

(S4-O183)

ANÁLISIS GENÓMICO DE LOS DAÑOS POR FRÍO EN TOMATE MICROTOM

JULIA WEISS, JUAN P. FERNÁNDEZ-TRUJILLO, PERLA GÓMEZ DI MARCO, M. ÁNGELES FERRER-AYALA, ANTONIO CALDERÓN-GARCÍA, FRANCISCO ARTÉS-CALERO y MARCOS EGEEA-CORTINES

Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, P. Alfonso XIII 48
30203 Cartagena, España. Tel. +54 968 32 5705 – Fax: +54 968 32 5433

Palabras clave: genómica funcional, genotecas normalizadas, *LecBF1*

RESUMEN

La respuesta al frío en las plantas se ha identificado como un proceso de aclimatación que requiere la activación y represión de genes que permiten una mejor supervivencia. Dicha respuesta se produce en tiempos cortos o muy cortos de veinte a treinta minutos, lo que implica que los sensores de frío se encuentran presentes en las células vegetales responsables de la respuesta. Durante el proceso de comercialización, muchas frutas y hortalizas se almacenan en cámaras frigoríficas que reducen la velocidad de maduración o senescencia, pero que provocan en algunos casos daños por frío. Hemos utilizado el fruto de tomate de la variedad Micro Tom para llevar a cabo un cribado exhaustivo de genes activados y reprimidos por el frío. Sorprendentemente, ninguno de los genes que aparecieron en el cribado han sido identificados como genes de respuesta al frío o de maduración lo que sugiere que los daños por frío se deben a una disrupción de la maquinaria de mantenimiento celular. El gen *LeCBF1* es un factor de transcripción que activa una de las rutas de aclimatación al frío. Dicho gen es activado por frío en hojas de tomate, pero no fue activado por el frío en frutos, lo que sugiere que la enorme sensibilidad de los frutos de tomate al frío puede deberse a una falta de respuesta a dicho estrés abiótico.

GENOMIC ANALYSIS OF CHILLING INJURY IN MICROTOM FRUITS

Keywords: functional genomics, normalized cDNA libraries, *LeCBF1*

ABSTRACT

Cold sensing in plants has been described as an acclimation process that requires activation and repression of several sets of genes that improve plant survival. This response happens in short or very short periods between twenty and thirty minutes, suggesting that cold sensors are present in plant cells responsible of cold sensing and responses. During shipping and marketing, many fruits and vegetables are stored in cold chambers in order to reduce ripening or senescence speed, causing in some cases the so called chilling injury syndrome. We have used tomato fruits of the Microtom cultivar in order to perform an exhaustive screen for genes activated and repressed by the cold. Surprisingly none of the genes that appeared in the screen had been previously identified as cold-response or ripening genes

suggesting that chilling injuries are due to a disruption of the house-keeping cellular system. The LeCBF1 gene is a transcription factor that activates one of the cold acclimation pathways. Gene expression analysis showed that cold treatment activated LeCBF1 in leaves but not in fruits suggesting that the extreme sensitivity of tomato fruits to cold are due to a lack of response to this abiotic stress.

La respuesta al frío en plantas es un proceso rápido de aclimatación

El frío es un estrés abiótico con que se encuentran las plantas desde su germinación. Juega un papel en la germinación y floración como señal, lo que implica que existen sensores y sistemas de respuesta en los tejidos vegetales. Estudios iniciales desarrollados en *Arabidopsis* han mostrado que dicha respuesta es rápida con tiempos de veinte minutos a media hora Thomashow (1999). La respuesta al frío se produce a través de varios factores de transcripción entre los que está la familia CBF Stockinger et al., (1997), que en tomate se compone de al menos tres genes (Zhang et al., 2004). La respuesta al frío provoca un ajuste general de los programas de desarrollo incluyendo genes, proteínas y metabolismo (Cook et al., 2004; Seki et al., 2001; Seki et al., 2002).

La maduración del tomate es una batería de programas genéticos paralelos

La maduración del tomate, un fruto climatérico, se puede definir desde el punto de vista genético como la activación de una serie de programas paralelos de desarrollo que incluyen la diferenciación de cromoplastos (Ronen et al., 2000), producción de azúcares, degradación de ácidos orgánicos y de paredes celulares (Giovannoni, 2004). El paralelismo de los programas genéticos significa que puede aumentar o disminuir un proceso de forma independiente o casi independiente de otros. Por ejemplo, puede modificar la cantidad de flavonoides en la planta sin que esto afecte a la firmeza o los azúcares (Muir et al., 2001).

Análisis genómico de daños por frío en tomate Microtom

Con el objeto de dilucidar los mecanismos que provocan los daños por frío hemos llevado a cabo un sondeo diferencial de genes activados y reprimidos por frío utilizando el tomate Micro Tom. Se aplicaron tratamientos de frío a tiempos más cortos de lo que suele hacerse en el ámbito de la postcosecha, es decir a 6, 24 y 48 horas, con el objeto de identificar qué genes modifican su expresión de forma temprana. Hemos producido dos genotecas substraídas correspondientes a genes activados y reprimidos por el frío. La comparación de dichos genes con genes descritos como genes específicos de maduración (Alba et al., 2004; Alba et al., 2005), no ha permitido identificar un solo candidato, pero tampoco se identificaron genes *bona fide* involucrados en respuesta al frío. A la vista de los resultados obtenidos, la interpretación que se hace es que los daños por frío consisten en una disrupción de procesos celulares básicos que dan como resultado una ralentización aparente de los procesos de maduración. Esta hipótesis emergente se ha podido corroborar de dos formas diferentes, una por análisis de expresión génica y otro proteómico.

El fruto de tomate no es capaz de producir una respuesta de defensa al frío

La respuesta al frío se caracteriza por la activación de enzimas antioxidantes, o la activación de los factores de transcripción de respuesta como LeCBF1. Un análisis cuantitativo de la expresión génica de LeCBF1 mostró que en frutos de Micro Tom este factor no se activa como consecuencia de un tratamiento por frío mientras que en hojas sí, tan y como había sido descrito anteriormente (Zhang et al., 2004). La variedad Micro Tom tiene al menos tres mutaciones en el fondo genético involucradas en desarrollo (Marti et al., 2006). Con el objeto de verificar que los datos obtenidos con LeCBF1 no se debían a interacciones

entre dichas mutaciones y LeCBF1 o la respuesta al frío, hemos repetido los experimentos en un cultivar normal obteniendo resultados similares.

El estudio de enzimas involucrados en la respuesta a estrés oxidativo, no han permitido rechazar la hipótesis planteada ya que no se ha podido encontrar un aumento de la actividad superóxido dismutasa tal y como cabría esperar en situaciones de estrés por frío.

BIBLIOGRAFÍA

- Alba, R.; Fei, Z.J.; Payton, P.; Liu, Y.; Moore, S.L.; Debbie, P.; Cohn, J.; D'Ascenzo, M.; Gordon, J.S.; Rose, J.K.C.; Martin, G.; Tanksley, S.D.; Bouzayen, M.; Jahn, M.M.Giovannoni, J. 2004. ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. *Plant Journal*. 39(5): 697-714.
- Alba, R.; Payton, P.; Fei, Z.J.; McQuinn, R.; Debbie, P.; Martin, G.B.; Tanksley, S.D.Giovannoni, J.J. 2005. Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *Plant Cell*. 17(11): 2954-2965.
- Cook, D.; Fowler, S.; Fiehn, O.Thomashow, M.F. 2004. A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(42): 15243-15248.
- Giovannoni, J.J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*. 16(S170-S180).
- Marti, E.; Gisbert, C.; Bishop, G.J.; Dixon, M.S.Garcia-Martinez, J.L. 2006. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *J Exp Bot*. 57(9): 2037-47.
- Muir, S.R.; Collins, G.J.; Robinson, S.; Hughes, S.; Bovy, A.; De Vos, C.H.R.; van Tunen, A.J.Verhoeven, M.E. 2001. Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. *Nature Biotechnology*. 19(5): 470-474.
- Ronen, G.; Carmel-Goren, L.; Zamir, D.Hirschberg, J. 2000. An alternative pathway to beta-carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(20): 11102-11107.
- Seki, M.; Narusaka, M.; Abe, H.; Kasuga, M.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Carninci, P.; Hayashizaki, Y.Shinozaki, K. 2001. Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell*. 13(1): 61-72.
- Seki, M.; Narusaka, M.; Ishida, J.; Nanjo, T.; Fujita, M.; Oono, Y.; Kamiya, A.; Nakajima, M.; Enju, A.; Sakurai, T.; Satou, M.; Akiyama, K.; Taji, T.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Carninci, P.; Kawai, J.; Hayashizaki, Y.Shinozaki, K. 2002. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J*. 31(3): 279-292.
- Stockinger, E.J.; Gilmour, S.J.Thomashow, M.F. 1997. Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94(3): 1035-1040.

- Thomashow, M.F. 1999. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50(571-599).
- Zhang, X.; Fowler, S.G.; Cheng, H.M.; Lou, Y.G.; Rhee, S.Y.; Stockinger, E.J. Thomashow, M.F. 2004. Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 39(6): 905-919.