverse family of

Arabidopsis two and three-fingered C2H2 zinc finger protein genes and cDNAs. *Plant Mol. Biol.* 33 (4), 615-624.

Miao, Y., Jiang, J., Ren, Y. y Zhao, Z. (2013) The single-stranded DNA-binding protein WHIRLY1 represses WRKY53 expression and delays leaf senescence in a developmental stage-dependent manner in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 163(2), 746-756.

Minami, A., Fujiwara, M., Furuto, A., Fukao, Y., Yamashita, T., Kamo, M., Kawamura, Y. y Uemura, M. (2009) Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in Arabidopsis thaliana during cold acclimation. *Plant Cell Physiol.* 50(2), 341-359.

Mitchell, A., Chang, H-Y., Daugherty, L., Fraser, M., Hunter, S., Lopez, R., McAnulla, C., McMenemy, C., Nuka, G., Pesseat, S., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Rato, C., Yong, S-Y., Bateman, A., Punta, M., Attwood, T.K., Sigrist, C.J.A., Redaschi, N., Rivoire, C., Xenarios, I., Kahn, D., Guyot, D., Bork, P., Letunic, I., Gough, J., Oates, M., Haft, D., Huang, H., Natale, D.A., Wu, C.H., Orengo, C., Sillitoe, I., Mi, H., Thomas, P.D. y Finn, R.D. (2015) The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Res.* 43, D213-D221.

Mizoi, J., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim. Biophys. Acta.* 1819(2), 86-96.

Moellering, E. R., Muthan, B. y Benning, C. (2010) Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. *Science.* 330(6001), 226-228.

Monselise, S. P. (1986). Closing remarks. En: Handbook of fruit set and development. Monselise, S. P. (Editor). CRC Press. Boca Ratón, Florida, Estados Unidos, pp. 303-321.

Monti, L. L. (2016) Diversidad metabólica y susceptibilidad frente al daño por frío de variedades de durazno cultivados en Argentina. Tesis doctoral. Director: Drincovich, M.F, co-director: Lara, M. V. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.

Monti, L. L., Bustamante, C. A., Osorio, S., Gabilondo, J., Borsani, J., Lauxmann, M. A., Maulión, E., Valentini, G., Budde, C. O., Fernie, A. R., Lara, M. V. y Drincovich, M. F. (2016) Metabolic profiling of a range of peach fruit varieties reveals high metabolic diversity and commonalities and differences during ripening. *Food Chem.* 190, 879-888.

Müller, G. L., Triassi, A., Alvarez, C. E., Falcone-Ferreyra, M. L., Andreo, C. S., Lara, M. V. y Drincovich, M. F. (2017) Circadian oscillation and development-dependent expression of glycine-rich RNA binding proteins in tomato fruits. *Funct. Plant Biol.* 41(4) 411-423.

Nagel, D. H., Doherty, C. J., Pruneda-Paz, J. L., Schmitz, R. J., Ecker, J. R. y Kay, S. A. (2015) Genome-wide identification of CCA1 targets uncovers an expanded clock network in Arabidopsis.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112(34), E4802-E4810.

Nakaminami, K., Karlson, D. T., e Imai, R. (2006) Functional conservation of cold shock domains in bacteria and higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 10122-10127.

Nelson, B.K., Cai, X. y Nebenfuhr, A. (2007) A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant J.*, 51, 1126-1136.

Noshi, M., Hatanaka, R., Tanabe, N., Terai, Y., Maruta, T. y Shigeoka, S. (2016) Redox regulation of ascorbate and glutathione by a chloroplastic dehydroascorbate reductase is required for high-light stress tolerance in Arabidopsis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80(5), 870-877.

Nover, L., Bharti, K., Doring, P., Mishra, S. K., Ganguli, A. y Scharf, K. D. (2001) Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones.* 6(3), 177-189.

O'Brien, J. A. y Benková, E. (2013) Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses. *Front Plant Sci.* 4, 451.

Ogundiwin, E.A., Martí, C., Forment, J., Pons, C., Granell, A., Gradziel, T.M., Peace, C.P. y Crisosto C.H. (2008) Development of ChillPeach genomic tools and identification of cold-responsive genes in peach fruit. *Plant Mol. Biol.* 68, 379-397.

Ogundiwin, E. A., Peace, C. P., Gradziel, T. M., Parfitt, D. E., Bliss, F. A. y Crisosto, C. H. (2009) A fruit quality gene map of Prunus. *BMC Genomics.* 10, 587.

Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H. y Ohme-Takagi, M. (2001) Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell.* 13, 1959-1968.

Oide, S., Bejai, S., Staal, J., Guan, N., Kaliff, M. y Dixelius, C. (2013) A novel role of PR2 in abscisic acid (ABA) mediated, pathogen-induced callose deposition in Arabidopsis thaliana. *New Phytol.* 200(4), 1187-1199.

Oliveros, J. C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. Referencia on-line.

Olsen, L.R., Kudahl, U.J., Simon, C., Sun, J., Schönbach, C., Reinherz, E.L., Zhang, G.L. y Brusica, V. (2013) BlockLogo: visualization of peptide and sequence motif conservation. *J. Immunol. Methods.* 31, 400-401, 37-44.

Oñate-Sánchez, L. y Vicente-Carbajosa, J. (2008) DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Res. Notes.* 1, 93.

Pabo, C.O., Peisach, E. y Grant, R.A. (2001) Design and selection of novel Cys2His2 zinc



finger proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 313-340.

Pan, Y., Bradley, G., Pyke, K., Ball, G., Lu, C., Fray, R., Marshall, A., Jayasuta, S., Baxter, C., van Wijk, R., Boyden, L., Cade, R., Chapman, N. H., Fraser, P. D., Hodgman, C. y Seymour, G. B. (2013) Network inference analysis identifies an APRR2-like gene linked to pigment accumulation in tomato and pepper fruits. *Plant Physiol.* 161(3), 1476-1485.

Park, S. J., Kwak, K. J., Oh, T. R., Kim, Y. O. y Kang, H. (2009). Cold shock domain proteins affect seed germination and growth of *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *Plant Cell Physiol.* 50(4), 869-878.

Park, S., Lee, C. M., Doherty, C. J., Gilmour, S. J., Kim, Y. y Thomashow, M. F. (2015) Regulation of the *Arabidopsis* CBF regulon by a complex low-temperature regulatory network. *Plant J.* 82(2), 193-207.

Passardi, F., Tognolli, M., De Meyers M., Penel, C. y Dunand, C. (2006) Two cell wall associated peroxidases from *Arabidopsis* influence root elongation. *Planta.* 223(5), 965-974.

Pavez, L., Hödara, C., Olivares, F., González, M. y Cambiazo, V. (2013) Effects of postharvest treatments on gene expression in *Prunus persica* fruit: normal and altered ripening. *Post. Biol. Tec.* 75, 125-134.

Pech, J. C., Balague, C., Latche, A. y Bouzayen, M. (1994) Postharvest physiology of climacteric fruits: recent development in the biosynthesis and action of ethylene. *Science des aliments.* 14, 3-15.

Pedreschi, R. y Lurie, S. (2015) Advances and current challenges in understanding postharvest abiotic stresses in perishables. *Post. Biol. Technol.* 107, 77-89.

Pegoraro, C., Tadiello, A., Girardi, C. L., Chaves, F. C., Quecini, V., de Oliveira, A. C. y Trainotti, L., Rombaldi, C. V. (2015) Transcriptional regulatory networks controlling woolliness in peach in response to preharvest gibberellin application and cold storage. *BMC Plant Biol.* 15, 279.

Peralta, D. A., Araya, A., Nardi, C. F., Busi, M. V. y Gomez-Casati, D.F. (2013) Characterization of the *Arabidopsis thaliana* E3 ubiquitin-ligase AtSINAL7 and identification of the ubiquitination sites. *PLoS ONE.* 8(8), e73104.

Perea-Resa, C., Hernández-Verdeja, T., López-Cobollo, R., del Mar Castellano, M. y Salinas, J. (2012) LSM proteins provide accurate splicing and decay of selected transcripts to ensure normal *Arabidopsis* development. *Plant Cell.* 24(12), 4930-4947.

Pérez-Rodríguez, P., Riaño-Pachón, D. M., Guedes Corrêa, L. G., Rensing, S. A., Kersten, B., Mueller-Roeber, B. (2010) PlnTFDB: updated content and new features of the plant transcription

factor database. *Nucl Acid Res.* 38 (1), D822-D827.

Pérez-Salamó, I., Papdi, C., Rigó, G., Zsigmond, L., Vilela, B., Lumbreras, V., Nagy, I., Horváth, B., Domoki, M., Darula, Z., Medzihradzky, K., Bögre, L., Koncz, C. y Szabados, L. (2014). The heat shock factor A4A confers salt tolerance and is regulated by oxidative stress and the mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6. *Plant Physiol.* 165(1), 319-334.

Phadtare, S. e Inouye, M. (2004) Genome-Wide Transcriptional Analysis of the Cold Shock Response in Wild-Type and Cold-Sensitive, Quadruple-csp-Deletion Strains of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 186 (20), 7007-7014.

Pitzschke, A., Datta, S. y Persak, H. (2014) Salt stress in Arabidopsis: Lipid Transfer Protein AZ11 and its control by Mitogen-Activated Protein Kinase MPK3. *Mol. Plant.* 7(4), 722-738.

Polenta, G. A., Calvete, J. J. y González, C. B. (2007) Isolation and characterization of the main small heat shock proteins induced in tomato pericarp by thermal treatment. *FEBS J.* 274, 6447-6455.

Pons, C., Martí, C., Forment, J., Crisosto, C. H., Dandekar, A. M. y Granell, A. (2014) A bulk segregant gene expression analysis of a peach population reveals components of the underlying mechanism of the fruit cold response. *PLoS One.* 9 (3):e90706.

Pons, C., Martí, C., Forment, J., Crisosto, C. H., Dandekar, A. M. y Granell, A. (2016a) A genetic genomics-expression approach reveals components of the molecular mechanisms beyond the cell wall that underlie peach fruit woolliness due to cold storage. *Plant Mol. Biol.* 92(4-5), 483-503.

Pons, C., Dagar, A., Martí, C., Singh, V., Crisosto, C. H., Friedman, H., Lurie, S. y Granell, A. (2016b) Pre-symptomatic transcriptome changes during cold storage of chilling sensitive and resistant peach cultivars to elucidate chilling injury mechanisms. *BMC Genomics.* 16(1), 245.

Pucciarello, C., Parlanti, S., Banti, V., Novi, G. y Perata, P. (2012) Reactive Oxygen Species-driven transcription in Arabidopsis under oxygen deprivation. *Plant Physiol.* 159(1), 184-196.

Qi, J., Wang, J., Gong, Z. y Zhou, J. M. (2017) Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38, 92-100.

Rai, A.C., Singh, M. y Shah, K. (2012) Effect of water withdrawal on formation of free radical, proline accumulation and activities of antioxidant enzymes in ZAT12-transformed transgenic tomato plants. *Plant Physiol. Biochem.* 61, 108-114.

Rai, A.C., Singh, M. y Shah, K. (2013a) Engineering drought tolerant tomato plants over-expressing BcZAT12 gene encoding a C2H2 zinc finger transcription factor. *Plant Physiol. Biochem.* 85, 44-50.

Rai, A.C., Singh, M. y Shah, K. (2013b) Effect of heat-shock induced oxidative stress is suppressed in BcZAT12 expressing drought tolerant tomato. *Plant Physiol. Biochem.* 95, 109-117.

Rajkowitsch, L., Chen, D., Stampfl, S., Semrad, K., Waldsich, C., Mayer, O., Jantsch, M. F., Konrat, R., Bläsi U. y Schroeder, R. (2007). RNA Chaperones, RNA Annealers and RNA Helicases. *RNA Biol.* 4(3), 118-130.

Ramonell, K., Berrocal-Lobo, M., Koh, S., Wan, J., Edwards, H., Stacey, G., Somerville, S. (2005) Loss-of-function mutations in chitin responsive genes show increased susceptibility to the powdery mildew pathogen *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol.* 138(2), 1027-36.

Reig, G., Iglesias, I., Gatiús, F. y Alegre, S. (2013) Antioxidant capacity, quality, and anthocyanin and nutrient contents of several peach cultivars [*Prunus persica* (L.) Batsch] grown in Spain. *J. Agric. Food Chem.* 61, 6344-6357.

Rizhsky, L., Davletova, S., Liang, H. y Mittler, R. (2004) The zinc finger protein Zat12 is required for Cytosolic Ascorbate Peroxidase 1 expression during oxidative stress in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 279, 12, 11736-11743.

Rozen, S. y Skaletsky, H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. S. Misener y S.A. Krawetz, editors. Humana Press. Totowa, New Jersey, USA, 132, 365-386.

Rubio, M., Rodríguez-Moreno, L., Ballester, A. R., de Moura, M. C., Bonghi, C., Candresse, T. y Martínez-Gómez, P. (2015) Analysis of gene expression changes in peach leaves in response to Plum pox virus infection using RNA-Seq. *Mol. Plant Path.* 16, 164-176.

Ruggieri, G., Triassi, A., Alvarez, C. E., Gola, A. Wiggerhauser, J., Budde, C. O., Lara, M. V., Drincovich, M. F. y Müller, G. L. (2018) Overexpression of Glycine-Rich RNA binding protein in tomato renders fruits with higher protein content after cold storage. *Biol. Plantarum*.

Saini, S., Sharma, I., y Pati, P. K. (2015) Versatile roles of brassinosteroid in plants in the context of its homeostasis, signaling and crosstalks. *Front. Plant Sci.* 6, 950.

Sakamoto, H., Maruyama, K., Sakuma, Y., Meshi, T., Iwabuchi, M., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004) *Arabidopsis* Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. *Plant Physiol.* 136, 2734-2746.

- Sakuma, Y., Maruyama, K., Qin, F., Osakabe, Y., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006) Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(49), 18822-18827.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook, J. y Russell, D. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez-Ballesta, M. T., Lluch, Y., Gosalbes, M. J., Zacarias, L., Granell, A. y Lafuente, M. T. (2003) A survey of genes differentially expressed during long-term heat-induced chilling tolerance in citrus fruit. *Planta*. 218(1), 65-70.
- Sasaki, K., Kim, M. H., Kanno, Y., Seo, M., Kamiya, Y. y Imai, R. (2015) Arabidopsis cold shock domain protein 2 influences ABA accumulation in seed and negatively regulates germination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 456(1), 380-384.
- Scarpeci, T.E., Zanon, M.I., Carrillo, N., Mueller-Roeber, B. y Valle, E.M. (2008) Generation of superoxide anion in chloroplasts of Arabidopsis thaliana during active photosynthesis: a focus on rapidly induced genes. *Plant Mol. Biol.* 66, 361-378.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. y Cardona, A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. 9(7), 676-682.
- Schmidt, R., Mieulet, D., Hubberten, H-M., Obata, T., Hoefgen, R., Fernie, A.R., Fisahn, J., San Segundo, B., Guiderdoni, E., Schippers, J.H.M. y Mueller-Roeber, B. (2013) SALT-RESPONSIVE ERF1 regulates Reactive Oxygen Species-dependent signaling during the initial response to salt stress in rice. *Plant Cell*. 25, 2115-2131.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., y Eliceiri, K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 9(7): 671-675.
- Schramm, F., Ganguli, A., Kiehlmann, E., Englich, G., Walch, D. y von Koskull-Döring, P. (2006) The heat stress transcription factor HsfA2 serves as a regulatory amplifier of a subset of genes in the heat stress response in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* 60, 759-772.
- Schröder, F., Lisso, J., Obata, T., Erban, A., Maximova, E., Giavalisco, P., Kopka, J., Fernie, A. R., Willmitzer, L. y Müssig, C. (2014) Consequences of induced brassinosteroid deficiency in Arabidopsis leaves. *BMC Plant Biol.* 14, 309.

- Semrad, K. (2011) Proteins with RNA chaperone activity: a world of diverse proteins with a common task-impediment of RNA misfolding. *Biochem. Res. Int.* vol. 2011, 1-11.
- Seok, H. Y., Woo, D. H., Nguyen, L. V., Tran, H. T., Tarte, V. N., Mehdi, S. M., Lee, S. Y. y Moon, Y. H. (2017) Arabidopsis AtNAP functions as a negative regulator via repression of AREB1 in salt stress response. *Planta.* 245(2), 329-341.
- Shi, Y., Huang, J., Sun, T., Wang, X., Zhu, C., Ai, Y. y Gu, H. (2017) The precise regulation of different COR genes by individual CBF transcription factors in Arabidopsis thaliana. *J. Integr. Plant Biol.* 59(2), 118-133.
- Shi, Y., Tian, S., Hou, L., Huang, X., Zhang, X., Guo, H. y Yang, S. (2012). Ethylene signaling negatively regulates freezing tolerance by repressing expression of CBF and Type-A ARR genes in Arabidopsis. *The Plant Cell.* 24(6), 2578-2595.
- Shi, Y., Zhang, X., Xu, Z. Y., Li, L., Zhang, C., Schläppi, M. y Xu, Z. Q. (2011) Influence of EARL1-like genes on flowering time and lignin synthesis of Arabidopsis thaliana. *Plant Biol.* 13(5), 731-739.
- Shockey, J.M., Fulda, M. S. y Browse, J. A. (2002) Arabidopsis contains nine long-chain acyl-coenzyme a synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism. *Plant Physiol.* 129, 1710-1722.
- Shulaev, V., Korban, S.S., Sosinski, B., Abbott, A.G., Aldwinckle, H.S., Folta, K.M., Lezzoni, A., Main, D., Arús, P., Dandekar, A.M., Lewers, K., Brown, S.K., Davis, T.M., Gardiner, S.E., Potter, D., Veilleux, R.E. (2008) Multiple models for Rosaceae genomics. *Plant Physiol.* 147, 985-1003.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J.D. y Higgins D.G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 539.
- Silvestro, D., Andersen, T. G., Schaller, H. y Jensen, P. E. (2013) Plant Sterol Metabolism.  $\Delta^7$ -Sterol-C5-Desaturase (STE1/DWARF7),  $\Delta^{5,7}$ -Sterol- $\Delta^7$ -Reductase (DWARF5) and  $\Delta^{24}$ -Sterol- $\Delta^{24}$ -Reductase (DIMINUTO/DWARF1) show multiple subcellular localizations in Arabidopsis thaliana (Heynh) L. Heazlewood. *PLoS ONE.* 8(2), e56429.
- Sirpiö, S., Khrouchtchova, A., Allahverdiyeva, Y., Hansson, M., Fristedt, R., Vener, A. V., Scheller, H. V., Jensen, P. E., Haldrup, A. y Aro, E. M. (2008) AtCYP38 ensures early biogenesis, correct assembly and sustenance of photosystem II. *Plant J.* 55(4), 639-651.
- Smith, B.J. (1984) Quantification of proteins on polyacrylamide gels (nonradioactive). *Methods Mol. Biol.* 1, 119-125.

- Streb, S. y Zeeman, S. C. (2012) Starch Metabolism in Arabidopsis. En: The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists. 10, e0160.
- Su, C.F., Wang, Y.C., Hsieh, T.H., Lu, C.A., Tseng, T.H. y Yu, S.M (2010) A novel MYBS3-dependent pathway confers cold tolerance in rice. *Plant Physiol.* 153(1), 145-158.
- Sun, Q., Zybaïlov, B., Majeran, W., Friso, G., Olinares, P. D. y van Wijk, K. J. (2008a) PPDB, the Plant Proteomics Database at Cornell. *Nucleic Acids Res.* 37, 969-974.
- Sun, S., Yu, J. P., Chen, F., Zhao, T. J., Fang, X. H., Li, Y. Q. y Sui, S. F. (2008b) TINY, a dehydration-responsive element (DRE)-binding protein-like transcription factor connecting the DRE- and ethylene-responsive element-mediated signaling pathways in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 283(10), 6261-6271.
- Sun, S-J., Guo, S-Q., Yang, X., Bao, Y-M., Tang, H-J., Sun, H., Huang, J. y Zhang, H-S. (2010) Functional analysis of a novel Cys2/His2-type zinc finger protein involved in salt tolerance in rice. *J. Exp. Bot.* 61(10) 2807-2818.
- Sutoh, K. y Yamauchi, D. (2003) Two cis-acting elements necessary and sufficient for gibberellin-upregulated proteinase expression in rice seeds. *Plant J.* 34, 635-645.
- Suzuki, N. y Mittler, R. (2006) Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Plant Physiol.* 126, 45-51.
- Suzuki, N., Bajad, S., Shuman, J., Shulaev, V. y Mittler, R. (2008) The transcriptional co-activator MBF1c is a key regulator of thermotolerance in Arabidopsis thaliana. *J. Biol. Chem.* 283(14), 9269-9275.
- Takahashi, D., Kawamura, Y. y Uemura M. (2016) Cold acclimation is accompanied by complex responses of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 67(17), 5203-5215.
- Takahashi, F., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Ichimura, K., Shinozaki, K. (2011) Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in Arabidopsis. *Mol. Cell.* 41(6), 649-660.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. y Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Tanou, G., Minas, I. S., Scossa, F., Belghazi, M., Xanthopoulou, A., Ganopoulos, I., Madesis, P., Fernie, A. y Molassiotis A. (2017) Exploring priming responses involved in peach fruit acclimation to cold stress. *Sci. Rep.* 7(1), 11358.
- Tanz, S.K., Castleden, I., Hooper, C.M., Vacher, M., Small, I. y Millar, H.A. (2013) SUBA3: a database for integrating experimentation and prediction to define the SUBcellular location of

proteins in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* 41, D1185-D1191.

Tao, T. (2010) Standalone BLAST Setup for Unix. En: BLAST® Help [Internet]. National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, US. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK52640/>.

Terry, M. J. y Smith, A. G. (2013) A model for tetrapyrrole synthesis as the primary mechanism for plastid-to-nucleus signaling during chloroplast biogenesis. *Front. Plant Sci.* 4, 14.

The International Peach Genome. Verde, I., Abbott, A. G., Scalabrin, S., Jung, S., Shu, S., Marroni, F. y col. (2013). The high-quality draft of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nat. Genet.* 45, 487-494.

Thimm, O., Blaesing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L. A., Rhee, S. Y. y Stitt, M. (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.* 37(6), 914-39.

Tian, T., Liu, Y., Yan, H., You, Q., Yi, X., Du, Z., Xu, W. y Su, Z. (2017) agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucl. Acid Res.* 45(W1), W122-W129.

Tittarelli, A., Santiago, M., Morales, A., Meisel, L. A. y Silva, H. (2009) Isolation and functional characterization of cold-regulated promoters, by digitally identifying peach fruit cold-induced genes from a large EST dataset. *BMC Plant Biol.* 9, 121.

Toivonen, P. M. A. y Brummell, D. A. (2008) Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Post. Biol. Technol.* 48, 1-14.

Tran, L. P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S. D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004) Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the Early Responsive to Dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell.* 16, 2481-2498.

Tsuda, T. (2008) Regulation of adipocyte function by anthocyanins; possibility of preventing the metabolic syndrome. *J. Agr. Food Chem.* 56(3), 642-646.

Tucker, G. A. (1993). Introduction. En: Seymour G. B., Taylor J. E., Tucker G. A. (Editores). Biochemistry of fruit ripening. London, Chapman y Halt, pp 3-43.

Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M., Geiger, T., Mann, M. y Cox, J. (2016) The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods.* 13, 731-740.

Valentini, G. y Daorden, M. E. (2012) Actualización del panorama varietal de durazneros y nectarinas para el norte bonaerense. Ediciones INTA. Estación Experimental San Pedro. Buenos

Aires. Argentina. Ficha técnica N° 21, pp. 35.

Vardhini, B.V. y Anjum, N.A. (2015) Brassinosteroids make plant life easier under abiotic stresses mainly by modulating major components of antioxidant defense system. *Front. Environ. Sci.* 2, 1-16.

Verde, I., Jenkins, J., Dondini, L., Micali, S., Pagliarani, G., Vendramin, E., Paris, R., Aramini, V., Gazza, L., Rossini, L., Bassi, D., Troglio, M., Shu, S., Grimwood, J., Tartarini, S., Dettori, M. T., Schmutz, J. (2017) The Peach v2.0 release: high-resolution linkage mapping and deep resequencing improve chromosome-scale assembly and contiguity. *BMC Genomics*, 18:225.

Verma, S. S., Chinnusamy, V., Asif, M. y Bansal, K. C. (2013) Synergistic effect of C2H2 type Zinc-finger protein with LEA promoter to enhance abiotic stress tolerance in *Brassica juncea*. *Plant Omics J.* 6(3), 208-214.

Vizoso, P., Meisel, L.A., Tittarelli, A., Latorre, M., Saba, J., Caroca, R., Maldonado, J., Cambiazo, V., Campos-Vargas, R., Gonzalez, M., Orellana, A. y Silva, H. (2009) Comparative EST transcript profiling of peach fruits under different post-harvest conditions reveals candidate genes associated with peach fruit quality. *BMC Genomics*, 10, 423.

Vogel, J. T., Zarka, D. G., Van Buskirk, H. A., Fowler, S. G. y Thomashow, M. F. (2005) Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant J.* 41, 195-211.

Voinett, O., Rivas, S., Mestre, P. y Baulcombe., D. (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33, 949-956.

Waese, J., Fan, J., Pasha, A., Yu, H., Fucile, G., Shi, R., Cumming, M., Kelley, L., Sternberg, M., Krishnakumar, V., Ferlanti, E., Miller, J., Town, C., Stuerzlinger, W. y Provart, N. J. (2017) ePlant: visualizing and exploring multiple levels of data for hypothesis generation in plant biology. *Plant Cell.* 29(8): 1806-1821.

Walley, J. W., Coughlan, S., Hudson, M. E., Covington, M. F., Kaspi, R., Banu, G., Harmer, S. L. y Dehesh, K. (2007) Mechanical stress induces biotic and abiotic stress responses via a novel cis-element. *PLoS ONE.* 3 (10), e172.

Wang, K., Yin, X.-R., Zhang, B., Grierson, D., Xu, C.-J. y Chen, K.-S. (2017) Transcriptomic and metabolic analyses provide new insights into chilling injury in peach fruit. *Plant, Cell & Environment.* 40, 1531-1551.

Wang, L., Chen, S., Kong, W., Li, S. y Archbold, D.D. (2006) Salicylic acid pre-treatment



alleviates chilling injury and affects the antioxidants system and heat shock proteins of peaches during cold storage. *Postharvest Biol. Technol.* 41, 244-251.

Wang, L., Zhao, S., Gu, C., Zhou, Y., Zhou, H., Ma, J., Cheng, J. y Han, Y. (2013) Deep RNA-Seq uncovers the peach transcriptome landscape. *Plant Mol. Biol.* 83, 365.

Wang, Q., Wan, L., Li, D., Zhu, L., Qian, M. y Deng, M. (2009) Searching for bidirectional promoters in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Bioinformatics.* 10 (1), S29.

Wang, Q., Wang, M., Zhang, X., Hao, B., Kaushik, S. K. y Pan, Y. (2011) WRKY gene family evolution in *Arabidopsis thaliana*. *Genetica.* 139(8), 973-983.

Watada, A. E., Herner, R. C., Kader, A. A., Romani, R. J. y Staby, G. L. (1984) Terminology for the description of development stages of horticultural crops. *HortScience.* 19, 20-21.

Webb, B. y Sali, J. (2014) Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr. Prot. Bioinformatics*, John Wiley & Sons, Inc, 5.6.1-5.6.32.

Wei, Y., Hu, W., Xia, F., Zeng, H., Li, X., Yan, Y., He, C. y Shi, H. (2016) Heat shock transcription factors in banana: genome-wide characterization and expression profile analysis during development and stress response. *Sci Rep.* 6, 36864.

Wen, R., Wang, S., Xiang, D., Venglat, P., Shi, X., Zang, Y., Datla, R., Xiao, W. y Wang H. (2014) UBC13, an E2 enzyme for Lys63-linked ubiquitination, functions in root development by affecting auxin signaling and Aux/IAA protein stability. *Plant J.* 80(3), 424-436.

Whelan, S. y Goldman, N. (2001) A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol. Biol. Evol.* 18, 691-699.

Wills, R., Mc Glasson, B., Graham, D. y Joyce, D. (1998) Physiology and biochemistry and evaluation and management of quality. En: *Postharvest, an introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables & ornamentals*. Cuarta Edición. UNSW Press, Adelaide, Australia, pp. 33-59.

Wisniewski, M. E., Bassett, C. L., Renaut, J., Farrell, R., Tworkoski, T. y Artlip, T.S. (2006) Differential regulation of two dehydrin genes from peach (*Prunus persica*) by photoperiod, low temperature and water deficit. *Tree Physiol.* 26, 575-584.

Wittenberg, G., Levitan, A., Klein, T., Dangoor, I., Keren, N. y Danon, A. (2014) Knockdown of the *Arabidopsis thaliana* chloroplast protein disulfide isomerase 6 results in reduced levels of photoinhibition and increased D1 synthesis in high light. *Plant J.* 78(6), 1003-1013.

Wu, B. H., Quilot, B., Kervella, J., Génard, M. y Li, SH. (2003). Analysis of genotypic variation of sugar and acid contents in peaches and nectarines through the Principle Component Analysis.

*Euphytica*. 132, 375-384.

Wu, Z., Zhu, D., Lin, X., Miao, J., Gu, L., Deng, X., Yang, Q., Sun, K., Zhu, D., Cao, X., Tsuge, T., Dean, C., Aoyama, T., Gu, H. y Qu, L. J. (2016) RNA binding proteins RZ-1B and RZ-1C play critical roles in regulating pre-mRNA splicing and gene expression during development in Arabidopsis. *Plant Cell*. 28(1), 55-73.

Xi, W.-P., Zhang, B., Liang, L., Shen, J.-Y., Wei, W.-W., Xu, C.-J., Allan, A. C., Ferguson, I. B. y Chen, K.-S. (2012) Postharvest temperature influences volatile lactone production via regulation of acyl-CoA oxidases in peach fruit. *Plant Cell Environ*. 35, 534-545.

Xia, B., Ke, H. e Inouye, M. (2001) Acquisition of cold sensitivity by quadruple deletion of the cspA family and its suppression by PNPase S1 domain in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*. 40, 179-188.

Xiao, S., Dai, L., Liu, F., Wang, Z., Peng, W. y Xie, D. (2004) COS1: an Arabidopsis coronatine insensitive1 suppressor essential for regulation of jasmonate-mediated plant defense and senescence. *Plant Cell*. 16(5), 1132-1142.

Xiong, J. Y., Lai, C. X., Qu, Z., Yang, X. Y., Qin, X. H. y Liu, GQ. (2009) Recruitment of AtWHY1 and AtWHY3 by a distal element upstream of the kinesin gene AtKP1 to mediate transcriptional repression. *Plant Mol. Biol*. 71(4-5), 437-449.

Xu, D., Huang, X., Xu, Z. Q. y Schläppi, M. (2011b) The HyPRP gene EARLI1 has an auxiliary role for germinability and early seedling development under low temperature and salt stress conditions in Arabidopsis thaliana. *Planta*. 234(3), 565-577.

Xu, X., Chen, C., Fan, B. y Chen, Z. (2006) Physical and functional Interactions between and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell*. 18, 1310-1326.

Xu, Z. Y., Zhang, X., Schläppi, M. y Xu, Z. Q. (2011a) Cold-inducible expression of AZI1 and its function in improvement of freezing tolerance of Arabidopsis thaliana and Saccharomyces cerevisiae. *J. Plant Physiol*. 168(13), 1576-1587.

Yamaki, S. (1995) Physiology and metabolism of fruit development - biochemistry of sugar metabolism and compartmentation in fruits. *Acta Hortic*. 109-120.

Yamanaka, K. (1999) Cold shock response in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*. 1, 193-202.

Yamanaka, K., Fang, L. e Inouye, M. (1998). The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. *Mol. Microbiol*. 27, 247-255.

Yang, J., Worley, E. y Udvardi, M. (2014) A NAP-AAO3 regulatory module promotes

- chlorophyll degradation via ABA biosynthesis in Arabidopsis leaves. *Plant Cell*. 26(12), 4862-4874.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. y Zhang, Y. (2015) The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*. 12: 7-8.
- Yang, X., Zhu, W., Zhang, H., Liu, N. y Tian, S. (2016) Heat shock factors in tomatoes: genome-wide identification, phylogenetic analysis and expression profiling under development and heat stress. *Peer J*. 4, e1961.
- Yoo, H. H., Kwon, C., Lee, M. M. y Chung, I. K. (2007) Single-stranded DNA binding factor AtWHY1 modulates telomere length homeostasis in Arabidopsis. *Plant J*. 49(3), 442-451.
- Yoo, K. S., Ok, S. H., Jeong, B. C., Jung, K. W., Cui, M. H., Hyoung, S., Lee, M. R., Song, H. K. y Shin, J. S. (2011) Single cystathionine  $\beta$ -synthase domain-containing proteins modulate development by regulating the thioredoxin system in Arabidopsis. *Plant Cell*. 23(10), 3577-3594.
- Yu, C. S., Cheng, C. W., Su, W. C., Chang, K. C., Huang, S. W., Hwang, J. K. y Lu, C. H. (2014) CELLO2GO: A Web Server for Protein subCELLular LOCALization Prediction with Functional Gene Ontology Annotation. *PLoS ONE*. 9(6): e99368.
- Yun, K-Y., Park, M.R., Mohanty, B., Herath, V., Xu, F., Mauleon, R., Wijaya, E., Bajic, V.B., Bruskiwich, R., de los Reyes, B.G. (2010) Transcriptional regulatory network triggered by oxidative signals configures the early response mechanisms of japonica rice to chilling stress. *Plant Biol*. 10, 16.
- Yun, Z., Jin, S., Ding, Y., Wang, Z., Gao, H., Pan, Z., Xu, J., Cheng, Y. y Deng, X. (2012) Comparative transcriptomics and proteomics analysis of citrus fruit, to improve understanding of the effect of low temperature on maintaining fruit quality during lengthy post-harvest storage. *J. Exp. Bot*. 63(8), 2873-2893.
- Zaltsman, A., Ori, N. y Adam, Z. (2005) Two types of FtsH protease subunits are required for chloroplast biogenesis and Photosystem II repair in Arabidopsis. *Plant Cell*. 17(10), 2782-2790.
- Zawistowski, J., Biliaderis, C. G. y Eskin, N. A. M. (1991) Polyphenol oxidases. *Oxidative Enzymes in Foods*. Elsevier, London, UK, pp. 217-273.
- Zhang, C., Ding, Z., Xu, X., Wang, Q., Qin, G., Tian, S. (2010) Crucial roles of membrane stability and its related proteins in the tolerance of peach fruit to chilling injury. *Amino Acids*, 39, 181-194.
- Zhang, C., Zhang, B., Ma, R., Yu, M., Guo, S., Guo L. y Korir, N. K. (2016) Identification of known and novel microRNAs and their targets in peach (*Prunus persica*) fruit by high-throughput sequencing. *PLoS One*. 11(7), e0159253.

Zhang, S., Wu, J., Yuan, D., Zhang, D., Huang, Z., Xiao, L. y Yang, C. (2014) Perturbation of auxin homeostasis caused by mitochondrial FtSH4 gene-mediated peroxidase accumulation regulates arabidopsis architecture. *Mol. Plant.* 7(5), 856-873.

Zhong, S., Fei, Z., Chen, Y. R., Zheng, Y., Huang, M., Vrebalov, J., McQuinn, R., Gapper, N., Liu, B., Xiang, J., Shao, Y. y Giovannoni, J. J. (2013) Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. *Nat. Biotechnol.* 31(2), 154-159.

Zhu, T., Tan, W.R., Deng, X.G., Zheng, T., Zhang, D.W. y Lin, H.H. (2015) Effects of brassinosteroids on quality attributes and ethylene synthesis in postharvest tomato fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 100, 196-204.

Zimmermann, L., Stephens, A., Nam, S. Z., Rau, D., Kübler, J., Lozajic, M., Gabler, F., Söding, J., Lupas, A. N. y Alva, V. (2017) A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred server at its core. *J. Mol. Biol.* En prensa.

Zimmermann, P., Heinlein, C., Orendi, G. y Zentgraf, U. (2006) Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Cell Environ.* 29(6), 1049-1060.

Zoeller, M., Stingl, N., Krischke, M., Fekete, A., Waller, F., Berger, S., y Mueller, M. J. (2012) Lipid profiling of the *Arabidopsis* hypersensitive response reveals specific lipid peroxidation and fragmentation processes: biogenesis of pimelic and azelaic acid. *Plant Physiol.* 160(1), 365-378.

Zucconi, F. (1986) Peach. En: Handbook of fruit set and development. Monselise, S. P. (Editor). CRC Press. Boca Ratón, Florida, Estados Unidos, pp. 303-321.

Zuo, J., Wang, Q., Han, C., Ju, Z., Cao, D., Zhu, B., Luo, Y. y Gao, L. (2017) SRNAome and degradome sequencing analysis reveals specific regulation of sRNA in response to chilling injury in tomato fruit. *Physiol. Plant.* 160(2), 142-154.

*Material suplementario*

## 9. Material suplementario

La presente tesis cuenta con tablas suplementarias SI-XIII que contienen la información obtenida así como también procesada *in silico* en diferentes análisis, con diversos fines. Por razones de tamaño y cantidad de datos que contienen, se han depositado digitalmente en el siguiente enlace:

<https://drive.google.com/open?id=1qNsXNDRtSywarcdXltguxKmnsRU0kwSi>

Cualquier inconveniente en su obtención se puede resolver enviando la consulta a:

[gismondi@cefobi-conicet.gov.ar](mailto:gismondi@cefobi-conicet.gov.ar)

[bustamante@cefobi-conicet.gov.ar](mailto:bustamante@cefobi-conicet.gov.ar)