

ÍNDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE GENERAL	iv
ABREVIACIONES	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
INDICE DE TABLAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	
I.1 Presentación del sistema estudiado, la vid: Sistemática y domesticación	2
I.2 El Carménère como cultivar emblemático en la vitivinicultura de Chile.	3
I.3 Aspectos fisiológicos generales de la vid	4
I.3.1 Fase juvenil	4
I.3.2 Fase adulta	5
I.3.2.1 Dormancia o reposo invernal	6
I.3.2.2 Ciclo reproductivo	7
I.3.2.2.1 Inducción y diferenciación floral	7
I.3.2.2.2 La formación de los zarcillos	9
I.3.2.2.3 Polinización, fecundación y fructificación	10
I.3.2.2.4 Desarrollo frutal de la vid	11
I.4 Problemática abordada en esta tesis	12
I.5 Regulación hormonal en vides	13
I.6. Las poliaminas como reguladores del crecimiento	15
I.6.1 Biosíntesis de poliaminas	18
I.6.2 Catabolismo de poliaminas	20
I.8 Hipótesis de trabajo y Objetivos	23

II MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 MATERIALES

II.1.1 Colección del material vegetal en el viñedo	25
II.1.2 Oligonucleótidos partidores utilizados en esta tesis.	26

II.2 MÉTODOS

II.2.1 Extracción RNA total y síntesis de cDNA	27
II.2.2 Análisis de macroarreglo.	27
II.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y clonamiento de los fragmentos de PCR en el vector p-GEM T	28
II.2.4: Secuenciación y análisis de las secuencias	29
II.2.5: Búsqueda de secuencias y análisis <i>in silico</i>	29
II.2.6: PCR cuantitativa en tiempo real	30
II.2.7 Análisis estadístico	30
II.2.8 Análisis de poliaminas	30

III. RESULTADOS

III.1 Estudio <i>in silico</i> de las características estructurales de genes y proteínas involucrados en el metabolismo de poliaminas en <i>Vitis vinifera</i> .	33
III.1.1 Identificación de secuencias codificantes para arginina descarboxilasa (<i>ADC</i>) en el genoma de la vid.	33
III.1.2 Identificación de secuencias codificantes para arginasa (<i>ARGI</i>) en el genoma de la vid.	37
III.1.3 Identificación de secuencias codificantes para S-adenosil-metionina descarboxilasa (<i>SAMDC</i>) en el genoma de vid.	40
III.1.4 Identificación de secuencias codificantes para aminopropil transferasas en el genoma de vid.	44
III.1.5 Identificación de genes para poliamina-oxidasa (<i>PAO</i>) en el genoma de vid	48
III.2. Estudio de los patrones de expresión de los genes asociados al metabolismo de poliaminas y síntesis de etileno durante el desarrollo reproductivo en <i>Vitis vinifera</i> cv. Carménère	55

III.2.1	Perfiles transcripcionales durante la primera fase del desarrollo reproductivo.	55
	Inducción floral.	
	A- El gen involucrado en la síntesis de Put, <i>VvADC</i> , aumenta durante la inducción floral.	55
	B- Los genes que codifican para SAM descarboxilasa se expresan diferencialmente durante la inducción floral.	57
	C- Los genes para aminopropil transferasas <i>VvSPDS1</i> y <i>VvACL5-5</i> se acumulan durante la inducción floral.	59
	D- En las yemas, los genes PAO putativos muestran perfiles de expresión opuestos.	59
	E- <i>VvACO</i> se inducen durante la inducción floral y <i>VvACS</i> durante la salida de dormancia.	62
III.2.2.	Perfiles transcripcionales durante la segunda fase del desarrollo reproductivo.	64
	Desarrollo floral y frutal.	
	A- <i>VvADC</i> y <i>VvARGI</i> se expresan diferencialmente durante el desarrollo de flor y fruto.	64
	B- Los tres genes <i>SAMDC</i> se expresan durante el desarrollo de las bayas, pero cada uno con un patrón de variación particular.	65
	C- Los genes <i>VvSPDS1</i> y <i>VvACL5-5</i> presentan patrones de expresión opuestos entre los estadios LC y flor.	65
	D- Dos genes <i>VvPAO</i> muestran patrones de expresión muy diferentes entre los órganos reproductivos.	68
	E- La expresión de <i>VvACS</i> no se modifica a lo largo del desarrollo normal de las bayas, los dos <i>VvACO</i> putativos si lo hacen.	68
III. 3	Estudio de los perfiles de expresión de los genes involucrados en el metabolismo de poliaminas y etileno en bayas normales y bayas partenocárpicas de <i>V. vinifera</i> cv. Carménère	70
III. 3.1	Análisis global de la expresión génica diferencial en bayas partenocárpicas respecto de bayas semilladas	70
	A- Identificación de genes regulados diferencialmente mediante el análisis de un macroarreglo de bayas partenocárpicas vs. bayas semilladas en etapa I del crecimiento.	70

B- Metabolismo de Poliaminas y contenido de poliaminas	76
C- Señalización mediada por etileno.	78
III.3.2 Expresión de genes involucrados en el metabolismo de poliaminas y etileno determinados mediante qPCR tiempo real.	79
A- Expresión de genes involucrados en la síntesis de Put	79
B- S-adenosil metionina descarboxilasa	81
C- Expresión de genes asociados a la síntesis de poliaminas Spd y Spm:	83
D- Genes involucrados en el catabolismo de poliaminas <i>VvPAOs</i> .	85
E- Genes involucrados en la síntesis de etileno	87
IV. DISCUSIÓN	89
IV.1 En el genoma de la vid, las enzimas del metabolismo de poliaminas son (en general) codificadas por familias génicas.	90
IV.2 Genes involucrados en la síntesis de poliaminas y de etileno se encuentran transcripcionalmente activos durante la inducción floral en vid (cv. Carménère).	93
IV.3. La inducción de <i>VvACS</i> y <i>VvPAO</i> en la salida de la dormancia concuerda con el estrés oxidativo que ocurre en las yemas durante esta transición.	95
IV.4. Durante el desarrollo floral-frutal de vid los genes codificantes del metabolismo de PAs se encuentran regulados de acuerdo al tejido y etapa del desarrollo.	96
IV. 5 Los genes de poliaminas jugarían un rol durante la transición flor-fruto lo que se pone de manifiesto en la ocurrencia de la partenocarpia	97
IV.5.A El análisis transcriptómico global en bayas de vid indica alteraciones del metabolismo de poliaminas y etileno en bayas partenocárpicas de Carménère.	97
IV.5.B El análisis transcripcional mediante qRT-PCR: Las modificaciones transcripcionales del metabolismo de poliaminas y etileno respecto de la partenocarpia ocurren en Carménère y Merlot.	100
V. CONCLUSIONES	104
VI. BIBLIOGRAFÍA	105

ABREVIACIONES

ABA	ácido abscísico
ACC	Acido aminociclopropano-1-carboxílico
ACS	ACC sintetasa
ACO	ACC oxidasa
ADC	Arginina descarboxilasa
ARGI	Arginasa
Cs	Cabernet Sauvignon
Cm	Carménère
DAO	Diaminooxidasa
Dap	diaminopropano
DEGECHIVID	Proyecto Chileno de Desarrollo de la Genómica Funcional en Vid
dcSAM	SAM descarboxilado
DFMO	di fluoro metil ornitina
GAs	Giberilinas
HTD	1,7 diaminoheptano
MET	Metionina
Mt	Merlot
MGBG	(metilglioxal-bis (guanil hidrazona)),
ODC	Ornitina descarboxilasa
PAs	Poliaminas
PAO	Poliaminooxidasa
PCA	ácido perclórico
PNC	Primordio no comprometido
Put	Putrescina
SAM	S-adenosilmetinonina
SAMDC	SAM desacarboxilasa
SAMS	SAM sintetasa
Spd	Espermidina
SPDS	Espermidina sintetasa
Spm	Espermina
SPMS	Espermina sintetasa
SAMDC	SAM descarboxilasa
PAO	poliamina oxidasa

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Desarrollo fenológico de yemas y de sus estructuras reproductivas en una planta de vid adulta	9
Figura 2: Racimos con <i>millerandage</i> .	13
Figura 3: Vía biosintética de poliaminas y etileno en plantas	20
Figura 4: Comparación de la secuencia aminoacídica deducida de ADC de diferentes especies vegetales	35
Figura 5: Árbol filogenético las ADC especies vegetales	36
Figura 6: Comparación de ARG1 de diferentes especies vegetales	38
Figura 7: Árbol filogenético de arginasa de especies vegetales	39
Figura 8: Comparación de la secuencia aminoacídica de SAMDC de diferentes especies vegetales.	42
Figura 9: Análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas deducidas para SAMDC de plantas	43
Figura 10: Comparación de la secuencia aminoacídica deducida de Aminopropil transferasas <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Vitis vinifera</i> .	46
Figura 11: Árbol filogenético para aminopropil transferasas de plantas	47
Figura 12: Alineamiento de la secuencia aminoacídica de amino oxidasas dependientes de FAD de plantas	51
Figura 13: Árbol filogenético de PAOs de plantas	52
Figura 14: Alineamiento de la secuencia aminoacídica de proteínas de la familia de las lisina desmetilasa PAO tipo III.	54
Figura 15: Análisis de la expresión de los genes <i>VvADC</i> , <i>VvARG1</i> durante el desarrollo de las yemas de vid.	56
Figura 16: Análisis de la expresión de los genes <i>VvSAMDC1</i> , <i>VvSAMDC2</i> y <i>VvSAMDC4</i> codificantes de SAM descarboxilasa a lo largo del desarrollo de las yemas de vid.	58
Figura 17: Análisis de la expresión de los genes <i>VvSPDS1</i> , <i>VvSPMS</i> y <i>VvACL5-5</i> a lo largo del desarrollo de las yemas de vid.	60
Figura 18: Análisis de la expresión de los genes <i>VvPAO1</i> y <i>VvPAO5</i> a lo largo del desarrollo de las yemas de vid.	61

Figura 19: Análisis de la expresión de los genes <i>VvACS</i> , <i>VvACO6</i> y <i>VvACO7</i> a lo largo del desarrollo de las yemas de vid.	63
Figura 20: Niveles de expresión de <i>VvADC</i> y <i>VvARG1</i> a lo largo del desarrollo floral y frutal de vid mediante qRT-PCR.	64
Figura 21: Niveles de la expresión de los genes <i>VvSAMDC1</i> , <i>VvSAMDC2</i> y <i>VvSAMDC4</i> a lo largo del desarrollo floral y frutal de vid mediante qRT-PCR.	66
Figura 22: Análisis de la expresión de los genes <i>VvSPDS1</i> , <i>VvSPMS</i> y <i>VvACL5-5</i> a lo largo del desarrollo floral y frutal de vid mediante qRT-PCR.	67
Figura 23: Análisis de la expresión de los genes <i>VvPAO1</i> y <i>VvPAO5</i> a lo largo del desarrollo floral y frutal de vid mediante qRT-PCR.	68
Figura 24: Análisis de la expresión de los genes <i>VvACO6</i> , <i>VvACO7</i> y <i>VvACS</i> a lo largo del desarrollo floral y frutal de vid mediante qRT-PCR.	69
Figura 25: Distribución de los datos respecto de la tasa de cambio y la significancia estadística	71
Figura 26: Categorización funcional de genes inducidos y reprimidos en las bayas partenocárpicas	72
Figura 27: Tasa de cambio de la expresión de genes del metabolismo de poliaminas en bayas partenocárpicas respecto de bayas semilladas en estadio I	76
Figura 28: Contenido de Poliaminas libres	77
Figura 29: Tasa de cambio de la expresión de genes de la vía del etileno en bayas partenocárpicas respecto de bayas semilladas en estadio I	78
Figura 30: Análisis de la expresión de genes involucrados en la síntesis de Put en relación a la ocurrencia de partenocarpia en <i>Vitis vinifera</i> .	80
Figura 31: Análisis de la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en la descarboxilación de SAM en relación a la ocurrencia de partenocarpia en <i>Vitis vinifera</i> .	82
Figura 32: Análisis de la expresión de genes involucrados en la síntesis de Spd en relación a la ocurrencia de partenocarpia en <i>Vitis vinifera</i> .	84
Figura 33: Análisis de la expresión de genes que codifican poliamina oxidasa en relación a la ocurrencia de partenocarpia en <i>Vitis vinifera</i> .	86
Figura 34: Análisis de la expresión de genes que codifican poliamina oxidasa en relación a la ocurrencia de partenocarpia en <i>Vitis vinifera</i> .	88

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Secuencias nucleotídicas de los partidores utilizados en esta tesis	26
Tabla 2: Relación de tiempo y fase para la separación de poliaminas	31
Tabla 3: Detalle de cada una de las secuencias <i>SAMDC</i>	40
Tabla 4: Detalle de los 30 genes con mayor nivel de inducción en bayas partenocárpicas respecto de las bayas semilladas	74
Tabla 5: Detalle de los 30 genes con mayor nivel de represión en bayas partenocárpicas respecto de las bayas semilladas	75
Tabla 6: Detalle de los EST del metabolismo de poliaminas.	76