

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

INSTITUT VALÈNCIÀ D'INVESTIGACIONS AGRÀRIES



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

ivia
Institut Valencià
d'Investigacions Agràries

MARCADORES RELACIONADOS CON LA LATENCIA INVERNAL EN MELOCOTONERO

MÁSTER EN MEJORA GENÉTICA VEGETAL

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Alumna: Raquel Bertí Martínez

Tutor: Gabino Ríos García

Tutora UPV: María José Teresa de Jesús Díez Niclós

Curso: 2020-2021

Título: Marcadores relacionados con la latencia invernal en melocotonero

Resumen: La latencia invernal es un proceso común en plantas perennes de clima templado como el melocotonero (*Prunus persica*), en el que los meristemas dejan de crecer y forman yemas protectoras para evitar daños por el frío y la desecación. La reanudación del crecimiento requiere de la percepción de una acumulación determinada de frío que es dependiente del genotipo (requerimiento de frío). Se ha partido de un trabajo anterior en el que se ha observado una mayor expresión de los genes de síntesis de prolina *P5CR* y *P5CS* en plantas transgénicas de ciruelo que sobreexpresan el gen regulador de la latencia de melocotonero *DORMANCY-ASSOCIATED MADS-BOX 6 (DAM6)*. Con el objeto de comprobar si la prolina ejerce un efecto protector frente al estrés abiótico en yema latente, donde *DAM6* lleva a cabo su función reguladora, se ha medido la acumulación de prolina y la expresión de los genes de síntesis de prolina durante el desarrollo de la yema floral. Se han empleado dos variedades con requerimientos de frío diferentes (*Red Candem* y *Crimson Baby*). A diferencia de lo que ocurre con el sorbitol, un soluto compatible que se acumula en yema latente de melocotonero de forma regulada, nuestros resultados indican que la prolina no se sintetiza de forma coordinada con la latencia. Por tanto, la síntesis de prolina no puede considerarse un marcador fisiológico y de expresión en el proceso de la latencia invernal. Por otro lado, se ha iniciado un abordaje para la comprobación de marcadores moleculares *SNP* asociados a la salida de latencia y la fecha de floración dentro de una colección de germoplasma de melocotonero.

Palabras clave: melocotonero, latencia, yema, prolina, floración

Title: Markers related to winter dormancy in peach

Abstract: Winter dormancy is a common process in temperate perennial plants such as the peach tree (*Prunus persica*), in which the meristems stop growing and form protective buds to prevent damage from cold and desiccation. The resumption of growth requires the perception of a certain accumulation of cold that is dependent on the genotype (chilling requirement). It has started from a previous work in which a higher expression of the proline synthesis genes *P5CR* and *P5CS* has been observed in transgenic plum plants that overexpress the peach dormancy regulator gene *DORMANCY-ASSOCIATED MADS-BOX 6 (DAM6)*. In order to verify whether proline exerts a protective effect against abiotic stress in the dormant bud, where *DAM6* carries out its regulatory function, the accumulation of proline and the expression of the genes for the synthesis of proline during the development of the flower bud were measured. Two varieties with different chilling requirements have been used (*Red Candem* and *Crimson Baby*). Unlike what happens with sorbitol, a compatible solute that accumulates in dormant peach bud in a regulated way, our results indicate that proline is not synthesized in a coordinated way with dormancy. Therefore, the synthesis of proline cannot be considered as a physiological and expression marker in the process of winter dormancy. On the other hand, an approach has been initiated to test SNP molecular markers associated with the dormancy release and the flowering date within a peach germplasm collection.

Key words: peach, dormancy, bud, proline, flowering

Títol: Marcadors relacionats amb la latència hivernal en bresquillera

Resum: La latència hivernal és un procés comú en plantes perennes de clima temperat com la bresquillera (*Prunus persica*), en el qual els meristems deixen de créixer i formen gemmes protectores per a evitar danys pel fred i la dessecació. La represa del creixement requereix de la percepció d'una acumulació determinada de fred que és dependent del genotip (requeriment de fred). S'ha partit d'un treball anterior en el qual s'ha observat una major expressió dels gens de síntesis de prolina P5CR i P5CS en plantes transgèniques de prunera que sobreexpressen el gen regulador de la latència de bresquillera *DORMANCY-ASSOCIATED MADS-BOX 6 (DAM6)*. A fi de comprovar si la prolina exerceix un efecte protector contra l'estrés abiòtic en gemma latent, on *DAM6* duu a terme la seua funció reguladora, s'ha mesurat l'acumulació de prolina i l'expressió dels gens de síntesis de prolina durant el desenvolupament de la gemma floral. S'han emprat dues varietats amb requeriments de fred diferents (*Red Candem* i *Crimson Baby*). A diferència del que ocorre amb el sorbitol, un solut compatible que s'acumula en gemma latent de bresquillera de forma regulada, els nostres resultats indiquen que la prolina no se sintetitza de manera coordinada amb la latència. Per tant, la síntesi de prolina no pot considerar-se un marcador fisiològic i d'expressió en el procés de la latència hivernal. D'altra banda, s'ha iniciat un abordatge per a la comprovació de marcadors moleculars SNP associats a l'eixida de latència i la data de floració dins d'una col·lecció de germoplasma de bresquillera.

Paraules clau: bresquillera, latència, gemma, prolina, floració

AGRADECIMIENTOS

A Jesús García Brunton por cedernos su colección de variedades de melocotonero para nuestro estudio, a las dos técnicas de laboratorio Mati y Fany por su ayuda en el día a día del laboratorio, al mejor compañero de laboratorio Carles, a Ángeles Calatayud, Lidia y Yaiza por ayudarme en el protocolo de la prolina. A mi padre por el ánimo que me ha dado a lo largo de todo el proceso además de llevarme en coche al laboratorio cuando lo he necesitado, a mi segunda madre Anna por ser el pilar que me sostiene y su comprensión, a mi pareja por su apoyo total y ayuda incondicional, a mi hermano por estar ahí y escucharme cuando lo he necesitado y por último, a mis compañeras y compañeros del máster por compartir experiencia y conocimientos.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	8
2.	OBJETIVOS	11
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1.	Muestras de melocotonero	12
3.2.	Cuantificación de prolina	13
3.3.	Análisis de expresión mediante PCR cuantitativa (qPCR)	14
3.4.	Extracción de DNA genómico de muestras de hojas	17
3.5.	Electroforesis en gel de agarosa	18
3.6.	Cuantificación.....	18
3.6.1.	Nanodrop	18
3.6.2.	Qubit.....	18
3.7.	High Resolution Melting (HRM)	18
3.7.1.	Preparación de los elementos de la qPCR	18
3.7.2.	Programa para el instrumento <i>LightCycler 480 Real-Time PCR system</i>	19
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1.	Papel de la prolina en la tolerancia a estreses abióticos durante la latencia.....	21
4.2.	Comprobación de marcadores moleculares SNP asociados a la latencia.....	25
5.	CONCLUSIONES	32
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	33

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

CB: *Crimson Baby* (variedad de melocotón de floración media)

cDNA: DNA complementario al RNA

DAM: *Dormancy Associated MAD-box* (caja MAD asociada a la latencia)

F: *Forward* (cebador de la cadena líder)

HRM: *High Resolution Melting* (disociación de alta resolución)

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (reacción de la polimerasa en cadena)

qPCR: PCR cuantitativa

QTL: *Quantitative Trait Loci* (loci de un carácter cuantitativo)

R: *Reverse* (cebador de la cadena complementaria antisentido)

RC: *Red Candem* (variedad de melocotón de floración temprana)

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism* (polimorfismo de secuencia simple)

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas leñosas son muy importantes en los ecosistemas y han sido aprovechadas por ser una fuente de biomasa tanto por sus frutos como por su madera. La especie de estudio de este trabajo es el melocotonero (*Prunus persica*), una especie frutal de especial importancia económica en nuestro país.

Durante los meses fríos de otoño e invierno, el melocotonero y otros frutales entran en una fase de latencia (Fennell, 2014). Se trata de una etapa de ausencia de crecimiento durante la cual la planta se protege de las bajas temperaturas y la desecación mediante unas estructuras llamadas yemas. Hay dos tipos de yemas, las yemas reproductivas, que darán lugar a las estructuras florales, y las yemas vegetativas, que darán lugar a brotes vegetativos. Es de vital importancia para la cosecha que la latencia se desarrolle correctamente y se evite una floración prematura que pueda traer como consecuencia una helada y pérdida de la producción. También es interesante estudiar la latencia para posibilitar el desarrollo de nuevas variedades frente a cambios ambientales como el cambio climático.

Existen tres tipos de latencia, la paralatencia, la endolatenencia y la ecolatenencia. Durante la etapa de paralatencia el crecimiento de la yema axilar es inhibido debido principalmente a la dominancia ejercida por la yema apical y las que están aún en crecimiento. Esta capacidad potencial de brotar se va perdiendo paulatinamente conforme se avanza en la estación. La yema va perdiendo desde la base su color verde por desintegración de la clorofila en las células epidérmicas y se torna paulatinamente de un color café claro hasta un tono oscuro debido a la acumulación de lignina y otros compuestos fenólicos en las paredes celulares. Este período es conocido como agostamiento y coincide con el término del crecimiento de la yema y el paso a la etapa conocida como endolatenencia (Pinto *et al.*, 2016). La endolatenencia es la latencia verdadera, en la que la yema no retoma su crecimiento aunque se dé un periodo de temperaturas benignas y una serie de mecanismos fisiológicos y moleculares que asegura una mayor tolerancia a los estreses abióticos provocados por el frío y la falta de agua (Figura 1). Sólo después de la percepción de una cantidad determinada de horas de frío en el exterior, dependiente de la especie y el cultivar (requerimientos de frío), la yema pasa a entrar en el periodo de ecolatenencia, en el cual necesita una etapa de temperaturas que favorezcan la brotación (requerimientos de calor) y donde tienen lugar los últimos pasos en el desarrollo de la flor como por ejemplo la microsporogénesis y la maduración del polen (Ríos *et al.*, 2016; Lloret *et al.*, 2018).

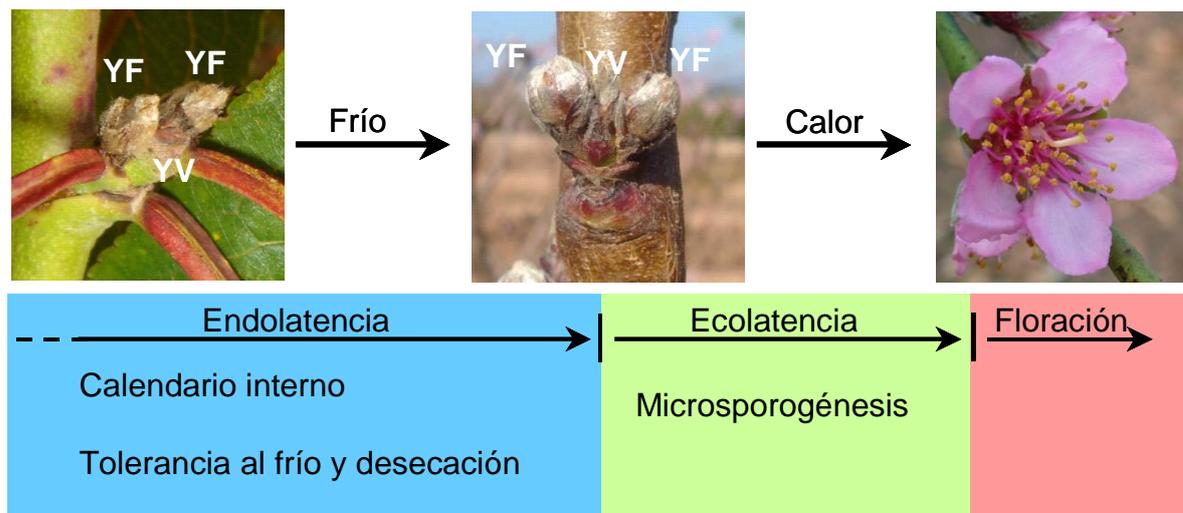


Figura 1. Fases de endolatenza y ecolatenza en yemas de melocotonero. Se señalan las yemas de flor (YF) y vegetativas (YV).

Como se ha dicho anteriormente, la tolerancia al estrés abiótico de la yema, particularmente en invierno, es vital para su posterior desarrollo debido a los efectos dañinos del frío y déficit hídrico. Para ello, la planta detiene el crecimiento y desarrolla yemas que protegen sus meristemas e inflorescencias. Estas yemas percibirán una cantidad de horas de frío determinadas que recuerda al proceso de vernalización que experimentan brasicáceas (*Arabidopsis thaliana* entre otras) y cereales (Trotel *et al.*, 1996; Chouard, 1960). En este proceso se ha descrito una familia de proteínas asociadas al estrés llamadas SAP (*Stress Associated Proteins*). Estas proteínas, además del frío y la desecación, también protegen a la planta de altas temperaturas, estrés osmótico y salino y contaminación por metales pesados. Se ha comprobado que su sobreexpresión en plantas transgénicas confiere protección contra el estrés abiótico (Lloret *et al.*, 2017a). Otro mecanismo de protección contra el estrés abiótico es la producción del sorbitol como soluto compatible y crioprotector (Lloret *et al.*, 2017b).

La prolina es un aminoácido que se ha descrito con una función protectora, de un modo similar al sorbitol. Se ha podido probar su efecto osmoregulador, en el mantenimiento de la solubilidad de las proteínas y la estabilización de la membrana fosfolipídica así como ser una fuente de carbono, nitrógeno y energía (Shin *et al.*, 2016). Walton *et al.* (1998) demostraron que la prolina se acumula en las yemas de kiwi durante la salida de la latencia y la diferenciación de la flor.

Los genes de la ruta de biosíntesis de la prolina han sido caracterizados en plantas. La prolina se puede sintetizar a partir del glutamato o la ornitina, aunque la vía esencial para producir prolina en situación de estrés osmótico es a través del glutamato. El primer paso consiste en la conversión del glutamato en delta 1-pirrolina-5-carboxilato mediante la enzima pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS) y posteriormente su reducción a prolina por la enzima pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CR). En el laboratorio donde se ha realizado este trabajo, se han identificado genes que podrían codificar P5CS y P5CR, que se inducen como respuesta a la sobreexpresión de un gen regulador de la latencia en ciruelo europeo. Podrían de este modo mediar un aumento de la producción de prolina en yema latente. En ese caso, sería de esperar una baja expresión de los genes de síntesis de la prolina en periodos anteriores a la latencia y una subida de su expresión durante la latencia, así como una baja expresión una vez finalizado el proceso de latencia.

Además de factores de tolerancia a los estreses abióticos, se han descrito genes reguladores de la latencia en árboles frutales que también se expresan de modo preferente en yema latente. El mutante *evergrowing* de melocotonero no deja totalmente de crecer durante el invierno, y por tanto no experimenta una endolatenencia completa. Se ha encontrado una delección genómica en este mutante que incluye a cuatro de los seis genes de una familia de factores de transcripción que se encuentran en tándem en una región del cromosoma 1 de melocotonero (Bielenberg *et al.*, 2008). Estos genes pertenecen a la familia MADS-box y son conocidos como *DAM* por sus siglas en inglés, *DORMANCY ASSOCIATED MADS-BOX* (Quesada-Traver, *et al.* 2020).

Hasta la fecha se han descrito marcadores moleculares tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) asociados a la fecha de floración y al requerimiento de frío para la salida de endolatenencia, que incluyen el locus genómico donde se encuentran los genes *DAM* (Chou *et al.*, 2020). Estos marcadores han sido obtenidos a partir de trabajos anteriores (Fan, *et al.* 2010; Romeu, *et al.* 2014; Zhebentyayeva, *et al.* 2014) que usan distintas poblaciones segregantes de melocotonero para identificar *Quantitative Trait Loci* (QTL). Sin embargo, estos marcadores deben ser validados en diferentes colecciones de germoplasma. En este trabajo se validarán algunos de estos marcadores SNP en una colección de germoplasma mantenida por el Dr. Jesús García Brunton en el IMIDA (Murcia), y que incluye cultivares de distinta procedencia y características.

2. OBJETIVOS

1. Comprobar si la prolina se acumula de una forma asociada al proceso de latencia.
2. Medir la expresión de los genes de síntesis de prolina durante el desarrollo de la yema floral.
3. Comprobar marcadores moleculares SNP ya conocidos, asociados a la salida de latencia y la fecha de floración, dentro de una colección de germoplasma de melocotonero.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestras de melocotonero

Los cultivares de melocotonero (*Prunus persica* L. cv. *Crimson Baby* y cv. *Red Candem*) de los que se obtuvieron las muestras de yemas se han cultivado en el *Institut Valencià d'Investigacions Agràries* (IVIA), localizado en Moncada, España, 39°35'20" N, 0°23'43" W y a 75 metros por encima del nivel del mar. Se recolectaron cinco muestras de *Red Candem* (RC1, RC2, RC3, RC4 y RC5) y cinco de *Crimson Baby* (CB1, CB2, CB3, CB4 y CB5) con 3 réplicas biológicas cada una. Por un lado, para la variedad temprana de *Red Candem* se recogieron las muestras el 20 y 30 de noviembre, el 14 y 21 de diciembre y el 4 de enero. Por otro lado, para la variedad media *Crimson Baby* se recolectaron las muestras el 30 de noviembre, el 14 y 21 de diciembre y el 4 y 19 de enero, durante el otoño e invierno de 2015-2016. La salida de endolencia se sitúa entre la segunda y tercera muestra tomada en *Red Candem*, y entre la tercera y la cuarta en *Crimson Baby*. Para la estimación de prolina, de cada muestra se evaluaron tres réplicas con una media de 10 yemas cada una (Tabla 1), que se pesaron en una balanza y se trituraron con nitrógeno líquido. Una vez homogeneizadas se congelaron a -80 °C en tubos hasta el día del protocolo de medición de la prolina.

Para el análisis de marcadores moleculares se utilizaron 110 variedades de melocotonero pertenecientes a una colección de germoplasma del IMIDA, establecida por Jesús García-Brunton en el Jimenado, Región de Murcia, 37°45'31" N, 1°01'35" W, 80 m sobre el nivel del mar.

Tabla 1. Muestras de las variedades Red Candem y Crimson Baby para el ensayo de la cuantificación de prolina

Fecha	N.º yemas	Variedad	Muestra	N.º Réplicas
20.11.15	10	Red Candem	RC1.1, RC1.2 y RC1.3	3
30.11.15	10	Red Candem	RC2.1, RC2.2 y RC2.3	3
14.12.15	10	Red Candem	RC3.1, RC3.2 y RC3.3	3
21.12.15	10	Red Candem	RC4.1, RC4.2 y RC4.3	3
04.01.16	10	Red Candem	RC5.1, RC5.2 y RC5.3	3
30.11.15	10	Crimson Baby	CB1.1, CB1.2 y CB1.3	3
14.12.15	10	Crimson Baby	CB2.1, CB2.2 y CB2.3	3
21.12.15	10	Crimson Baby	CB3.1, CB3.2 y CB3.3	3
04.01.16	10	Crimson Baby	CB4.1, CB4.2 y CB4.3	3
19.01.16	10	Crimson Baby	CB5.1, CB5.2 y CB5.3	3

3.2. Cuantificación de prolina

Para la cuantificación de prolina, en primer lugar, se prepararon los reactivos, ácido sulfosalicílico al 3% (p/v) y ninhidrina. Para el ácido sulfosalicílico se calculó el volumen final necesario teniendo en cuenta aproximadamente 0,7 mL por cada tubo con los blancos y los tubos de las muestras. Después se elaboró el reactivo de ninhidrina. Este reactivo contiene ninhidrina al 4% (p/v), ácido acético glacial en proporción 9:10 y ácido fosfórico hasta enrasar el volumen final.

Tras preparar los reactivos se pesó la muestra y se introdujo en un tubo de 1,5mL al que se añadió 1,5mL de ácido sulfosalicílico al 3% (p/v). Los tubos se agitaron en el vórtex para homogeneizar el contenido y se introdujeron en la centrífuga a 14.000 rpm durante 5 min. Se obtuvo 700 µL de sobrenadante que se transfirió a un tubo de 2 mL. Si se sabe la concentración aproximada de prolina en la muestra este volumen puede ser mayor o menor, pero el volumen final siempre debe ser de 700 µL (si por ejemplo se cogen 200 µL de sobrenadante, se añadiría 500 µL de sulfosalicílico). Las muestras se pueden congelar en este paso si se necesita seguir otro día. Después de completar estos pasos se preparó la curva patrón con el ácido sulfosalicílico con concentraciones crecientes de prolina (Tabla 2).

Se añadió en campana de extracción de gases 600 μL de ácido acético glacial y 700 μL del reactivo de ninhidrina en todas las muestras incluyendo la curva patrón y los blancos que se homogeneizaron en el vórtex. Se calentó en el bloque térmico a 100°C durante 1 hora. Finalmente se midió en el espectrofotómetro a temperatura ambiente a 520 nm.

Tabla 2. Curva patrón prolina. Si se usa bloque térmico realizar hasta el tubo 5 y si se usa un baño hacer todos los tubos. *El ácido acético glacial y la ninhidrina se deben añadir en campana de extracción de gases una vez estén todas las muestras preparadas.

Tubo	μg prolina	μL de ác. sulfosalicílico 3%	μL ác. acét. glacial*	μL ninhidrina*
0	0	700	600	700
1	1	699	600	700
2	5	695	600	700
3	15	685	600	700
4	20	680	600	700
5	30	670	600	700
6	50	650	600	700
7	70	630	600	700

3.3. Análisis de expresión mediante PCR cuantitativa (qPCR)

Se utilizaron muestras de cDNA de las yemas de la Tabla 1 obtenidas previamente en el grupo (Lloret *et al.*, 2017). Los cebadores utilizados en la reacción de qPCR se listan en la Tabla 3. Se empleó una placa de 96 pocillos en el análisis de expresión. Para calcular el número de muestras total se multiplicó las 10 muestras (5 de cada variedad) por 3 réplicas biológicas cada una y por 2 réplicas técnicas por cada réplica biológica y se sumaron las 4 concentraciones crecientes del estándar con 2 réplicas técnicas cada una, es decir, 8 pocillos más. Para cuantificar la expresión de forma relativa se empleó un estándar obtenido a partir de una mezcla de todas las muestras de cDNA, diluido en distintas proporciones (1/5, 1/25, 1/125 y 1/625).

Tabla 3. Cebadores para la expresión de los genes de biosíntesis de la prolina en melocotonero

Nombre del cebador		Secuencia (5'→3')
P5CS1	forward	GGTCCCCCTACTGACCCAAAATCA
	reverse	CAGGGATTCCACCATAAGCTGCACA
P5CS2	forward	TTCAAGAAGGCTTCAGGCCATGACT
	reverse	TAGAGCCAGCCGAGATATCAAGGAT
P5CR	forward	CCCAATTGACAAGGAAGCCTTCAAG
	reverse	CGGGAAAACCTTAATTCCCATGGAT
Gen de referencia actina	forward	CTTCTTACTGAGGCACCCCTGAAT
	reverse	AGCATAGAGGGAGAGAAGCTGCTTG
Gen de referencia SAND	forward	TCGTGGGTACCAGGAAAACGACAT
	reverse	CCTGCTAGCTTGTGTTTCATCTCCA

A continuación, se preparó una mezcla de reacción que contiene los elementos necesarios para la amplificación del DNA:

- El SYBR premix Ex Taq (Tli RNaseH plus) (Takara Bio) contiene la polimerasa, los dNTPs y el tampón para la reacción y será la mitad del volumen total necesario.
- Cebadores: 0,5 μ M , concentración final.
- ROX (es un reactivo fluorescente de referencia, necesario para el análisis)
- H₂O: hasta completar el volumen final.

Se añadieron todos los reactivos en un tubo de 1,5 mL. Después se añadió 13,5 μ L de la mezcla de reacción a cada pocillo de la placa. A continuación, se añadió a cada pocillo 1,5 μ L de cDNA. El diseño de la placa tras añadir todos los reactivos y muestras se esquematiza en la Tabla 4.

El qPCR se realizó en un termociclador *StepOnePlus* (Life Technologies). El programa de la amplificación consistió en una incubación inicial de 10 min a 95°C, seguida de 40 ciclos repetidos de 15s a 95°C y 1 min. a 60°C. La especificidad de la reacción se comprobó mediante la formación de un pico único en la curva de desnaturalización y la estimación del tamaño del amplicón mediante electroforesis. Los genes Actina y SAND se usaron como genes de referencia, tal y como se ha descrito en un trabajo anterior (Lloret *et al.*, 2017). La media geométrica de los dos genes de referencia se empleó para normalizar los valores de expresión.

Tabla 4. Disposición en placa de 96 pocillos de las 5 muestras de Crimson Baby (CB1, CB2, CB3, CB4 y CB5) y de las 5 muestras de Red Candem (RC1, RC2, RC3, RC4 y RC5) y el estándar (ST) de concentración conocida

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CB1						CB2					
	1	1	2	2	3	3	1	1	2	2	3	3
B	CB3						CB4					
	1	1	2	2	3	3	1	1	2	2	3	3
C	CB5											
	1	1	2	2	3	3						
D	RC1						RC2					
	1	1	2	2	3	3	1	1	2	2	3	3
E	RC3						RC4					
	1	1	2	2	3	3	1	1	2	2	3	3
F	RC5											
	1	1	2	2	3	3						
G			ST1	ST1	ST2	ST2	ST3	ST3	ST4	ST4		
H												

3.4. Extracción de DNA genómico de muestras de hojas

Para la extracción de DNA genómico se trituraron dos discos de hoja en tubos de 2 mL con 3-4 esferas de vidrio cada uno en un instrumento *TissueLyser* (Qiagen) y se añadieron 800 µL de tampón CTAB al 2% (p/v) (20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8, 1.42 M NaCl) precalentado a 65°C, al que se añadió 2 µL de mercaptoetanol por cada mililitro. El CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) es un detergente catiónico que en soluciones con alta concentración iónica actúa formando complejos con proteínas y polisacáridos, pero sin precipitar ácidos nucleicos. El EDTA (ácido etilen diaminotetraacético) es un quelante que inhibe la acción de las DNAsas al constituir complejos con cationes metálicos como el Mg²⁺. El Tris-HCl (Tris (hidroximetil) aminometano HCl) presenta la capacidad tamponante de pH. A continuación, la mezcla se agitó cada 10 min a 65°C durante 30 min. Posteriormente se añadió 800 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló. Luego se centrifugó durante 15 min a 4°C y 13.000 rpm. Se añadió 1 volumen de isopropanol y se dejó 1 h a -20°C para la precipitación. Después se volvió a centrifugar 15 min a 4°C y 13.000 rpm. Tras la centrifugación se eliminó el isopropanol y se lavó con 500 µL de Etanol 70%, centrifugando 5 min a 10.000 rpm. Seguidamente se dejó secar el pellet y se añadió 50 µL de TE 1X (10 mM tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) y 1 µL de RNAsa 1%. Se mantuvo en agitación a 37°C durante 1 hora.

Posteriormente se realizó un tratamiento de fenolización en el que se partió de 200 µL de muestra de DNA a la que se añadió 200 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) a pH 8 y se mezcló vigorosamente. A continuación, se centrifugó 10 min a 4°C a 13.000 rpm. Tras sacar la muestra de la centrífuga se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo en el que se añadió y se mezcló 180 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) que se volvió a centrifugar 10 min a 4°C a 13.000 rpm. De nuevo se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se añadió un volumen de acetato amónico 3M y 4 volúmenes de etanol absoluto. Se dejó precipitar a -20°C durante 30 min y se centrifugó 10 min a 4°C a 13.000 rpm. Después se eliminó el sobrenadante y se lavó con 800 µL de etanol 70% el pellet, que se secó y se resuspendió en 50 µL de TE 0,1X (1 mM de tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8).

3.5. Electroforesis en gel de agarosa

Para comprobar la cantidad aproximada y la integridad del DNA genómico después de la extracción, se realizó una electroforesis de agarosa 1,5% en tampón TBE 0,5x (TBE 5X: 54 g/L de tris base 27,5 g/L de ácido bórico 20 ml de 0,5 M EDTA, pH a 8,3 con HCl. Al gel se le añadió 3,75 μ L de *Safe ViewTM Classic (abm Good)*. Se empleó un marcador de fago lambda (25, 50 y 100 ng) para cuantificar el DNA por comparación. A 1 μ L de DNA genómico se le añadió 1 μ L de disolvente de muestras (*Loading Buffer 6X*, 15 mL glicerol puro, 125 mg azul de bromofenol, 10 mL de EDTA 0,5 M pH 8) y 5 μ L de H₂O *MilliQ*. La electroforesis se realizó a 100 V durante 30 min.

3.6. Cuantificación

3.6.1. Nanodrop

Se colocaron 2 μ L de cada muestra en el espectrofotómetro y se anotaron los parámetros de calidad. El índice 230/260 indica la posible contaminación y sus valores óptimos están dentro del rango de 1,8 a 2,2. El índice 260/280 indica la posible contaminación por proteínas y el valor óptimo para DNA es de 1,8.

3.6.2. Qubit

Se preparó una solución de Qubit. Se transfirió 190 μ L de esa solución a 2 tubos y en cada uno se añadió 10 μ L del estándar 1 y 10 μ L estándar 2 del kit respectivamente. Por otro lado, se añadió 198 μ L de la solución + 1 μ L de muestra al resto de tubos. Se agitaron los tubos, se dejaron reposar 2 min y se midió su concentración.

3.7. High Resolution Melting (HRM)

3.7.1. Preparación de los elementos de la qPCR

Para la preparación de los elementos de la qPCR se realizó una mezcla de reacción 2X con fluoróforo Sybr y Polimerasa Taq. Se le añadió MgCl₂ a una concentración final de 2,5 mM.

Se incorporaron los cebadores F y R con una concentración final de 0,25 μ M cada uno (Tabla 5) y los dNTPs a una concentración final de 0,4 mM. A continuación, se agregó agua libre de nucleasas hasta alcanzar el volumen final. Después se adicionó 12 ng de DNA de cada muestra. Por último, se centrifugó la placa cubierta con un plástico adhesivo para evitar la aparición de burbujas.

Tabla 5. Cebadores para el HRM del cromosoma 1 (S1), cromosoma 7 (S712 y S716)

Nombre del cebador		Secuencia (5'→3')
S1	forward	ATTTTGTATCTGCGTGTGGACGGAG
	reverse	CGACTCCAGTTCCTAGATTACCGCA
S712	forward	CGCACAGATTCCAACAGAGCCG
	reverse	GCGACTTTGGTCCACGTTATGCC
S716	forward	GACCGAAGAATATCGACGTTAAGGGTTCTTTG
	reverse	GAGTCTGCTGGTATCTTCTGCATGAACTTT

3.7.2. Programa para el instrumento *LightCycler 480 Real-Time PCR system*

El programa consistió en la desnaturalización de la doble hélice de DNA, seguido de 45 ciclos de amplificación y seguido de una rampa gradual de menor a mayor temperatura para medir la temperatura de desnaturalización de los amplicones, que depende de la presencia del SNP en heterocigosis (Tabla 6). Para distinguir los dos alelos en homocigosis, se repite el HRM habiendo mezclado todas las muestras con un 20% de DNA de una de las variedades que ha resultado homocigota.

Tabla 6. Programa para el instrumento LightCycler 480 Real-Time PCR system

Temperatura	Duración	Velocidad de cambio de Temperatura
Desnaturalización		
95°C	5min.	4,4
Amplificación de 45 ciclos		
95°C	10seg.	4,4
60°C	15seg.	2,2
72°C	15seg.	4,4
Melting		
95°C	1min.	4,4
40°C	1min.	2,2
65°C	1seg.	4,4
95°C	continuous	0,02
40°C	30seg.	2,2

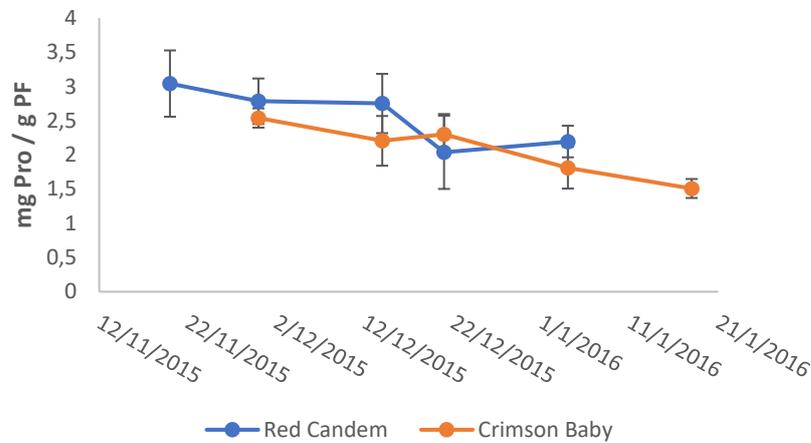
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Papel de la prolina en la tolerancia a estreses abióticos durante la latencia

En la bibliografía hay diversos estudios (Shin *et al.*, 2016; Shang, 2011; Walton *et al.*, 1998) que han demostrado que la prolina tiene un efecto protector en tejidos vegetales frente a estreses abióticos. La latencia invernal es un proceso desencadenado por la planta con el fin de proteger sus tejidos reproductivos y vegetativos de las bajas temperaturas y de la desecación. En la misma línea de investigación, estudios previos del grupo de investigación han identificado posibles genes de síntesis de prolina cuya expresión se encuentra alterada en plantas transgénicas de ciruelo transformadas con el gen *DAM6* de melocotonero (Leida *et al.*, 2012). Por este motivo, es interesante comprobar si la prolina está asociada al proceso de latencia en melocotonero.

En este caso, los resultados esperables si la prolina desempeñara dicho papel en la protección de las yemas en melocotón sería un cambio en la concentración durante la latencia, y además ese cambio se adaptaría a las características particulares de cultivares con distintos requerimientos de frío. En la Figura 2A puede observarse una ligera disminución del contenido en prolina a lo largo de la latencia en yema floral de los dos cultivares estudiados. Esta variación podría en parte ser debida a un aumento del contenido en agua en los últimos estados del desarrollo de la yema, y no sugiere una regulación drástica del contenido de prolina en la yema. Sin embargo, dado que el contenido de prolina en hoja adulta en estos dos cultivares es claramente inferior al de yema (Figura 2B), no puede descartarse que la yema haya desarrollado mecanismos específicos para la acumulación de este aminoácido. El estudio de la expresión de los genes de síntesis de prolina puede aportar evidencias adicionales sobre los mecanismos de regulación de su producción en yema.

A



B

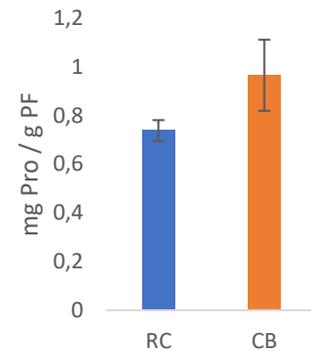


Figura 2. Cantidad de prolina en mg/ g Peso Fresco en yema (A) y en hoja (B) de la variedad Red Candem y Crimson Baby durante la latencia

Los genes de la ruta de biosíntesis de prolina en melocotonero, se conocen gracias a los estudios de similitud de secuencia con los genes identificados en especies modelo. La biosíntesis de prolina empieza con el glutamato, que gracias a la enzima pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS) se convierte en glutamato semialdehído, que espontáneamente forma la pirrolina-5-carboxilato. Posteriormente, la enzima pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CR) da lugar a la molécula de prolina. La enzima P5CS tiene dos isoformas, llamadas P5CS1 y P5CS2 respectivamente.

En la gráfica de la Figura 3 se observa un incremento no significativo de la expresión del gen de la P5CR para la variedad *Red Candem* desde estados previos a la latencia hasta la salida de la latencia de las yemas. Estos cambios son menores en *Crimson Baby*. El máximo de expresión tanto de la variedad temprana como de la variedad media coinciden a mediados de diciembre, lo que significa que la síntesis de prolina no se asocia a etapas específicas de la latencia. El resultado esperado si la prolina estuviese relacionada con la latencia sería una gráfica con dos picos no coincidentes, es decir, un pico de la variedad temprana (RC) anterior al de la variedad media (CB), de tal forma que no coincidieran los dos máximos en la Figura 3. No obstante, estos picos pueden estar asociados a variaciones ambientales como por ejemplo de temperatura o el fotoperiodo.

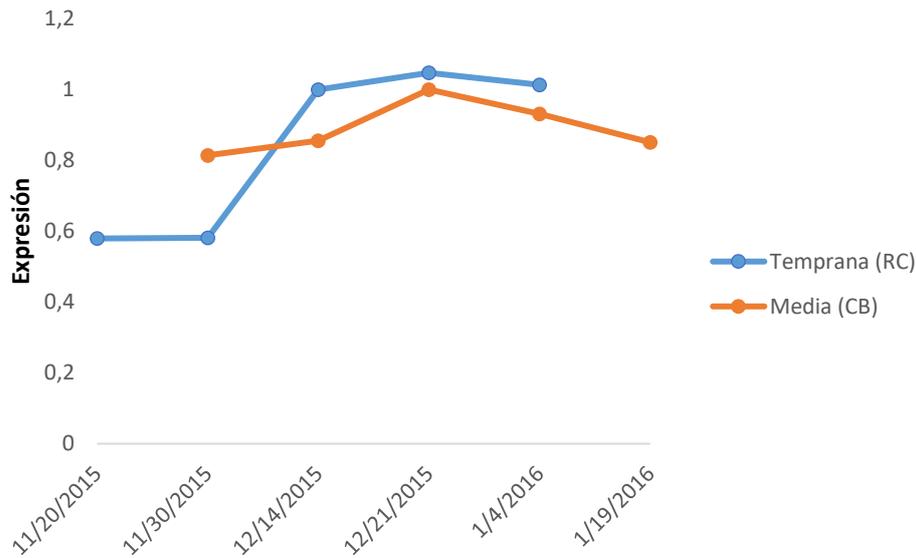


Figura 3. Expresión del gen P5CR en la variedad temprana Red Candem (RC) y en la variedad media Crimson Baby (CB)

En la Figura 4 tampoco se observan variaciones claras en la expresión del gen P5CS1 tanto para la variedad *Red Candem* como para la variedad *Crimson Baby*. Del mismo modo ocurre con la otra isoforma del mismo gen P5CS2 en la Figura 5. En general, los niveles de expresión génica no son coherentes con la ligera disminución de prolina observada, y podemos concluir que esta disminución parece más una consecuencia del aumento del peso fresco durante la salida de latencia. En cualquier caso, pensamos que representar los contenidos de prolina en función del peso fresco es un mejor indicativo de la regulación funcional de este aminoácido, cuyo efecto beneficioso es dependiente en gran parte de su concentración en el medio citoplasmático.

De este modo, los altos niveles de prolina observados indican que puede ejercer una función osmoprotectora en yema latente, aunque no se han encontrado variaciones de expresión en los genes de síntesis que permitan postular la existencia de mecanismos de regulación génica específicos en yema asociados a la latencia, tal y como se ha descrito para el polialcohol sorbitol (Lloret *et al.*, 2017b).



Figura 4. Expresión de la isoforma P5CS1 en las variedades Red Candem (RC) y Crimson Baby (CB) durante la latencia invernal

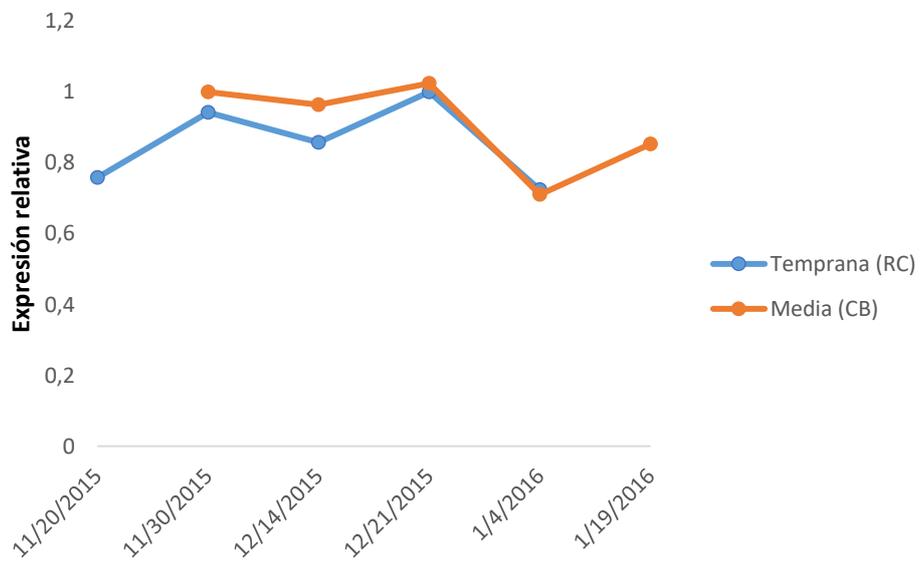


Figura 5. Expresión del gen P5CS2 en las variedades Red Candem y Crimson Baby durante la latencia invernal

4.2. Comprobación de marcadores moleculares SNP asociados a la latencia

En este apartado se validan unos marcadores moleculares descritos anteriormente (Chou *et al.* 2020), basados en los descubrimientos de tres aproximaciones a la latencia y floración de melocotonero mediante QTLs (Fan *et al.*, 2010; Romeu *et al.*, 2014 y Zhebentyayeva *et al.*, 2014) que se encuentran localizados en los cromosomas 1 y 7. Trataremos de averiguar si los distintos alelos de estos SNPs se asocian a características fenotípicas relacionadas con los requerimientos de frío para la salida de latencia y la fecha de floración en una colección de germoplasma de melocotonero.

En primer lugar, se ha realizado la extracción de DNA genómico en 110 variedades distintas procedentes de la colección de germoplasma situada en el IMIDA, en Murcia. Se ha comprobado mediante electroforesis de agarosa la integridad y cantidad del DNA extraído. En la Figura 6 se observan bandas de alto peso molecular en todos los pocillos, lo cual es indicativo de que la extracción ha funcionado correctamente. La intensidad de banda de las muestras es similar a la del marcador lambda 100 que contiene 100 ng de DNA. Finalmente se han tratado las muestras con RNAsa para eliminar el RNA contaminante de la extracción. La fenolización se ha realizado para eliminar la proteína RNAsa utilizada en la extracción. La cuantificación por Nanodrop y Qubit resultó ser buena para la mayoría de las muestras y se eliminaron aquellas que no contenían DNA o su concentración era demasiado baja.

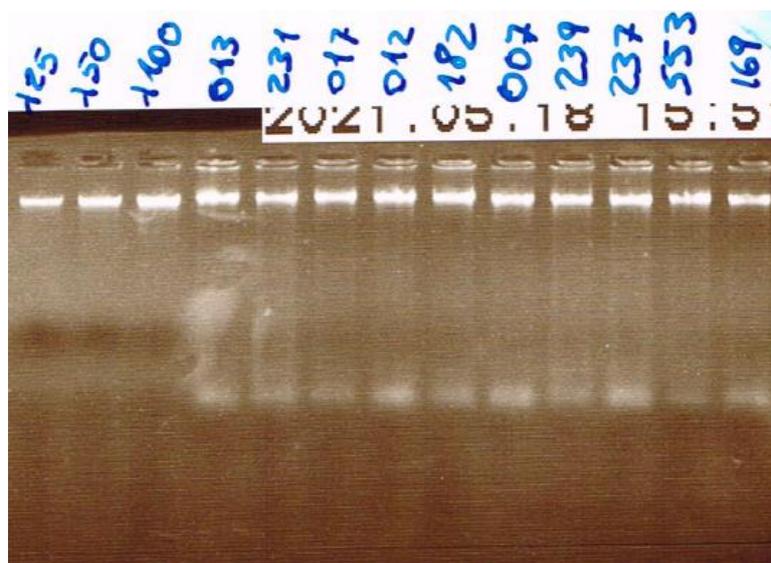


Figura 6. Gel de agarosa 1,5% con los marcadores lambda 25, 50 y 100 ng y 10 muestras para su cuantificación aproximada

En estudios anteriores se ha identificado el mayor QTL relacionado con la latencia en melocotonero en el cromosoma 1, ligado a la posición genómica de los genes *DAM* (Fan *et al.* 2010; Romeu *et al.*, 2014; Zhebentyayeva *et al.*, 2014). Sin embargo, los cebadores S1 utilizados en el experimento *High Resolution Melting (HRM)* no funcionaron adecuadamente, ya que no fue posible identificar sin lugar a duda los posibles genotipos en este *SNP*. Sin embargo, sí fueron útiles dos *SNPs* del cromosoma 7 (S712 y S716) donde también se encuentran regiones asociadas a la latencia y al requerimiento de horas frío. De tal manera que si una muestra contiene una variante del *SNP* se puede tener una idea aproximada de los requerimientos de frío que tiene ese frutal, ya que se trata de un carácter cuantitativo que depende de varios loci. Esto podría permitir seleccionar muy temprano a las distintas variedades. En las Figuras 7 y 8 se muestra un ejemplo gráfico de los resultados del ensayo *HRM*, correspondiente al *SNP* S712. En la Figura 7 se distinguen dos curvas, una curva inferior que corresponde a los heterocigotos de color rojo y una curva superior a los homocigotos de color azul para el *SNP* analizado. El *SNP* del cebador S712 consiste en los homocigotos A y G y el heterocigoto A/G (Chou *et al.*, 2020). Para distinguir si los homocigotos de la Figura 7 eran de tipo A o de tipo G, se introdujo en todos ellos una cantidad de un homocigoto conocido, como fue en este caso la muestra 007 con el genotipo A. En la Figura 8, todos aquellos homocigotos iguales a la muestra 007, es decir, con el genotipo A dieron la señal que se observa de color verde y en cambio los homocigotos del tipo G fueron los que aparecen coloreados en rojo. De esta manera se supo diferenciar los dos tipos de homocigotos entre sí y los heterocigotos se mantuvieron inalterables.

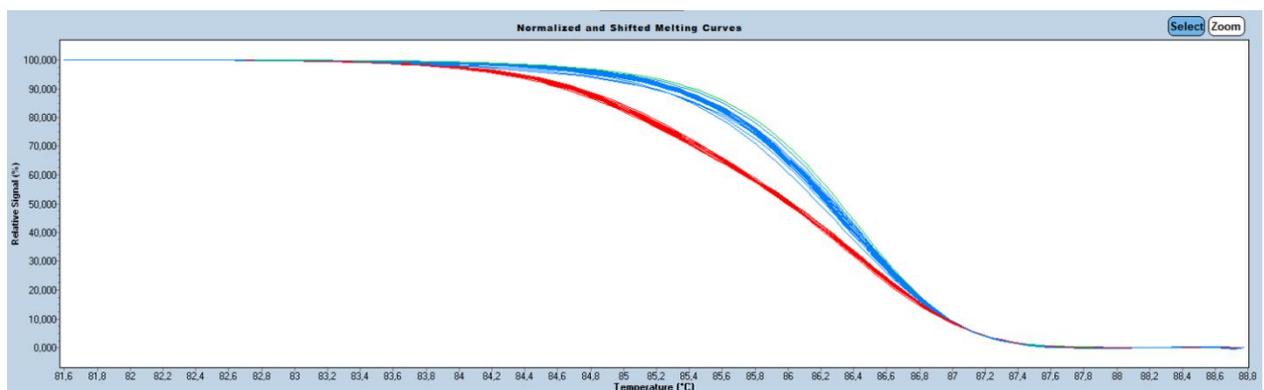


Figura 7. Curva de disociación del DNA de las muestras con el primer S712. El eje de las Y es la señal percibida y el eje de las X es un rango de temperaturas de 81,6°C hasta 88,8°C

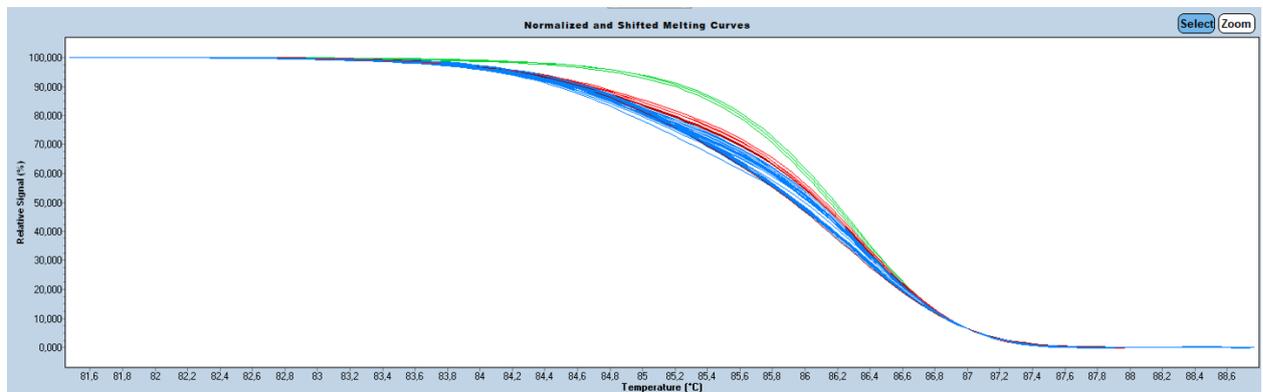


Figura 8. Curva de disociación del DNA de las muestras con el cebador S712 añadiendo el DNA de la muestra homocigota 007. El eje de las Y es la señal percibida y el eje de las X es un rango de temperaturas de 81,6°C hasta 88,8°C

A partir de los datos obtenidos por *HRM* y la validación de los mismos por secuenciación, se pudo genotipar las muestras como queda reflejado en la Tabla 7 para los cebadores S712 y S716.

Tabla 7. Genotipado de la región del cebador S712 y del cebador S716 de la colección de germoplasma analizada de Jesús García-Brunton. Inv 13/14 (BU) hace referencia a las horas de frío de cada variedad (requerimiento de frío).

Muestra	N° de entrada	Nombre	Inv 13/14 (BU)	S712F/R	S716F/R
1	DPRU 240	NJ652163012	1251	G	T
3	DPRU 676	Aguascalientes 6-10	1251	A	T/C
4	DPRU 677	Aguascalientes 12-12	702	A	T/C
5	DPRU 680	Hakuto	1251	A/G	T/C
6	DPRU 716	Nishiki	982	A/G	T
7	DPRU 1177	Muir Peach	1251	A	C
9	DPRU 1470	880291	1201	A	T
10	DPRU 1472	880329	1201	A	T
12	DPRU 2184	Tuskena	1251	A	C
13	DPRU 2230	L. Curl R. Peach	1251	A	T/C
14	DPRU 2448	IC 2090214	1251	G	C
16	PI 536682	Imperan	487	A/G	T/C
17	DPRU 1184	Indian Freestone	1251	A	T

18	DPRU 1187	Chinese Flat	1251	A/G	T
21	DPRU 1661	Cerrito	386	G	C
34	DPRU 2152	Indian Blood Free	1201	A	T
36	DPRU 2231	Sha Zi Zao Sheng	1251	A/G	T
42	DPRU 2496	DPRU 2496	982	G	C
43	DPRU 2497	DPRU 2497	982	A	T
44	DPRU 2498	DPRU 2498	982	A	T
45	DPRU 2499	Jing Yu	1201	A	T
46	DPRU 2537	Hong Chi Zhi	1201	G	C
48	DPRU 2540	IC 20841	1201	G	C
52	DPRU 2650	Fei Cheng Hong Li #6	1201	A/G	T/C
57	DPRU 2655	Qing Zhou Hong	982	A/G	C
63	DPRU 2661	Green Pan Tao	1201	A/G	T/C
66	IVIA 066	Tardina. Italia	1251	A	T/C
67	DPRU 652	De Chang-Hai	1251	A	C
68	DPRU 654	Peregrine	1251	A/G	T/C
70	DPRU 672	Baronesa	702	A	T
72	DPRU 721.1	AR-233	982	G	C
73	DPRU 740	Argentina P. #13	702	A	C
75	Irta 02	Irta 02	963	A/G	T/C
76	Irta 03	Irta 03	249	A	T
83	CITA 083	Dunhuang3. Cita	982	A/G	C
85	CITA 085	Dunhuang5. Cita	982	A	C
86	CITA 086	Pekin6. Cita	1201	A	T
90	CITA 090	Bujhara0. Cita	1201	G	C
91	CITA 091	Sarmankanda. Cita	1201	A/G	T
92	CITA 092	Iran. Cita	1201	G	C
168	DPRU 505	Chinese Cling	982	A	T/C
169	DPRU 517	DPRU 517	386	A	C
170	DPRU 518	DPRU 518	386	A	C
171	DPRU 520	DPRU 520	386	A	C
172	DPRU 533	Chui Lum Tao	982	A	C
173	DPRU 675	Carlos	386	A	C
174	DPRU 679	Hui Hun Tao	982	G	T/C
182	DPRU 2365	Evergreen	230	G	T/C
183	DPRU 2546	Sanguine de Chateauneuf	1201	A/G	C
185	IMIDA 185	Precocinho	386	G	C
186	IMIDA 186	Leonense	702	G	C
187	IMIDA 187	Rio Grandense	702	A/G	T/C
188	IMIDA 188	Dourado	702	A/G	T
189	IMIDA 189	Granada	1000	A/G	T/C
190	IMIDA 190	Turmalina	702	G	T/C
192	IMIDA 192	Maciel	702	G	T/C
194	R4 009 13 07	INRA 01/09	1201	A	T/C

196	R4 077 18 07	INRA 03/09	1201	A/G	T/C
199	R6 057 03 07	INRA 11/09	1201	A	T
201	IMIDA 201	Mutante NRp.	1201	A	C
203	IVIA14/01	Goodwin	982	A/G	T
204	IVIA14/02	Valley GPK	702	G	T/C
205	IVIA14/03	Hess BFO.BAIT-9	702	A	C
210	IVIA14/08	Rizzi	982	A	C
211	US 18-1	Almagreño con picón	1201	A	C
212	US 22-1	Almagreño blanco	1201	A	C
213	US 30-1	Melocotón amarillo	1201	A	C
215	US 49-1	Tardío o Menudillo	1201	A	C
228	VIVAC0019-04	H19/4	702	A	C
229	VIVAC0059-08	H59/8	702	G	C
230	Orero1	HONEY BLUSH	702	A/G	C
231	Imida12/01	MAF	386	G	C
232	Imida12/01	MRF	386	A/G	T
234	Ivia11/01	NIV 30/06 (S. M.)	386	A/G	T
235	PlanasaM10	PLAGOLD 10	982	G	T/C
237	PlanasaM05	PLAWHITE 5	230	G	C
238	Orero2	SUNSNOW	702	A/G	C
239	Orero3	TROPIC BEAUTY	386	G	C
240	Orero4	UF GOLD	386	G	C
241	Imida12/01	WMF	230	G	C
243	PlanasaZ03	ZINCAL 3	230	G	C
244	PlanasaZ08	ZINCAL 8	386	G	C
246	IVIA16/01	Chimarrita	702	A/G	C
249	VIVAC0019-06	H19/6	702	A/G	C
255	VIVAC9602-03	IVAG 11/07	702	G	C
256	VIVAC0304-02	IVAG 11/08	702	A/G	T/C
259	VIVAC0304-09	Ivag 13/08	702	A/G	T/C
502	JU09	Fla 5.2. Flordaprince	386	G	C
507	ARCHMP3	Maruja Porvenir	1005	A/G	T/C
510	CJ15	CASTILLEJAR-15	1201	A	T/C
521	CJ18	CASTILLEJAR-18	1201	A	T
523	CZCB3	Calabacero Candelo	1201	A/G	T/C
524	CZCB5	Calabacero Rincon	1201	A/G	T/C
525	CZJ11	Jeronimo Oro (M89025)	1201	G	T
535	M3188	GF3 MINERVA	702	G	T
538	GGAA03	Agostana;Planet	1201	A/G	T/C
553	JU15	Fla 5-8	230	G	C

560	JU02	Mirollo 1. Ismael	386	G	T
562	JU04	Amarillo del hierro	702	G	C
563	JU05	Amarillo Valsequillo	702	G	C
564	JU06	Mirollo Criollo	386	G	T
566	JU08	Ramblero grande.Tenerife	702	G	T
572	M00120	Isso Hondon P	1201	A/G	T/C
590	MOCP6	Campillo Rocho	1201	A/G	T/C
591	MOE1	Enrique (M89024)	1201	G	T
22					
DPRU 1665	DPRU 1665	Premier	386	A/G	C
R02	R02	Venus	1201	A	C
R06	R06	Rayón	487	G	C

Finalmente se realizó un análisis estadístico para determinar si los *SNPs* observados en la región de latencia están o no asociados a los parámetros de latencia de las distintas variedades de la colección. Debido a que las muestras no siguen una distribución normal, se ha procedido al análisis no paramétrico de comparación de muestras *Kruskal-Wallis*. Los resultados confirmaron que las poblaciones de los dos tipos de homocigotos y del heterocigoto para cada *SNP* son distintas, es decir hay diferencias entre ellas (tabla 8 y 9). Dicho de otra manera, la presencia de un *SNP* identifica variedades con distintos comportamientos de latencia. Para saber si esas diferencias son significativas se realizó una comparación múltiple *Steel-Dwass-Critchlow-Fligner* / Prueba bilateral. El resultado fue que para el cebador S712 se encontraron diferencias significativas en las plantas con el *SNP* G respecto a las plantas con el *SNP* A (Tabla 8). Estos resultados coinciden con los de Chou *et al.* (2020), por lo que la presencia del alelo G significa un menor requerimiento de horas frío, es decir, el frutal florece antes que si tuviese el alelo A. Por otro lado el cebador S716 solo mostró diferencias significativas entre el alelo C y el alelo heterocigoto T/C y, aunque se observa una media claramente menor en el alelo C lo que se asocia a menos horas frío respecto al alelo T, esta diferencia no resultó ser significativa (Tabla 9).

Tabla 8. Diferencia significativa entre las muestras con el genotipo G respecto del genotipo A para el cebador S712

Muestra	Frecuencia	Suma de rangos	Media de rangos	Grupos	
G	37	1435,000	38,784	A	
A/G	33	1960,000	59,394		B
A	38	2491,000	65,553		B

valores-p	A	A/G	G
A	1	0,564	0,001
A/G	0,564	1	0,008
G	0,001	0,008	1

Tabla 9. Diferencia significativa entre las muestras con el genotipo T/C y el genotipo C para el cebador S716

Muestra	Frecuencia	Suma de rangos	Media de rangos	Grupos	
C	51	2346,000	46,000	A	
T	28	1744,500	62,304	A	B
T/C	31	2014,500	64,984		B

valores-p	C	T	T/C
C	1	0,082	0,018
T	0,082	1	0,974
T/C	0,018	0,974	1

5. CONCLUSIONES

En primer lugar, se observa una ligera disminución del contenido en prolina a lo largo de la progresión de la latencia, que podría deberse a una mayor cantidad de agua al iniciarse el crecimiento en yemas que han salido de la latencia. Las yemas contienen unos valores de prolina superiores a las hojas, lo cual es compatible con una posible función de este soluto en la protección de las yemas frente a los estreses abióticos.

En segundo lugar, los genes de síntesis de la prolina estudiados no muestran una diferencia clara de expresión a lo largo de la latencia, por lo cual no parecen darse mecanismos de regulación transcripcional de la producción de prolina concertados con el proceso de latencia.

Finalmente se han validado marcadores moleculares de tipo *SNP* asociados a la latencia dentro de la colección de germoplasma del IMIDA. Concretamente, el alelo G del *SNP* S712 y el alelo C del *SNP* S716 se asocian a un menor requerimiento de horas frío.

6. BIBLIOGRAFÍA

Bielenberg, D. G. *et al.* (2008). Sequencing and annotation of the evergrowing locus in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] reveals a cluster of six MADS-box transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation. *Tree Genetics & Genomes*, 4(3), 495-507.

Chou, L. *et al.* (2020). A High Resolution Melting Analysis-Based Genotyping Toolkit for the Peach (*Prunus persica*) Chilling Requirement. *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 1543.

Chouard, P. (1960). Vernalization and its relations to dormancy. *Annu Rev Plant Physiol.*, 11, 191–238.

Fan, S. *et al.* (2010). Mapping quantitative trait loci associated with chilling requirement, heat requirement and bloom date in peach (*Prunus persica*). *New Phytol.*, 185, 917-930.

Fennell, A. (2014). Genomics and functional genomics of winter low temperature tolerance in temperate 12 fruit crops. *Crit Rev Plant Sci.*, 33, 125–140.

Leida, C. *et al.* (2012). Histone modifications and expression of DAM6 gene in peach are modulated during bud dormancy release in a cultivar-dependent manner. *New Phytol.*, 193, 67–80.

Lloret, A. *et al.* (2018). Modulation of Dormancy and Growth Responses in Reproductive Buds of Temperate Trees. *Front. Plant Sci.*, 9, 1368.

Lloret, A., *et al.* (2017a). Dual regulation of water retention and cell growth by a stress-associated protein (SAP) gene in *Prunus*. *Sci. Rep.*, 7, 332.

Lloret, A. *et al.* (2017b). Chromatin-associated regulation of sorbitol synthesis in flower buds of peach. *Plant Molecular Biology*, 1-11.

Pinto, M. *et al.* (2016). Fisiología de la latencia de las yemas de vid: hipótesis actuales. *Universidad de Chile*, 34(4), 13-22.

Quesada-Traver, C. *et al.* (2020). Structure and Expression of Bud Dormancy-Associated MADS-Box Genes (DAM) in European Plum. *Front. Plant Sci.*, 11, 1288.

Ríos, G. *et al.* (2016). Fenología de frutales y adaptación a climas cambiantes. *Agrícola Vergel*, 241-243.

Romeu J.F., *et al.* (2014). Quantitative trait loci affecting reproductive phenology in peach. *BMC Plant Biology*, 14, 52.

Shin, H. *et al.* (2016). Proline accumulation in response to high temperature in winter-acclimated shoots of *Prunus persica*: A response associated with growth resumption or heat stress? *Can. J. Plant Sci.*, 96, 630–638.

Shang, H. (2011). Effect of Exogenous γ -Aminobutyric Acid Treatment on Proline Accumulation and Chilling Injury in Peach Fruit after Long-Term Cold Storage. *Agric. Food Chem.* 59, 1264–1268.

Trotel, P. *et al.* (1996). The fate of osmo-accumulated proline in leaf discs of Rape (*Brassica napus* L.) incubated in a medium of low osmolarity. *Plant Sci.*, 118, 31–45.

Walton, E. F. *et al.* (1998). Regulation of proline biosynthesis in kiwifruit buds with and without hydrogen cyanamide treatment. *Physiologia Plantarum*, 102, 171-178.

Zhebentyayeva, T. N. *et al.* (2014). Dissection of chilling requirement and Bloom date QTLs in peach using a whole genome sequencing of sibling trees from an F2 mapping population. *Tree Genet. Genoms*, 10, 35-51.