



UNIVERSIDAD DE TALCA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA VEGETAL Y BIOTECNOLOGÍA

**Análisis transcripcional de los genes asociados al
metabolismo de poliaminas durante el desarrollo
reproductivo de *Vitis vinifera* var. Carménère.**

Nuri Elena Cabrera Gonzalez

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS MENCIÓN INGENIERÍA
GENÉTICA VEGETAL

DIRECTOR DE TESIS:
PROFESOR DR. ENRIQUE GONZALEZ VILLANUEVA

Talca, Chile 2017

**AUTORIZACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN
DE MEMORIAS DE PREGRADO Y TESIS DE POSTGRADO**

Yo, **Nuri Elena Cabrera González**, cédula de Identidad N° 21.141.756-0, autor de la memoria o tesis que se señala a continuación, **SI** autorizo a la Universidad de Talca para publicar en forma total o parcial, tanto en formato papel y/o electrónico, copias de mi trabajo¹.

Esta autorización se otorga en el marco de la Ley N° 20.435 que modifica la Ley N° 17.336 sobre Propiedad Intelectual, con carácter gratuito y no exclusivo para la Universidad.

Título de la memoria o tesis:	Análisis transcripcional de los genes asociados al metabolismo de poliaminas durante el desarrollo reproductivo de <i>Vitis vinifera</i> var. Carménère.
Unidad Académica:	Instituto de Ciencias Biológicas
Carrera o Programa:	DOCTORADO EN CIENCIAS MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL
Título y/o Grado al que se opta:	DOCTORADO EN CIENCIAS MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL
Nota de Calificación:	6,2

Timbre

Firma del Estudiante:	
Rut:	21.141.756-0
Fecha:	8/ 05 /2018

¹ En el párrafo debe escribir su nombre completo en negrita y omitir la palabra que corresponda SI o No, de acuerdo a su preferencia.

**Análisis transcripcional del metabolismo de poliaminas durante
el desarrollo reproductivo de *Vitis vinifera* cv. Carménère.**

**Transcriptional analysis of genes related polyamine methabolism
troughout *Vitis vinifera* cv. Carménère reproductive
development.**

Nuri Elena Cabrera Gonzalez

Director de tesis:

Profesor Dr. Enrique Gonzalez Villanueva

Universidad de Talca, Instituto de Ciencias Biológicas

2 norte 685, casilla 747, Talca.

egonzale@utalca.cl

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique González por brindarme su laboratorio, apoyo y supervisión durante la realización de esta tesis.

Al programa de doctorado y beca doctoral de la Universidad de Talca.

Al financiamiento del Consorcio Biofrutales S.A.

Laboratorio de Genómica Funcional del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Talca.

A todos aquellos me han impulsado a culminar esta difícil tarea en mi desarrollo profesional y también personal.

A mis amigos y compañeros del laboratorio e instituto por brindarme su colaboración y compañerismo.

Especialmente dedicado mi mamá Nuri y mi papá Nito, mis hermanos Beni y Carli. A mis Sofía, Juan Pablo y Carlos.

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

RESUMEN

La vid (*Vitis vinifera* L.) es un cultivo de gran importancia económica para Chile. Su cultivo tiene dos usos principales, como producto de consumo en fresco y como materia prima para la elaboración de vino, siendo la producción de frutos de calidad un requisito esencial para ambos propósitos. El desarrollo reproductivo de la vid abarca dos periodos de crecimiento separados por una fase de dormancia invernal: la inducción floral en la primera temporada y el desarrollo floral/frutal en la temporada siguiente. Algunos cultivares de vid, relevantes para la industria vitivinícola tales como Merlot y Carménère, manifiestan atributos particulares durante este proceso que se traducen en una gran tendencia a la abscisión de frutos y a la ocurrencia de partenocarpia que genera frutos no semillados de baja calidad (*millerandage*). Estudios realizados en la variedad Merlot han asociado este fenómeno con alteraciones en el metabolismo de poliaminas (PAs), compuestos implicados en diversos procesos celulares entre los que se incluye al crecimiento y desarrollo vegetal y en la respuesta de las plantas a condiciones de estrés.

En base a lo anterior, el objetivo central de esta tesis es la identificación de los genes que codifican para las enzimas del metabolismo de PAs en *Vitis vinifera* y establecer sus perfiles de expresión tanto durante el desarrollo normal de los órganos reproductivos como en la ocurrencia del *millerandage* en el cultivar Carménère.

Los resultados obtenidos en esta tesis han establecido que con excepción de aquellos genes que codifican para arginina descarboxilasa (ADC) y arginasa (ARGI) que son de copia única, las enzimas del metabolismo de PAs son codificadas por familias multigénicas. La expresión de los genes identificados fue analizada mediante qRT-PCR durante las diferentes etapas del desarrollo reproductivo, estableciéndose que tanto durante la inducción floral en la primera temporada como en el desarrollo de flores y frutos en la segunda temporada, ellos son diferencialmente expresados a través de los distintos estadios fenológicos y son coherentes con la acumulación de PAs descritas para cada estadio. La actividad transcripcional de los genes anteriormente referidos fue comparada entre bayas semilladas y bayas partenocárpicas. Dos aproximaciones metodológicas fueron empleadas para tal efecto: a) análisis transcriptómico global mediante hibridación de un macroarreglo conteniendo 4803 ESTs representativos de genes expresados en el desarrollo reproductivo de vides y b) qRT-PCR de los genes asociados al metabolismo de PAs identificados en el genoma de la vid. En términos generales, los resultados obtenidos mediante ambas metodologías fueron concordantes y coherentes con la concentración de PAs detectadas en ambos tipos de frutos. Adicionalmente el análisis mediante qRT-PCR indicó que el perfil de expresión de tales genes es similar entre los cultivares Merlot y Carménère, variedades que poseen similar tendencia al *millerandage*.

Los resultados obtenidos sugieren que las variaciones detectadas en el contenido de PAs tanto durante el desarrollo reproductivo normal como durante la ocurrencia del *millerandage*, son generadas por la expresión diferencial de los genes asociados al metabolismo de tales compuestos.

ABSTRACT

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is a crop of great economic importance for Chile. Its cultivation has two main uses, for fresh consumption and for wine production, being fruit quality an essential requirement for both purposes. The reproductive development of grapevine occurs throughout two growing seasons separated by a winter dormancy period: floral induction in the first season and the flower and fruit development in the next season. Some grapevine cultivars, relevant for the wine industry such as Merlot and Carménère, show particular attributes during this process as a great tendency to the fruitlets abscission and to the occurrence of parthenocarpy, phenomena that induces the development of poor quality seedless fruits ("millerandage"). Studies in the Merlot variety have associated this phenomenon with alterations in the polyamines (PAs) metabolism. These compounds are involved in diverse cellular processes including plant growth and development, and the plant response to stress conditions.

According to that, the main objective of this thesis is to identify genes encoding for enzymes of PAs metabolism in *Vitis vinifera* and to establish their expression profiles during both the normal and the parthenocarpic fruit development, in the Carménère cultivar.

The results obtained in this work established that the genes encoding for the enzymes related to PAs metabolism enzymes are composed by multigenic families, being the exceptions those coding for arginine decarboxylase (ADC) and arginase (ARGI), that correspond to single-copy genes. The expression profiles of the identified genes were analysed by qRT-PCR throughout the different stages of reproductive development. It was established that during floral induction (in the first growing season) and flower and fruit development (in the second growing season), these genes are differentially expressed in a stage-specific way, consistently with the accumulation of PAs described for each phenological stage.

The transcriptional activities of the genes related to the PAs metabolism were compared between normal and parthenocarpic fruits. Two methodological approaches were employed for this purpose: a) global transcriptomic analysis by hybridization of a macroarray containing 4803 ESTs representing genes expressed during the grapevine reproductive development and b) qRT-PCR of genes associated with PAs metabolism previously identified in the grapevine genome. In general terms, the results obtained by both methods are in good agreement and are coherent with the PAs concentration detected in both types of fruits. Additionally, qRT-PCR analysis indicated that the expression profile of such genes is similar between Merlot and Carménère, both varieties with similar tendency to the "millerandage".

These results suggest that the variations detected in PAs content, during both normal and parthenocarpic reproductive development, are generated by the differential expression of genes associated with metabolism of these compounds.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Presentación del sistema estudiado, la vid: Sistemática y domesticación.

La vid (*Vitis vinifera* L.) es una planta vivaz y trepadora, con tronco retorcido, vástagos muy largos, flexibles y nudosos, hojas alternas, pecioladas, grandes y partidas en cinco lóbulos puntiagudos, flores verdosas en racimos, y cuyo fruto es la uva. Es originaria de Asia, se cultiva en todas las regiones templadas. La vid (*V. vinifera*) es una especie dicotiledonea y pertenece al género *Vitis* y a la familia *Vitaceae* (orden *Rhamnales*). El género *Vitis* está representado por aproximadamente 60 especies y está dividido en dos secciones *Euvitis* y *Muscadinia*, las cuales se diferencian por características morfológicas pero, significativamente por el número cromosómico (*Euvitis* $2n=2X=38$ y *Muscadinia* $2n=2X=40$). *Euvitis* comprende la mayoría de las especies del mundo las cuales serían inter-fértiles. (Hancock 2004). *V. vinifera* posee 19 grupos de ligamiento y su genoma haploide se habría originado por la contribución de tres genomas ancestrales resultando en un contenido diploide que corresponde a tres contenidos diploides completos del ancestro por lo que se denomina como un organismo hexaploide (Jaillon *et al.*, 2007).

Durante el periodo cuaternario el área ocupada por las especies de *Vitis* primitivas se separó en dos partes, el grupo americano y el euro-asiático. Sólo una especie, *V. vinifera*, originada en Eurasia, ha sido distribuida por casi todo el mundo por el hombre. *V. vinifera* habría derivado de la domesticación directa de poblaciones nativas de *V. vinifera* subespecie *silvestris*, pero a medida que el cultivo de la vid ingresó a nuevas regiones se generaron (por hibridación con tipos locales) cultivares mejor adaptados (Hancock, 2004). En la actualidad se conocen aproximadamente 10.000 cultivares de vid, los cuales en función del origen geográfico y las características morfológicas han sido agrupados en tres grupos ecológicos. El grupo *pontica* incluye cultivares de países de los alrededores del Mar Egeo y Negro, el grupo *orientalis* que engloba a cultivares originados en el Este Medio, Irán, Afganistán y áreas cercanas y el grupo *occidentalis* que comprende cultivares del Oeste de Europa (Hancock, 2004). El cultivar Carmenère, en que se centra este estudio, pertenece al grupo *occidentalis*, este conjunto de variedades se caracterizan por tener racimos compactos y uvas pequeñas y al que pertenecen también otras cepas muy cultivadas como Pinot, Chardonnay, Gamay, Cabernet y Merlot (Hardie, 2000).

I.2- El Carménère como cultivar emblemático en la vitivinicultura de Chile.

V. vinifera es una de las especies de mayor importancia para la industria frutícola cubriendo una superficie de 182.660 hectáreas lo que equivale a un 15% del total de área cultivada en Chile durante el año 2007. A su vez el 64,4% de esta superficie cultivada corresponde a uva para vinificación, el 30% a consumo fresco y el 5,5% está destinada a la elaboración de pisco (SAG, 2008), siendo de esta forma, la industria vitivinícola, una de las principales actividades económicas del país.

En la viticultura mundial desarrollada, la identificación de una región vitivinícola con un grupo de variedades viníferas, o con una sola de ellas, corresponde a un aspecto notable en los países del Viejo Mundo y muy deseado en los países del Nuevo Mundo. Entre las vides para vinificación que se cultivan en el país, la variedad Carménère ha ganado gran importancia en los últimos años debido a las características de intenso color y aroma que confiere a sus vinos. Esta variedad es originaria de Médoc, Burdeos en Francia y fue utilizada como cepa de mezcla contribuyendo a la intensidad cromática, cuerpo y complejidad del vino. A mediados del siglo XIX estacas de diferentes cepas entre las que se encontraba Carménère fueron traídas a Chile desde Europa a Chile. A fines del siglo XIX la filoxera arrasó en Europa con esta variedad y en 1994 es redescubierta en Chile mezclada en cuarteles de Merlot (Pszczólkowski, 2004).

El Carménère es cultivado en un reducido número de lugares en el mundo y, particularmente, los viñedos más extensos de esta variedad hoy se encuentran en Chile, (Pszczólkowski, 2004). Debido a las características de suelo y clima de las regiones VI y VII, que permiten el óptimo cultivo Carménère, aquí se concentra el 87% de la producción total del país (SAG, 2008). Sin embargo el cv. Carménère se caracteriza por ser un cultivar vigoroso, con yemas en la base de los sarmientos de escasa fertilidad y brotación, también la pérdida de esbozos de inflorescencias previo a la floración (fenómeno de “*filage*”) de las yemas más basales (Fredes, 2007). Este cultivar tiene una lenta entrada en producción, se muestra sensible al estrés hídrico producido por deficiencia en los riegos. Además el cultivar Carménère es propenso a la abscisión y a la aparición de bayas partenocárpicas inmaduras que contribuyen de forma negativa a la producción del viñedo (Pszczólkowski, 2004).

El posicionamiento en el mercado internacional del vino producido a partir de la var. Carménère dependerá, fundamentalmente, de la calidad que éste pueda lograr, y en

relación a esta última, además de factores como la naturaleza las cepas de levadura utilizadas en el proceso fermentativo y las condiciones enológicas empleadas, incide determinantemente la calidad de la uva procesada (Hidalgo, 1993 y Mullins *et al.*, 1992).

I.3: Aspectos fisiológicos generales de la vid

Vitis vinifera, en estado silvestre es una planta trepadora vigorosa, perenne caducifolia, su tronco y ramas son flexibles y es soportada por árboles donde esta crece. Su hábito trepador se refleja en los zarcillos, de hecho estas plantas pueden llegar a la canopia de los bosques hasta una altura de 20 a 30 metros. En estado silvestre la vid genera una gran cantidad de racimos de frutos pequeños, por esta razón, el cultivo de esta implica una severa reducción del número de racimos con el objeto de incrementar el tamaño y calidad del fruto. Una característica destacable es la habilidad de la planta de vid en brotar luego de la poda, permitiendo una renovación de los ápices que fructificarán (Mullins *et al.*, 1992). Como muchas angiospermas leñosas, presenta una fase juvenil larga de entre 3 a 6 años durante la cual la planta no florece. Además, cada año la planta adulta de vid experimenta cambios morfológicos y fisiológicos característicos en respuesta a las variaciones estacionales de su hábitat.

I.3.1: Fase juvenil

Durante la fase juvenil *V. vinifera*, se caracteriza por una filotaxia en espiral alrededor del eje principal de la plántula y por la ausencia de zarcillos. Una vez que la plántula ha generado de 6 a 10 hojas y no hay zarcillos, hay un cambio de la filotaxia en espiral hacia una dística donde las hojas son producidas a ambos lados del tallo del sarmiento generando una simetría bilateral propia de la morfología adulta. La morfología foliar cambia y aparecen los zarcillos en el tallo de manera opuesta a las hojas, adquiriendo el hábito trepador de la vid, lo que no necesariamente significa la madurez sexual. Es importante durante esta transición que el meristema caulinar adquiere la capacidad de producir los *anlagen* o *primordio no comprometido* (PNC) (Mullins *et al.*, 1992).

Se ha propuesto que las modificaciones morfológicas y fisiológicas que ocurren durante la de transición entre la fase juvenil y la fase adulta inducen a la planta a responder

a estímulos de la iniciación floral. En plantas anuales, esta transición sería muy corta, por el contrario duraría varios años en algunas plantas perennes (Reinier, 2002).

I.3.2: Fase adulta

A lo largo del año la parra transita por diferentes etapas que constituyen el ciclo vegetativo donde se diferencian los estadios de: dormancia invernal, lloros, desborre, crecimiento, detención del crecimiento, agostamiento y caída de la hoja. Al ciclo vegetativo se superpone el ciclo reproductor que morfológicamente consta de: inducción floral, floración, fructificación, periodo herbáceo de las bayas, envero y periodo de maduración (Reinier, 2002).

Cada año saliendo de la etapa de reposo los lloros corresponden a la entrada en actividad del sistema radicular donde hay una activación de la respiración celular, recuperación de la absorción de agua y elementos minerales, así como de movilización de las reservas. Luego, el desborre que es el comienzo del desarrollo de las yemas en primavera es seguido por el crecimiento de los brotes, las hojas, el sistema radicular y el diámetro del tronco. Con el fin de permitir una nueva brotación al año siguiente, obligatoriamente debe tener una fase de almacenamiento de reservas (bajo la forma de almidón principalmente) en el interior de los tejidos de raíces, troncos y sarmientos. Este fenómeno se conoce con el nombre de agostamiento o lignificado que comienza con la maduración de los racimos. Finalmente la caída de las hojas, en mayo aproximadamente pone fin al crecimiento anual. La vid entra entonces en el reposo invernal, sin manifestación exterior aparente de crecimiento. Así, el ciclo reproductor comprende la formación y desarrollo de las inflorescencias, su fecundación y el crecimiento de las bayas y semillas (Reinier, 2002). Esta conducta de desarrollo se enfrenta con la dificultad de mantener un balance entre las reservas destinadas al desarrollo vegetativo perenne (raíces, tronco y cañas) y anual (hojas, zarcillos) de la variedad, y aquellas destinadas a nutrir inflorescencias, bayas y semillas. Cada una de estas fases (vegetativa, agostamiento y reproductiva) depende de la que la precede y ocurren simultáneamente. Las tres fases son interdependientes, y cada una influye sobre la otra y sobre las de años subsiguientes (Martínez de Toda Fernández, 1991).

I.3.2.1 Dormancia o reposo invernal

La yema invernante que brota da lugar a una rama principal o pámpano, el cual contiene las hojas, zarcillos y racimos. Las yemas que se forman en la axila de cada hoja del tallo de la temporada es la “yema pronta” y la característica de esta yema es la de crecer y de desarrollarse en la misma temporada para dar un brote lateral, el cual raramente da inflorescencias, no se lignifica y se abscinde durante el otoño. El crecimiento de esta yema pronta esta inhibida por dominancia apical del brote principal (Mullins *et al.*, 1992).

El proceso de dormancia en las yemas constituye un mecanismo adaptativo para enfrentar y sobrepasar las condiciones ambientales del otoño e invierno poco propicias para el crecimiento. Finalizada la caída de las hojas, también cesa la actividad metabólica de la parra, y las yemas latentes, establecidas en las axilas de las hojas formadas durante el desarrollo del sarmiento, entran en estado de dormancia hasta la primavera siguiente. En la vid, este proceso se desarrolla secuencialmente desde las yemas de la base hacia las de la punta del sarmiento. La diferenciación de las yemas en vides dura aproximadamente hasta la madurez de las bayas y son las yemas de la base del sarmiento las que se diferencian primero. Terminada la diferenciación de cada yema se inicia en ésta lo que se denomina etapa de “paradormancia”. Durante esta etapa, gran parte de las yemas (en especial las basales) aún tienen la capacidad potencial de brotar, pero permanecen en reposo debido principalmente a la dominancia ejercida por la yema apical y las yemas anticipadas de los sarmientos aún en crecimiento. Esta capacidad potencial de brotar se pierde paulatinamente conforme se avanza en la estación y las yemas transitan a la etapa conocida como de “endodormancia” (Srinivasan & Mullins, 1981; Mullins *et al.*, 1992). En esta etapa no se observan cambios visibles pero es fisiológica y bioquímicamente activa y hay cambios en el contenido de agua de las yemas y de reguladores del crecimiento (Seeley, 1994). Para que las yemas abandonen el estadio de endodormancia, la planta debe ser expuesta a temperaturas medias diarias inferiores a 10 °C (al menos una semana).

Cuando el invierno ha terminado, las yemas inician una nueva fase de su ciclo de desarrollo denominado “liberación o ruptura de la endodormancia”. Ambos procesos, la entrada y la liberación de la endodormancia parecen depender de una cascada de transducción de señales, la que es inducida por la acumulación de horas de exposición de las yemas a baja temperatura (Kliwer & Soleimani, 1972; Scalaberilli & Couvillon, 1986). A la salida de la endodormancia, las yemas recuperan su capacidad potencial de

brotar accediendo a un estado denominado “ecodormancia”, donde las yemas permanecen en reposo hasta que el aumento en temperatura y las condiciones ambientales primaverales les permitan salir de este estado y aseguren el normal desarrollo del nuevo brote (Lang *et al.*, 1987).

I.3.2.2 Ciclo reproductivo

La transición desde el crecimiento vegetativo al reproductivo es un proceso esencial en el ciclo de las plantas. Y en las plantas de vid maduras es un proceso de tres etapas que ocurren a lo largo de dos temporadas de crecimiento. El primer paso consiste en la formación de los PNC en el ápice caulinar de las yemas latentes, en los brotes de la misma temporada. Este se desarrolla como un primordio de inflorescencia o de zarcillo en respuesta a un balance hormonal y poco tiempo después la yema latente entra en dormancia. El cambio en las condiciones medioambientales (temperatura e intensidad lumínica elevadas) provocan la salida de la dormancia y por lo tanto el proceso de la formación de flores desde el primordio de la inflorescencia concluye y ocurren la fecundación y fructificación (Mullins *et al.*, 1992).

I.3.2.2.1 Inducción y diferenciación floral

Las vías de inducción floral en las plantas responden a claves ambientales y endógenas. Dependiendo del cultivar, el ápice caulinar de las yemas latentes produce de 3 a 8 primordios de hojas y luego se divide en partes iguales. La parte opuesta al primordio de hoja más joven es el PNC y fue considerado como el estado de iniciación del eje de la inflorescencia y su formación es la primera señal del crecimiento reproductivo en vides (Figura 1). Cercanos a la mitad de la estación de verano, aparecen los primeros PNC en yemas latentes de la base de la caña sobre el leño nuevo. El ápice de la yema continúa creciendo, alternando la formación de primordios foliares con meristemas laterales en forma rítmica y los PNC aparecen progresivamente en las yemas latentes hacia el extremo del sarmiento. Su formación coincide con el cambio de color del tallo desde verde hacia marrón (*aoûtement*). Inicialmente, las dos partes del ápice dividido (PNC y el ápice de la yema latente) tienen apariencia similar pero rápidamente adquieren morfologías diferentes. Posteriormente el PNC se divide en dos partes iguales llamadas brazos y el primordio de la

inflorescencia es formado por la ramificación de los brazos del PNC. El grado de ramificación disminuye hacia el ápice del primordio de la inflorescencia dándole el aspecto de una estructura con forma cónica (Figura 1). Una vez que se han formado uno a tres primordios de inflorescencia (dependiendo del cultivar), la yema latente entra en dormancia (Figura 1) (Srinivasan & Mullins, 1981; Mullins *et al.*, 1992; Boss *et al.*, 2003). De esta forma, queda establecido el número de primordios de inflorescencia por yema o su fertilidad. En la práctica la determinación del número de primordios de inflorescencias en las yemas permite la determinación de la producción potencial de la viña, el tipo de poda y el sistema de conducción empleado más apropiado.

Luego, durante la primavera siguiente, las yemas dormantes son activadas y ocurre la diferenciación de flores desde el primordio de inflorescencia (Figura 1). La iniciación y el desarrollo de las partes florales ocurren simultáneamente en todas las partes del primordio de la inflorescencia. Dentro de cada flor los sépalos, pétalos (caliptra), estambres y pistilos se desarrollan uno luego de otro. La aparición del cáliz como un anillo continuo de tejido sobre el borde del primordio floral marca el inicio de la formación de las partes florales. Los pétalos y estambres aparecen rápidamente como estructuras papilosas luego de la formación de los sépalos. Los pétalos se unen por sus márgenes y forman la caliptra, esta unión es mediada por células especializadas. La antesis o caída de la caliptra, ocurre generalmente al atardecer y es disparada por cambios en el turgor de las células que la unen. A medida que aumenta la temperatura los pétalos se liberan de la base, se curvan hacia arriba y liberan los estambres (Srinivasan & Mullins, 1981; Mullins *et al.*, 1992; Boss *et al.*, 2003).

La fertilidad de las yemas de vid queda establecida antes de entrar en dormancia, esto es que un PNC este determinado a desarrollarse como inflorescencia o zarcillo. Este destino está regulado por factores medioambientales y hormonales, los cuales se reseñan brevemente a continuación.

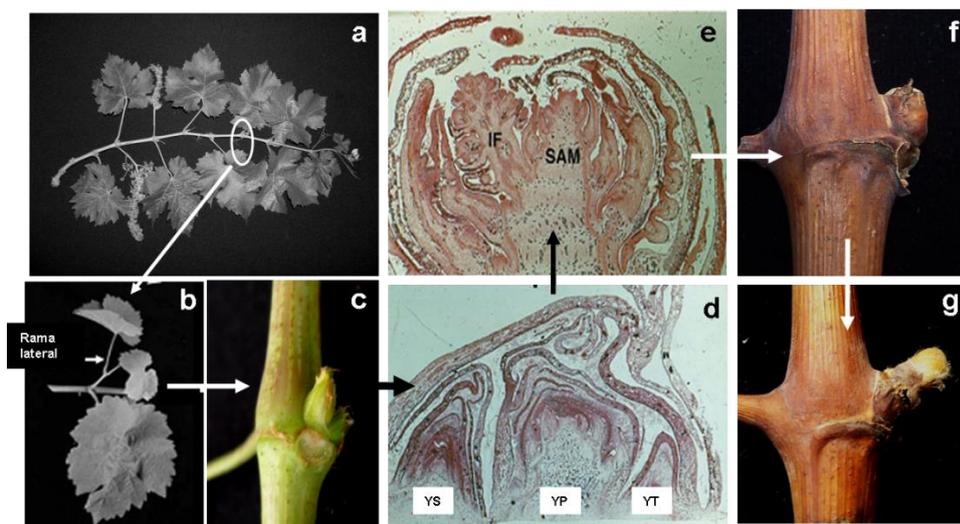


Figura 1: Desarrollo fenológico de yemas y de sus estructuras reproductivas en una planta de vid adulta. Yemas latentes compuestas en las bases de las hojas de los sarmientos de la estación (a, b, c, d) desarrollan los primordios de inflorescencia (IF) a partir del primordio no comprometido (e). Luego, las yemas adquieren un estado de dormancia (f: yemas dormantes) para luego continuar su desarrollo en primavera (g: yemas algodonosas). YP, YS y YT: yemas primaria, secundaria y terciaria, respectivamente (adaptado de Carmona, 2008).

I.3.2.2.2 La formación de los zarcillos

Los PNC que experimentan una ramificación extensa, luego de superar la dormancia dan lugar a inflorescencias, mientras que los PNC que se ramifican una o dos veces darían lugar a los zarcillos. En la vid, la formación del PNC está regulado en dos niveles: la formación del *anlagen* y la diferenciación de este. Los principales reguladores de la floración son las giberelinas (GAs) y citoquininas. Las GAs son necesarias para la formación del eje de la inflorescencia (iniciación del PNC) y su crecimiento. En muchas especies las GAs inhiben la floración, pero en vid el efecto varía de acuerdo al estado de desarrollo de la yema latente; tempranamente las GA promueven la floración, y luego promueve el crecimiento vegetativo y GA actúa como un inhibidor de la floración en este momento y dirige la formación de zarcillos. Aplicaciones de cloromequat a PNC o zarcillos favorece la formación de inflorescencias mediante la producción de citoquininas y/o inhibición de la síntesis de GA en vid (Mullins *et al.*, 1992). Boss y Thomas en el año 2002 describieron un mutante enano que produce inflorescencias a lo largo de tallo donde debería haberse formado zarcillos. El gen asociado con este fenotipo es un homólogo de

gen *GA INSENSITIVE (GAI)* de *Arabidopsis*. La conversión de los zarcillos en inflorescencias que ocurre en este mutante demuestra que el zarcillo es una inflorescencia modificada que no completa su ciclo de desarrollo floral por GA. El papel de otras hormonas, diferentes a las GAs y citoquininas, en el desarrollo de zarcillos y/o inflorescencias es poco conocido. Adicionalmente los genes *VFUL-L* y *VAPI (FRUITFUL-like y APETALA1)* respectivamente), cuya expresión se restringe al meristema floral, se expresan en el desarrollo del zarcillo. Todo esto apoya la hipótesis de que los zarcillos de *Vitis* serían órganos reproductivos modificados para trepar (Calonje *et al.*, 2004).

I.3.2.2.3 Polinización, fecundación y fructificación

Las flores de vid son morfológicamente hermafroditas, y si bien todas poseen los complementos de pistilo y estambres, funcionalmente estas son de tres tipos hermafroditas, estaminadas o pistiladas. Las variedades cultivadas de *V. vinifera*. son generalmente hermafroditas y sólo algunos cultivares son funcionalmente femeninas. A lo largo de los años se han propuesto diferentes teorías sobre la mecánica de la polinización en *V. vinifera* que incluyen desde una polinización mediada por insectos, o por el viento hasta la autopolinización. La visión más reciente que se tiene de este tópico es que la autopolinización es importante y que ocurriría previo a la caída de la caliptra y que la polinización cruzada también ocurre y resulta en un mejor establecimiento de la semilla en la baya (Vasconcelos *et al.*, 2009). Una baya posee potencialmente 4 semillas debido a que usualmente existen cuatro óvulos y cada uno es fecundado por diferentes granos de polen. Las flores que fueron polinizadas pero no fecundadas generan bayas pequeñas verdes (Friend & Trought 2007). Adicionalmente existen cultivares que producen frutos sin semillas. Este hecho que puede deberse a partenocarpia donde el desarrollo del fruto ocurre sin fecundación y estrictamente no posee semilla. Un ejemplo es el cultivar Zante Currant donde el saco embrionario degenera y la polinización dispara el desarrollo frutal y es potenciado por técnicas de manejo y tratamiento con reguladores de crecimiento (Vasconcelos *et al.*, 2009). Otro es el caso de la estenospermocarpia en que las bayas poseen una o más semillas abortadas como por ejemplo el cultivar Sultanina, donde la polinización y fecundación disparan el desarrollo frutal pero el desarrollo del endosperma y embrión fallan. En esta variedad el polen es funcional y también el desarrollo de óvulos

(Mullins *et al.*, 1992). En resumen, el establecimiento del fruto implica una transformación de las flores en frutos. Tras una polinización y fecundación exitosas, por un lado se reanudan las divisiones celulares en el pericarpio y el fruto comienza a crecer, la pared del ovario se convertirá en la piel y pulpa de la baya, y por otro se previene la formación de la placa de abscisión en la base del pedicelo (Mullins *et al.*, 1992).

I.3.2.2.4 Desarrollo frutal de la vid

El desarrollo del fruto se define como la diferenciación de órganos preexistentes, donde los carpelos se convierten en el pericarpio que contiene a las semillas. Esta transformación de los carpelos genera tres capas constituyentes del pericarpio: el endocarpio, mesocarpio y exocarpio y un sistema vascular (Gillaspy *et al.*, 1993). En el caso de la vid se presentan frutos carnosos, denominados bayas, organizados en racimos.

El crecimiento de las bayas de vid describe una curva doble sigmoidea, con tres fases distinguibles. En la primera (fase I) se observa un crecimiento exponencial del fruto, debido a una activa división celular en el pericarpio. Además se desarrollan las semillas y hay una gran producción y acumulación de ácidos orgánicos (tartárico y málico), los que se almacenan en las vacuolas de las células del pericarpio. En la segunda etapa (fase II) tiene lugar el fenómeno denominado *envero*, evento que marca el inicio de la maduración del fruto, pudiéndose observar el inicio del aumento de la pigmentación de las bayas, una disminución del crecimiento del pericarpio y al final de esta fase se alcanza la acidez máxima. Una vez comenzado el periodo de *envero* las bayas presentan sus semillas maduras. En la tercera etapa (fase III) se reanuda el crecimiento de la baya de una manera repentina, lo cual es producto de una activa expansión celular (Ollat *et al.*, 2002; Mullins *et al.*, 1992). En la baya se observa por una parte, un aumento en el grado de ablandamiento, contenido de azúcares, compuestos aromáticos y polifenoles (como las antocianinas), y por otra parte una disminución del contenido de ácidos orgánicos. Los compuestos aromáticos y polifenoles tienen una gran importancia, debido a que son responsables del color de las bayas y posteriormente del vino, presentando cada variedad diferencias respecto de los perfiles de antocianinas (Boss *et al.*, 1996). Esta sucesión de cambios morfogénicos se encuentra asociada a una regulación genética dependiente del desarrollo y a cambios en los contenidos de distintas fitohormonas (Howell, 1998).

1.4 Problemática abordada en esta tesis

El genotipo es un factor significativo que determinaría la fecha de ruptura y fertilidad de las yemas, el tamaño y número de las inflorescencias, el establecimiento de las bayas y la tasa de maduración de las mismas (Pszczólkowski, 2004). Durante las primeras etapas del desarrollo frutal en la vid y particularmente en la variedad Carménère, se hacen evidentes la abscisión de los frutos y la ocurrencia de partenocarpia, la cual se caracteriza por la aparición, en un mismo racimo, de bayas sin semillas, muy pequeñas que no alcanzan la madurez y de frutos maduros de gran tamaño (Figura 2). Agronómicamente la partenocarpia es conocida como “millerandage” (Hidalgo, 1993; Mullins *et al.*, 1992). La ocurrencia de partenocarpia se asocia generalmente a condiciones de climas fríos, lo que afecta considerablemente la capacidad productiva. También se ve acentuada cuando el Carménère se injerta sobre patrones que le confieren vigor o cuando es cultivado en suelos que presentan algunas limitantes como aquellos arcillosos y poco aireados, suelos arenosos y pedregosos, suelos con estratos impermeables y deficientes en boro (Pszczólkowski, 2004). En el Carménère, una de las principales razones de la partenocarpia, es probablemente la ocurrencia de estambres espiralados en las flores y granos de polen morfológicamente alterados, lo cual estaría asociado a una polinización y fecundación defectuosas (Calò *et al.*, 1991; Alva, 2013). Estos problemas inciden en la industria vitivinícola disminuyendo la producción total de uvas (toneladas/hectárea) y afectando directamente la calidad del mosto en su contenido de azúcares, compuestos aromáticos y polifenólicos como las antocianinas y taninos, lo que se ve reflejado en el grado alcohólico y los caracteres organolépticos logrados por el vino (Hernández, 2000).

La ocurrencia de *millerandage* en la vid permite el estudio del desarrollo frutal en etapas tempranas. En el cv. Carménère, 4 semanas después de la floración y una vez ocurrida la fructificación, ya es posible diferenciar bayas partenocárpicas de las bayas semilladas. Esto nos permite tener dos fenotipos diferentes en un solo sistema idéntico sometido a las mismas condiciones medioambientales.

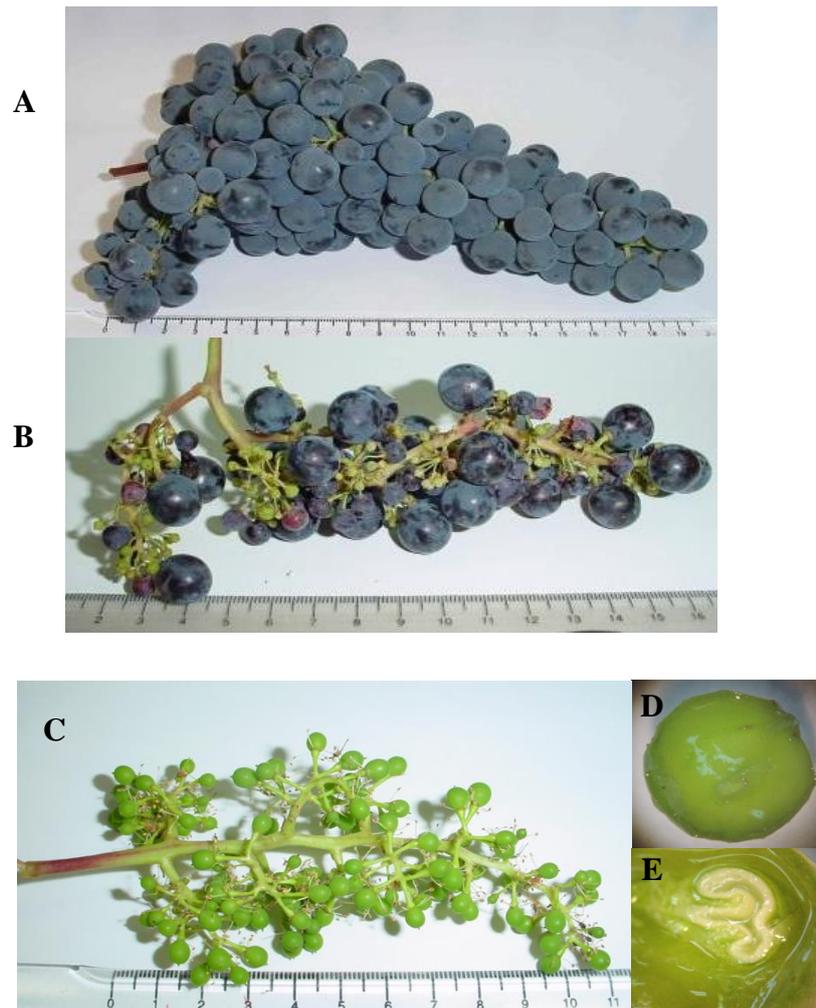


Figura 2: Racimos con *millerandage*. **A:** Racimo del cv. Cabernet Sauvignon donde no ocurre *millerandage*. **B:** Racimo del cv. Carménère al momento de la cosecha donde es evidente la heterogeneidad entre las bayas que constituyen el racimo. **C:** Racimo post fructificación donde son diferenciables bayas partenocárpicas (2mm) de las semilladas (≥ 4 mm). **D** Baya partenocárpica, **E:** bayas con embrión en formación.

I.5 Regulación hormonal en vides.

En términos generales, en una primera instancia y como producto de la polinización y fecundación, giberelinas (GAs), citoquininas y auxinas establecen el inicio de los procesos de la morfogénesis frutal. En vid, la fructificación y crecimiento de las bayas es disparado por la polinización y se correlaciona con un elevado nivel de auxina endógena (IAA) (Cawthon and Morris, 1982), se mantiene durante la primer fase del crecimiento de las bayas y alcanza el máximo durante la siguiente fase de crecimiento lento, finalmente disminuye a niveles muy bajos durante la *envero* (Ollat *et al.*, 2002). En vid luego de la

antes de la antesis los niveles de auxinas se elevan considerablemente y se mantiene por mayor tiempo en las variedades semilladas con respecto a las variedades partenocárpica y estenospermocárpicas evaluadas por Coombe (1960). Por otra parte los niveles de GAs son variables, en las variedades semilladas se registran principalmente en estambres y no en carpelos, en las variedades estenospermocárpicas se encuentran en ambos tejidos. En la variedad partenocárpica Black Corinth se observa un alza en los niveles de auxina y giberelinas 11 días después de la antesis.

La transformación de la variedad Thompson seedless con un gen para la síntesis de auxina que se expresa específicamente en óvulo (*DefH9-iaaM*) aumentó el número de inflorescencias por brote y el número de bayas por racimo (Costantini, 2007). Mas recientemente se ha comparado pistilos emasculados polinizados y no polinizados y se ha demostrado que la polinización dispara tempranamente la inducción de genes involucrados en la síntesis de GAs (*VvGA20ox*) y la inhibición de *VvNCEDI*, involucrado en la biosíntesis de ABA y posiblemente en la inhibición de la formación del fruto. Siete días mas tarde también se inducen genes de síntesis de auxinas (*VvASBI*) y citoquinias (*VvIPTI*); posterior a esto prosigue el “fruit set” y desarrollo de las bayas. Por el contrario en pistilos emasculados sin polinización tempranamente *VvNCEDI* se encuentra inducido y recién pasados 15 días se activan los genes de síntesis de auxinas (*VvASBI*) y citoquinias (*VvIPTI*), pero no de GAs activándose en este caso una proteína desactivadora (*VvGA2ox-like*); ocurre el “fruit set” más tarde generándose bayas partenocárpicas pequeñas (Kühn y Arce –Johnson, 2012).

De igual forma que ocurre con otros frutos el desarrollo de la baya de vid se caracteriza por la proliferación y aumento del tamaño de las células en el pericarpio. Si bien existe amplia evidencia del efecto de GAs en el crecimiento del tamaño celular en el meristema apical, el efecto sobre la división celular es menor (Daykin *et al.*, 1997). Sin embargo, aplicaciones de GAs a vides apirénicas luego de la floración producen la división celular y el crecimiento en tamaño de las mismas. Shiozaki y colaboradores (1998) observó que los niveles de Put se ven aumentados frente a las aplicaciones de GA₃, mientras que los niveles de Spd y Spm no se modifican. Además, la aplicación de MGBG (metilglioxal-bis (guanil hidrazona)), un inhibidor de la actividad de S-adenosil-metionina descarboxilasa (SAMDC), clave en la síntesis de Spd y Spm, no afectó el desarrollo de bayas partenocárpicas inducidas por 100 ppm de GA₃. También se observó que al

momento de la cosecha, el tratamiento con Put duplicó el peso fresco de las bayas respecto de los controles no tratados. De acuerdo a la asociación de las PAs con la división celular en protoplastos de una serie de plantas (almendras, avena, aliso), Put sería un factor obligado en la inducción del crecimiento de las baya partenocárpicas al aplicar GA₃ (Shiozaki *et al.*, 1998).

I.6 Las poliaminas como reguladores del crecimiento

Las poliaminas son moléculas alifáticas de bajo peso molecular, policatiónicas y presentes en todos los seres vivos: Pueden encontrarse en tres formas, en forma libre donde se encuentran electrostáticamente cargadas, en forma conjugadas con moléculas de bajo peso molecular como ácidos fenólicos (PAs solubles en ácido) las que son solubles en el citoplasma de la célula y finalmente, PAs unidas a macromoléculas como proteínas o amidas de ácidos hidroxicinámico (PAs insolubles en ácidos). La cantidad de PAs presente en un momento es el resultado de varios factores como son la biosíntesis, el transporte a otros tejidos, la conjugación con ácidos fenólicos para dar amidas ácidas hidroxicinámicas, la unión a macromoléculas y su degradación (Bagni y Tassoni, 2001; Bouchereau *et al.*, 1999). En los organismos vegetales, las PAs más abundantes son putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm).Adicionalmente, en legumbres es posible encontrar altos niveles de cadaverina y recientemente se ha descrito la termoespermina (Imai *et al.*, 2004a; Knott *et al.*, 2007).

Durante la morfogénesis señales extrínsecas e intrínsecas sirven como reguladores del desarrollo que le permiten a la planta coordinar la secuencia de eventos de desarrollo. La importancia que juegan las poliaminas en las plantas se ha puesto en evidencia a partir de la observación de cambios en los niveles de estos compuestos que acompañan a transiciones del desarrollo y en especial como respuesta a condiciones de estrés (Yoda *et al.*, 2006; Kusano *et al.*, 2007, Moschou 2008 a, b). Las poliaminas son esenciales para los procesos de proliferación y diferenciación celular, poseen carga positiva a pH fisiológico y se ha demostrado que *in vitro* pueden unirse a varias macromoléculas incluyendo DNA, RNA, cromatina, fosfolípidos y proteínas mediante uniones electrostáticas que pueden causar estabilización o desestabilización. (Bagni y Tassoni, 2001 y Walden *et al.*, 1997).

A causa de la carga catiónica de las poliaminas, ellas se asocian a compuestos aniónicos de las biomembranas como son los fosfolípidos y pectinas (D'Orazi y Bagni,

1987). En experimentos in vitro a principios de los 90s se demostró que las interacciones de las PAs con los grupos fosfatos del DNA causan el cambio conformacional desde la forma B a las formas A y Z, y también protegen el DNA de la degradación enzimática y denaturación por calor y rayos X (Feurestein *et al.*, 1991).

En relación a la división celular, se registran altos niveles de poliaminas libres en células en división mientras que los niveles son bajos en células en expansión (Galston y Kaur-Sawhney, 1995) estudios en cultivos celulares han demostrado que aumentos en la actividad de ODC y ADC y coincide con la transición de fase G1 a S del ciclo celular (Kakkar *et al.*, 2000). En explantos de *Helihantus tuberosus* se ha observado un aumento en las PAs durante la fase G1 y S, precedido por el aumento de la actividad de ADC y ODC. Mientras que los inhibidores de SPDS y SAMDC no tenían efecto, el bloqueo de la actividad de ADC y ODC inhibía significativamente la división celular (Torrighiani *et al.*, 1987, Serafini-Fracassini 1991). Existe evidencia que argumenta un rol esencial de las poliaminas de plantas, de esta forma la disminución de Put y Spd es letal en plantas de *Arabidopsis* (Imai *et al.*, 2004b; Urano *et al.*, 2005). Por su parte Spm, si bien no es esencial, jugaría un rol muy importante en la morfogénesis, crecimiento, embriogénesis, desarrollo de órganos, crecimiento del tubo polínico, senescencia de las hojas y respuesta a estrés biótico y abiótico (Kumar *et al.*, 1997, Walden *et al.*, 1997, Malmberg *et al.*, 1998, Bouchereau *et al.*, 1999, Liu *et al.*, 2000, Alcázar *et al.*, 2006, Groppa & Benavides 2007, Kusano *et al.*, 2007). Además la sobre expresión del gen de SAMDC de levaduras en tomate modifica características de importancia agro-económica que incluyen el aumento de licopeno, extensión de la vida de la planta y mejor calidad de la fruta (Mehta *et al.*, 2002; Matto *et al.*, 2006).

Recientemente Paschalidis *et al.* (2009) han establecido la distribución de las diferentes fracciones de poliaminas a lo largo de una planta completa de vid generada a partir de estaca. Conjuntamente se ha estudiado el perfil transcripcional de los genes involucrados en el anabolismo y catabolismo de estos compuestos. Se ha determinado que existe una relación inversa entre los niveles de Put total respecto de las poliaminas superiores “higher PAs” (Spm y Spd), en relación a la edad de las hojas, aumentando la Put y disminuyendo Spm + Spd. De manera contrastante, en tabaco todas las fracciones de PAs disminuyen con la edad de las hojas. Las PAs son mucho más abundantes en las flores y frutos que en cualquier otro órgano de *Arabidopsis* y de tabaco. Observándose una mayor abundancia de Spd que Put en los ovarios post-fecundación (Applewhite *et al.*,

2000; K-Sawhney y Applewhite, 1993). En distintas variedades de vid, se observa una tendencia a la disminución del contenido de PAs libres luego de la fecundación. En flores previas a la antesis de las variedades Pinot Noir y Merlot se han registrado contenidos elevados de PAs, en particular la Put conjugada, que luego tras la fecundación se ven disminuidos (Aziz *et al.*, 2001). En la variedad Cabernet Sauvignon se observó que junto con la disminución de Put, Spd y Spm se registró un aumento del 1,3 diaminopropano (Dap) justo luego de la polinización para después descender paulatinamente hasta el *envero*; el aumento de Dap fue correlacionado con una disminución en la actividad de la PAO (Geny *et al.*, 1997; Colin *et al.*, 1999). En la pulpa de las bayas en fase I del desarrollo, el contenido de Put en sus tres formas es más elevado que el contenido de Spd y Spm; por su parte en la semilla la Put libre incrementa su contenido por un periodo corto al final de la fase I lo que se relacionaría con la división celular en los integumentos de la semilla (Shiozaki *et al.*, 2000). En todas las variedades al final de la *envero* los valores totales de PAs son muy bajos.

En relación a la abscisión y la aparición de bayas partenocárpicas en vid se han evidenciado cambios en los contenidos de poliaminas. Respecto de la abscisión se ha observado que los niveles de PAs conjugadas solubles en las inflorescencias disminuyen mucho más en la variedad Merlot que presenta mayor abscisión comparada con la var. Pinot Noir. Además la aplicación de Spd al medio nutritivo, previo a la floración atenúa la abscisión elevando los contenidos de Put y Spd libres y conjugadas en flores y hojas (Aziz *et al.*, 2001, Aziz, 2003). Por otra parte, en el caso de la aparición de bayas partenocárpicas se observó que los contenidos de PAs totales en bayas corridas obtenidas al tiempo de cosecha, son similares a los valores de bayas en los distintos estadios del desarrollo; en particular el 1,3 diaminopropano (Dap) se encuentra aumentado en las bayas partenocárpicas y además la aplicación del mismo aumenta la aparición de estas bayas (Colin *et al.*, 2002).

Por otro lado, y considerando que las poliaminas están asociadas a la proliferación celular, modificaciones en sus contenidos son observados durante la transición desde la dormancia de las yemas a un estado activo. En otras leñosas como la cereza y el manzano, los niveles de poliaminas son bajos durante el letargo de las yemas pero al salir de la dormancia los niveles de PAs aumentan (Wang *et al.*, 1985 y 1986). En yemas de vid, Márquez Cervantes *et al.*, (2002) observaron en estacas sometidas a diferentes cantidades de horas frío y concentraciones de tiazurón, un aumento en el contenido de Put. Además,

determinaron que estos factores (frío y tidiázurón) aplicados conjuntamente inducían en mayor proporción la salida de dormancia que cuando se evaluaban independientemente. La aplicación de un número creciente de horas frío (5°C) a estacas de vid del cv. Superior Seedless para simular la acumulación natural de horas frío se tradujo en un aumento rápido en la concentración de Put y Spd en yemas hasta las 300 horas de frío (PCU: *Positive chill units*). Luego, a medida que las yemas alcanzaban el requerimiento de horas frío propios de la variedad (400 a 500 PCU) se observó una disminución en contenido de Put y un leve aumento en los niveles de Spm. La concentración de Spd se mantuvo alta (Mohamed *et al.*, 2010). Los autores sugieren que la Put tendría un rol protector al frío en yemas y que la transición desde el estado dormancia a liberación de dormancia (ruptura de yemas) se asociaría con una disminución de la tasa Put/Spd + Spm (Mohamed *et al.*, 2010).

I.6.1 Biosíntesis de poliaminas

Existen dos vías alternativas para la síntesis de PAs y los genes que codifican para las enzimas involucradas han sido caracterizados en varias especies vegetales (Bell & Malmberg, 1990; Michael *et al.*, 1996; Bagni y Tassoni 2001 y Liu *et al.*, 2007). La biosíntesis de las poliaminas se inicia con la formación de la diamina Put a partir de arginina, actuando la enzima **arginasa** (EC3.5.3.1) para producir ornitina y luego la enzima **ornitina descarboxilasa** (ODC, EC4.1.1.17), actividad que no se ha encontrado en *Arabidopsis* (Hanfrey *et al.*, 2001). Sin embargo, en plantas y bacterias, la formación de Put a partir de arginina también ocurre por una reacción catalizada por la enzima **arginina descarboxilasa** (ADC, AC 4.1.1.19) seguido por dos pasos sucesivos catalizados por las enzimas **agmatina inminohidrolasa** (AIH, AC 3.5.3.12) y **N-carbamilputrescina amidohidrolasa** (CPA, EC 3.5.1.53 (Slocum & Galston, 1985). Posteriormente, la Spd se produce por la adición de un grupo aminopropilo a la Put mediante la acción de la enzima **aminopropil transferasa espermidina sintetasa** (EC 2.5.1.16). La adición de otro grupo aminopropilo a la Spd produce la Spm, reacción catalizada por la enzima **espermina sintetasa** (EC 2.5.1.22). Los grupos aminopropilo provienen de la descarboxilación de S-adenosilmetionina (SAM) cuya reacción es catalizada por el enzima **S-adenosilmetionina descarboxilasa** (SAMDC; EC 4.1.1.50, Figura 3). En plantas, la SAM es intermediario de la síntesis de etileno a través de la síntesis previa del ácido 1-aminociclopropano-1-

carboxílico (ACC; Van der Straeten *et al.*, 1990). SAM es un precursor en la síntesis de etileno, por lo que un desbalance en la biosíntesis de PA, particularmente mediante SAMDC afectaría las tasas de síntesis de etileno por lo que constituiría un mecanismo de control de ciertos procesos en las plantas superiores como la caída de los pétalos, abscisión de las flores y el desarrollo embrionario (Walden *et al.*, 1997). Por el contrario, el estudio de la expresión heteróloga del gen *SAMDC* de levaduras en tomate de manera específica en fruto muestra que la disponibilidad de SAM no es limitante para la producción de etileno durante la maduración de los frutos de *Solanum lycopersicum* (Mehta *et al.*, 2002).

Existen evidencias que sugieren que las actividades enzimáticas de ADC y ODC están reguladas de forma específica según tejido y estadio de desarrollo. (Walden *et al.*, 1997). Las enzimas ODC, ADC y SAMDC poseen vidas medias cortas, por lo que serían puntos de control metabólico en la célula (Bhatnagar *et al.*, 2002). En *Arabidopsis* existen dos genes que codifican para ADC: *ADC1* y *ADC2*. Mientras que *ADC1* se expresa en diferentes tejidos, *ADC2* se expresa principalmente en silicua y hojas caulinares, además responde a estrés osmótico, mecánico y salino (Soyka & Heyer, 1999; Perez-Amador *et al.*, 2002; Urano *et al.*, 2004). El doble mutante *ADC1* y *ADC2* muere en el estado embrionario (Urano *et al.*, 2005). También existen dos genes que codifican para la Spd sintetasa, *SPDS1* y *SPDS2*, en el genoma de *Arabidopsis*. Si bien la mutación de uno de estos genes de manera independiente no muestra ningún defecto en el desarrollo, el doble mutante queda arrestado en el estadio de corazón durante la embriogénesis y acumula elevadas cantidades de Put (Imai *et al.*, 2004a). Para la Spm sintetasa se ha descrito un gen el cual si bien no parece ser esencial para la vida de *Arabidopsis* crecida en condiciones normales (Imai *et al.*, 2004b), los mutantes *spms* son más sensibles a sequía y estrés salino (Yamaguchi *et al.*, 2007). Aparentemente una de las funciones más importantes de la Spm es la protección del DNA del ataque por radicales libres y la subsecuente mutación. Por otro lado la Spm sería un mediador de la respuesta frente a patógenos (Takahashi y Kakehi, 2010). Para la SAMDC, en la gran mayoría de las plantas existe al menos dos copias del gen, en *Arabidopsis* existen 4 copias, siendo *SAMDC1* la más abundante y ubicua, mientras que *SAMDC2* se expresa sólo en hojas e inflorescencias (Franceschetti *et al.*, 2001).

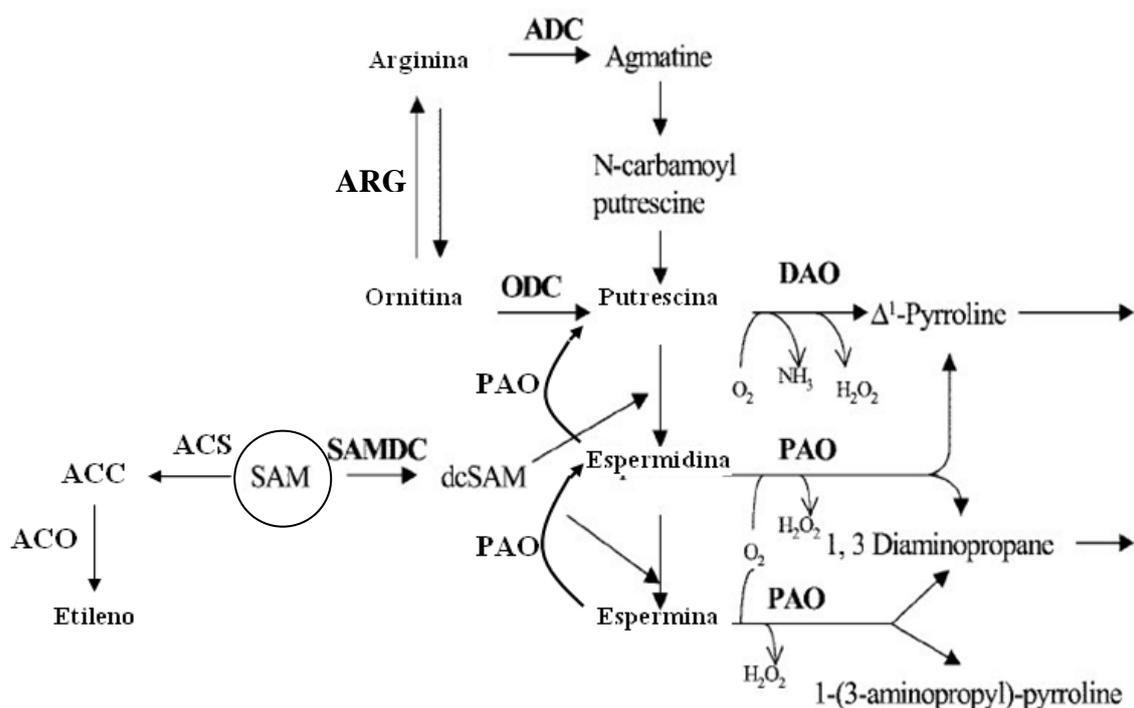


Figura 3: Vía biosintética de poliaminas y etileno en plantas. S-adenosil metionina (SAM) es descarboxilado por SAM descarboxilasa. El SAM descarboxilado provee los grupos aminopropilo que son conjugados con Put por la espermidina sintetasa para dar Spd. La Spd es conjugada con otro grupo aminopropilo, por la espermina sintetasa para dar Spm. La Put se forma a partir de Arginina por la arginina descarboxilasa (ADC) o a partir de Ornitina por la ornitina descarboxilasa (ODC) vía Arginasa (ARGI). SAM también es sustrato para la síntesis de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) el que es oxidado por la ACC oxidasa (ACO) para dar etileno. El catabolismo de Put ocurre por la acción de diamino oxidasa (DAO). Las aminas superiores pueden seguir la vía de catabolismo o la de reconversión mediada por las poliamina oxidasas (PAO). Figura modificada de Bhatnagar *et al.*, (2002).

1.6.2 Catabolismo de poliaminas

La oxidación es la principal vía catabólica de las poliaminas, la cual es ejecutada por dos actividades enzimáticas, la **diamino oxidasa** (EC 1.4.3.6) y la **poliamino oxidasa** (PAO; EC 1.5.3.3;). La primera corresponde a una proteína que contiene cobre y que cataliza la oxidación de Put y Cad (cadaverina) a 4-aminobutanal con la producción de NH_3 y H_2O_2 (Bagni y Tassoni 2001; Cona *et al.*, 2006). Por su parte, las PAOs son enzimas que utilizan FAD como cofactor para catalizar la oxidación de los grupos aminos secundarios de Spd y Spm y no otras aminas. Estas enzimas oxidan el grupo amino secundario formando H_2O_2 , diaminopropano (Dap) y aminoaldehidos; el Dap, eventualmente es convertido en alanina (Bhatnagar *et al.*, 2002; Bouchereau *et al.*, 1999). Así, el catabolismo de las poliaminas no es simplemente un proceso degradativo, sino

también un importante nexos entre el metabolismo de amino ácidos y del carbono en plantas (Bhatnagar *et al.*, 2002). Si bien en un principio se sostenía que la desaminación oxidativa en mamíferos ocurriría principalmente en el peroxisoma y en las plantas ocurriría en el apoplasto (Rea *et al.*, 2004; Cona *et al.*, 2006), hoy existe evidencia de que estas reacciones ocurren también en los peroxisomas de las plantas (Moschou *et al.*, 2008b).

Los dominios característicos de las PAOs incluyen un sitio de unión no covalente a flavina y utiliza como sustrato derivados no acetilados en plantas. Estas enzimas se han clasificado de la siguiente forma: i) aquellas que están involucradas en el catabolismo terminal de las PAs, ii) las que efectúan la reconversión “back conversion” de las poliaminas y iii) las que contienen un dominio PAO pero no pueden desaminar PAs. (Moschou *et al.*, 2008a). Dentro del primer grupo la enzima mejor caracterizada es la PAO de maíz (ZmPAO), la cual es una glicoproteína monomérica de 53 kD asociada a la pared celular responsable del catabolismo terminal de espermidina y espermina (Polticelli *et al.*, 2005). El segundo grupo se caracteriza por la semejanza con las PAOs de los mamíferos principalmente localizadas en el peroxisoma, depende de los sustratos suplidos por la actividad Spd/Spm N1-acetiltransferasa (SST) las cuales actúan en una vía de reconversión secuencial de diacetil Spm (N1- N12) a acetil-Spd y esta a acetil-Put, estando las PAOs terminales ausentes en mamíferos (Moschou *et al.*, 2008b)

Los primeros reportes de la existencia de esta reconversión de Spm a Put en plantas fueron presentados por Del Duca *et al.*, (1995) y Tassoni *et al.*, (2000) quienes aplicando exógenamente Spd a cloroplastos de *Heliantus tuberosus* y a plántulas de *Arabidopsis* respectivamente, se obtenía Put como resultado. En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado 5 genes PAO, pero ninguna reconoce Put (Takahashi *et al.*, 2010). AtPAO1 cataliza la desaminación oxidativa de Spm y Nor-Spm para producir Spd y Nor-Spd respectivamente (Yoda *et al.*, 2003), no posee ninguna señal de destino a compartimentos intracelulares por lo que se asume una localización citoplasmática. (Tavladoraki *et al.*, 2006). AtPAO1 oxida Spm y no Spd, contrario a MPAO (Polticelli *et al.*, 2005), BPAO1 y BPAO2 (Cervelli *et al.*, 2001), que oxidan ambas poliaminas. AtPAO2 convierte termoespermina Spd y Put, con la producción de H₂O₂ (Takahashi *et al.*, 2010). Por su parte, AtPAO3 cataliza la reconversión completa de Spm a Spd y finalmente a Put y su localización es en el peroxisoma (Moschou *et al.*, 2008b), AtPAO4 cataliza la conversión oxidativa de Spm a Spd pero no la de noespermina (Kamada-Nobusada *et al.*, 2008,

Tavladoraki *et al.*, 2006), asociándola a la vía de reconversión de poliaminas. Detalles de AtPAO5 no se obtuvieron al no poder ser aislada (Takahashi *et al.*, 2010).

El tercer grupo de enzimas incluye lisina–decarboxilasas-demetilinas que poseen un grupo aminoxidasa similar al de las PAOs. Estas se confinan al núcleo y estarían involucradas en el remodelamiento de histonas mediante modificaciones postraduccionales de las colas N-terminal de las histonas (Moschou *et al.*, 2008a). Las que incluyen acetilación de lisina, fosforilación de serina y treonina, y metilación de lisina y arginina. Adicionalmente la lisina puede ser mono, di o trimetilada, mientras que la arginina puede ser mono o dimetilada. Esta complejidad en las modificaciones posibles a dado lugar a un “código de histonas” (histone code) el cual sería leído por la maquinaria celular para producir un patrón específico de regulación génica. Este proceso impacta la estructura cromatínica. La tercer clase de PAO incluye a las proteínas lisina demetilinas (LSD) y requieren FAD para su actividad catalítica (Moschou *et al.*, 2008a, Shi *et al.*, 2004). Este tipo de enzimas es común en plantas y animales y poseen dominios adicionales llamados SWIRM, característicos de proteínas involucradas en el remodelamiento de la cromatina. LSD1 funciona como un co-represor transcripcional a través de la actividad histona demetilasa que esta ligada a la transcripción activa. De manera interesante el dominio PAO no ejercería ninguna acción en las PAs. Los homólogos de LSD de *A. thaliana* promueven la transición floral a través de la represión de represores florales. (Jiang *et al.*, 2007).

Lo anterior sugiere que la regulación del metabolismo de poliaminas posee un rol importante en el proceso de desarrollo frutal en vides, cuyos tejidos son originados más tempranamente durante el desarrollo de las yemas. Sin embargo, los cambios de expresión génica de los componentes del metabolismo de las poliaminas en la ocurrencia de la partenocarpia en vid y durante el desarrollo de las yemas aún no se han establecido. Por lo tanto y basándose en lo expuesto se propone la siguiente hipótesis:

I.8 Hipótesis de trabajo y Objetivos:

Considerando que:

1. Los contenidos de PAs registran variaciones a lo largo del proceso de desarrollo reproductivo en *Vitis vinifera*
2. El desarrollo de frutos partenocárpicos no semillados está asociado con alteraciones en el contenido de PAs respecto de bayas semilladas

Se plantea la siguiente hipótesis de trabajo

Los genes que codifican para enzimas relacionadas al metabolismo de poliaminas son diferencialmente expresados durante las distintas etapas del desarrollo floral y frutal en vides. Alteraciones en el proceso de desarrollo del fruto implican modificaciones en el patrón de expresión de tales genes.

Objetivo general:

Establecer los perfiles de expresión de los genes de *Vitis vinifera* relacionadas al metabolismo de PAs, durante el desarrollo reproductivo en el cultivar Carménère.

Objetivos específicos:

1. Identificar y caracterizar *in silico* los genes que codifican para enzimas del metabolismo de poliaminas presentes en el genoma de la vid
2. Determinar el perfil de expresión de los genes identificados durante las etapas de inducción floral, desarrollo floral y frutal en el cultivar Carménère.
3. Establecer las modificaciones en el perfil de expresión de genes asociados al metabolismo de PAs que se registran durante el desarrollo de frutos no semillados.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 MATERIALES:

II.1.1 Colección del material vegetal en el viñedo

Las muestras de *Vitis vinifera* var. Carménère de diferentes órganos en estados específicos del desarrollo fueron colectadas desde un viñedo comercial en San Rafael, Valle del Maule, Séptima Región de Chile. El crecimiento de las bayas de vid presenta un patrón doble sigmoideo donde se distinguen 3 etapas: la primera de rápido crecimiento en tamaño, la segunda de crecimiento lento o casi nulo, llamada fase estacionaria y la tercera etapa en que se retoma el crecimiento y ocurre la maduración. En la etapa I es posible identificar en el racimo dos tipos de bayas, unas de mayor tamaño que formarían semillas y las que detendrían su desarrollo partenocárpicas Figura 4. Para conocer el comportamiento transcripcional de los genes de interés en la fructificación y el desarrollo de yemas, se realizaron las diferentes colecciones. Para el estudio durante la fructificación se muestrearon tres cultivares Carménère, Merlot (ambos presentan partenocarpia) y Cabernet Sauvignon (no presenta partenocarpia). Los estadios muestreados se definieron de acuerdo al sistema Eichhorn-Lorenz (Coombe 1995) colectándose: EL15 inflorescencias pequeñas (**LC**), EL23 flores en antesis (**f**), posteriormente bayas en estadio I de crecimiento (EL29-30), esto es en la cuarta semana posterior a la muestra de flor, a partir de estos racimos se procesaron separadamente bayas del menor tamaño ($\approx 2\text{mm } \varnothing$, partenocárpicas, **bp**) claramente distinguibles de las de bayas semilladas ($\geq 4\text{mm } \varnothing$, bayas verdes del mayor tamaño, **bv**), EL35 bayas en envero o pinta y EL38 bayas maduras. El estudio de expresión génica entre bayas partenocárpicas se repitió durante tres temporadas (2003-2004; 2006-2007; y 2008-2009). Las muestras de yemas utilizadas en este estudio fueron colectadas mensualmente desde noviembre 2006 hasta septiembre de 2007, durante la mañana (aproximadamente 10:00 has) para evitar variaciones dependientes del ciclo circadiano. Las yemas entre noviembre y marzo corresponden a la etapa de crecimiento vegetativo de los sarmientos y es la etapa de formación de las yemas, a continuación ocurre la etapa de dormancia, durante el otoño/invierno desde abril a agosto y la salida de dormancia en septiembre. Todo el material vegetal una vez colectado fue transportado a 4 - 8°C y almacenado a menos -80°C hasta su procesamiento.

II.1.2 Oligonucleótidos partidores utilizados en esta tesis

Tabla 1. Secuencias nucleotídicas de los partidores utilizados en esta tesis

Gen	Secuencia (5'→3')	Temperatura de Annealing (°C)	Eficiencia	Amplificación pb
<i>VvADC</i>	Fw: GTTCTCTTGCTAGTGGACTTGCC Rv: ACGACTGTAGTTGTCTTCATTGCC	58	1,76	119
<i>VvARGI</i>	Fw: CCGTGAACAAGGCAAGCGATTCCG Rv: GCAGGATCAAGACAGTCCACATC	58	1,95	145
<i>VvODC</i>	Fw: GGGTGAACCTCCGGATGATAGC Rv: CTCGCTTCAGCTATCGCCCC	57	1,95	190
<i>VvSAMDC1</i>	Fw: TCCAAAAGATGTGAACCTGAGCC Rv: CAAGTAACTTACCCGAGATGTCAGC	58	1,76	107
<i>VvSAMDC2</i>	Fw: TGGGAATGAAGACGCTGATGAAG Rv: CCCTCCACCTCACCACACC	60	1,87	127
<i>VvSAMDC4</i>	Fw: CACTGCATGCTGATGTTGAAGG Rv: CTTAAGAACTTGCTCCTCTTCCTCG	58	1,8	191
<i>VvACL5-5</i>	Fw: CTCCTCTCTATCTCCAACCTCTCTC Rv: TCTTCCTCATAACCAACACTCTTCC	58	1,9	150
<i>VvSPDC1</i>	Fw: CCATTGATGCAAATGAGAGTGCTTGC Rv: TTATTCTATGGTTCATTGCTACTGCACC	60	1,85	242
<i>VvSPMS</i>	Fw: GTTAACCCAATTGAGAAGTTAGAAGGC Rv: GGCTATTTTCCCATACTGGAAGTGT	60	1,86	242
<i>VvPAO1</i>	Fw: ACATTGCCAACCTTCGGAGAGG Rv: AAGTAGGAGGCGAGGATCAGTG	60	1,99	135
<i>VvPAO2</i>	Fw: GGCCAAGAAGCCAAGGATTGTG Rv: CCGGTCACCACCAAACTGAGAAG	56	1,89	169
<i>VvPAO3</i>	Fw: AACACCCTCGCAAAGGTCTCGAC Rv: GCAACAATGGCAGCATCTGCAAC	58	1,82	129
<i>VvPAO4</i>	Fw: ACTCGGTGTTCCGTGATCGTAGTC Rv: AAATCCTCCTTCCGCACCCTC	58	1,96	140
<i>VvPAO5</i>	Fw: AAGCCATTCTCCTTCCAGTGC Rv: CCTCAACATCCATTCTGCCTACC	60	1,99	134
<i>VvACS</i>	Fw: GTTCATTGACCAACAGAGAGAGG Rv: TGTCAGCCCAACAGTAGAAGCC	58	2,03	119
<i>VvACO6</i>	Fw: AAGTGTATGGAGCAGAGGTTCAAGG Rv: ATGTTGGAGGTTGGAAGATGGC	58	1,8	125

<i>VvACO7</i>	Fw: AAGCTTGATGGTGAGAAAAGGGC Rv: TGCAGTTTCTTTATCCTCCAGGG	58	1,77	210
<i>VvGAPDH</i>	Fw: TTCCGTGTTCTACTGTTG Rv: CCTCTGACTCCTCCTTGAT	60	1,93	106
<i>VvUBQ</i>	Fw: GTGGTATTATTGAGCCATCCTT Rv: AACCTCCAATCCAGTCATCTAC	60	1,92	120

II.2 MÉTODOS

II.2.1 Extracción RNA total y síntesis de cDNA

El aislamiento y purificación del RNA total diversos tejidos vegetativos, y reproductivos se realizó a partir de 2 g de tejido, utilizando el método del CTAB descrito por Chang *et al.*, (1993). Se verificó la integridad y calidad del RNA total mediante la visualización en un gel de agarosa/formaldehído teñido con bromuro de etidio y por una relación de absorbancias a 260/280 nm mayor que 1,95. La concentración de los ácidos nucleicos fue determinada mediante el uso de un espectrofotómetro. Se realizaron 3 extracciones independientes y estos RNAs totales fueron tratados con DNaseI (amplification grade, Invitrogen). Posteriormente, para cada estadio y tejido específico se sintetizó el cDNA de cadena simple utilizando 2 µg de RNA y partidores oligo(dT) utilizando el kit Thermoscript RT PCR System, (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

II.2.2 Análisis de macroarreglo.

El proceso de confección de las membranas, la hibridización y la obtención de los datos, su normalización y confección de tablas de las trabajo fueron realizados por el equipo de trabajo de la Universidad Federico Santa María dentro del marco del proyecto DEGECHIVID. Las sondas de cDNA fueron marcadas con P³³ obtenidas a partir de la transcripción reversa de RNA de tejido floral (f), de bayas semilladas (bv) y bayas partenocárpicas (bp) en estadio I de desarrollo frutal. Se realizaron 3 extracciones independientes de RNA de cada tejido, las que son consideradas como réplicas biológicas. Para la comparación de las tres réplicas independientes se realizó una estandarización de

los datos crudos y una normalización de los mismos aplicando \log_e . Para la identificación de los genes expresados diferencialmente se aplicó una aproximación de modelos lineales mixtos (Wolfinger *et al.*, 2001, Yao *et al.*, 2004), utilizando el software SAS 8e (SAS Institute Inc., SAS OnlineDoc®, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999). Para el análisis de expresión se consideró la condición “bayas partenocárpicas” respecto de “bayas verdes” (bp/bv) y la inducción o represión de genes a aquellas accesiones que presentaban una tasa de cambio mayor o menor a 2 veces en 4 repeticiones, con un nivel de confianza del 95%.

II.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y clonamiento de los fragmentos de PCR en el vector p-GEM T

Para el aislamiento de fragmentos de los diferentes genes estudiados, se diseñaron los partidores a partir de secuencias disponibles en las bases de datos Degechivid (proyecto Genoma de la Vid I) y GENBANK, de acceso público. Para cada reacción de PCR se empleó 100 ng de ADNc de *Vitis vinifera* cv. Carmenère, 1,5 mM MgCl₂, 1 X PCR Buffer, 250 nM de cada primer, 200 nM dNTPs y 0,25 U Taq polimerasa (Invitrogen). Las condiciones de temperatura y tiempos para cada PCR fueron: una denaturación inicial a 95 °C durante 10 min, luego 35 ciclos de 95 °C por 40 s, 58 °C por 60 s y 72 °C por 60 s y finalmente 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X. Las bandas correspondientes fueron cortadas con un bisturí y extraídas desde el gel mediante el sistema EZNA Elution gel Kit (Omega Bio-Tek). Las bandas eludidas fueron verificadas mediante electroforesis en gel de agarosa 1% TBE 1X y posteriormente ligadas al vector pGEM-T (PROMEGA).

Los vectores recombinantes para la secuencias de interés se emplearon para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5 α . Las colonias recombinantes fueron seleccionadas en función del crecimiento en medio selectivo con ampicilina (100 μ g/ml) y por la capacidad de metabolizar X-Gal. Seguidamente, las colonias transformantes seleccionadas fueron crecidas a 37°C con agitación por toda la noche en medio LB líquido suplementado con ampicilina (100 μ g/ml). Luego, las células fueron precipitadas mediante centrifugación a 9000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente en DNA plasmidial se extrajo mediante el sistema EZNA Plamid Miniprep Kit I (Omega Bio-Tek) siguiendo las instrucciones del fabricante.

II.2.4: Secuenciación y análisis de las secuencias

La secuencia de los plásmidos recombinantes fue determinada a través del servicio de secuenciación de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Cada secuencia obtenida fue verificada en cuanto al número de ambigüedades y las bases leídas de acuerdo al tamaño de secuencia esperado y se identificó la región correspondiente al vector de clonamiento (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>). Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante los algoritmos BLASTn y BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) y de este modo se logró conocer el grado de similitud, determinado estadísticamente por el “e value”, con las secuencias disponibles en la base de datos NCBI

II.2.5 Búsqueda de secuencias y análisis *in silico*

En primera instancia se utilizaron secuencias parciales de genes expresados (EST) que fueron obtenidas de la base de datos de DEGECHIVID (<http://vitis.genomicafritos.cl>). Se usaron los algoritmos BLASTn y BLASTx disponibles en las base de datos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y luego una vez disponible la base de datos del genoma de *V. vinifera* (<http://www.genoscope.cnc.fr>) se utilizaron secuencias de genes ya descritos en otras especies para la búsqueda de secuencias completas. Para el análisis filogenético se identificaron secuencias relacionadas en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), se empleó el algoritmo BLASTp usando la secuencia aminoacídica deducida y completa para cada una de las putativas proteínas codificadas por los genes de *V. vinifera* analizados. Para construir la filogenia, las secuencias parciales o incompletas fueron excluidas. El programa Bioedit versión 9.0 fue utilizado para crear el alineamiento múltiple (Hall *et al.*, 1999). El alineamiento resultante fue empleado para crear el árbol filogenético por el método del vecino más cercano (neighbor-joining method; Saitou & Nei, 1987) usando la versión 3.1 del programa MEGA (Kumar, Tamura & Nei 2004).

II.2.6 PCR cuantitativa en tiempo real

Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando el kit Brilliant SYBR Green Master Mix (Stratagene), en un termociclador *DNA Engine Opticon 2 Cycler System* (MJ Research). Las condiciones utilizadas para las reacciones de amplificación fueron: una fase de desnaturalización inicial de 94 °C por 10 min, luego una fase de 40 ciclos de 94 °C por 20 s, 60 o 58°C según corresponda al par de partidores por 20 s y una fase de elongación de 72 °C por 20 s. Luego para identificar amplificaciones inespecíficas se acopló una fase de disociación lenta, desde los 60 °C hasta los 94 °C, con un incremento de 0,5 °C/seg. Con el objetivo de estimar la eficiencia de la reacción para cada par de partidores se utilizaron diluciones seriadas de cDNA proveniente de flores como templado y se construyeron curvas estándar Pfalff (2001). Cada reacción fue realizada por duplicado y se incluyeron dos controles negativos: RNA total libre de DNA de cada órgano y estadio del desarrollo analizado y agua. La fluorescencia fue determinada al final de cada etapa de elongación. El análisis de los datos obtenidos realizado de forma manual y la expresión fue normalizada respecto del gene *GADPH* (*VvGADPH*, NCBI/GenBank Database accession number CN938023) y *UBIQUITINA* (*VvUBQ*, TIGR Database accession number TC32075). Los genes *VvGADPH* y *VvUBQ* fueron seleccionados para la normalización de los datos debido a su consistencia en los niveles de transcriptos en todos los órganos estudiados y su utilización en anteriores publicaciones (Reid *et al.*, 2006). Como calibrador se utilizó la muestra “flores”, asignándole el valor nominal de 1. Para asegurar que los transcriptos de solo un gen habían sido amplificados, los productos de reacción (amplicones) fueron secuenciados y confirmada su pertenencia al gen analizado.

II.2.7 Análisis estadístico: Para la comparación estadística de los datos de qRT-PCR y contenidos de PAS se llevó a cabo un Anova de una vía previamente verificando los supuestos de normalidad y homocedasticidad. En los casos que no se cumplía se utilizaron transformaciones logarítmicas. Las medias fueron comparadas por el test de Tukey usando un $p < 0.05$ (Taucher, E. 2014).

II.2.8 Análisis de poliaminas

Para la extracción de PAS de los tejidos vegetales fue utilizado el método descrito por Marcé *et al.* (1995), según el cual se procede a la homogeneización de los tejidos vegetales

y la obtención de un extracto que contiene la fracción soluble en PCA al 5% (v/v). Por cada 300mg de material vegetal se adiciona 1ml de PCA 5% v/v y se mantienen los extractos a 4°C durante 8hs. Luego las muestras se centrifugan a 14.000rpm durante 20min y se recupera el sobrenadante. A 200µl de la fracción S (sobrenadante) se le agrega un volumen igual de solución saturada de NaCO₃, 20µl de HTD 100µM (estándar interno) y 2 volúmenes de solución de cloruro de dansilo (20 mg/ml acetona). La solución resultante se incubaba en oscuridad y a temperatura ambiente durante 14-18hs, para luego eliminarse el exceso de dansilo mediante el agregado de 100µl de solución de Prolina 100mg/ml y se mantienen en oscuridad durante otros 30min a temperatura ambiente.

Las poliaminas dansiladas se extraen con 500µl de tolueno, agitando con vortex y centrifugando 3 min y tomando 400 µl de la fase orgánica (superior). Las muestras se colocan al vacío y en oscuridad, conservando los extractos secos a -20°C hasta su análisis. Las poliaminas dansiladas anhidridas se redisuelven en 800µl de acetonitrilo antes del análisis por cromatografía líquida de alta presión (“High Pressure Liquid Chromatography”, HPLC). La identificación y cuantificación de las diferentes PAs se realizó por HPLC (Marcé *et al*, 1995). Para ello se utiliza una columna Pharmacia Biotech de fase reversa (100 x 4,6mm), C-18, con un tamaño de partícula de llenado de 5µm y con un diámetro de poro de 100Å precedida por una precolumna de características similares. La separación de las PAs dansiladas se lleva a cabo en un gradiente acetonitrilo/agua, tal como se indica en a continuación.

Tabla 2: Relación de tiempo y fase para la separación de poliaminas.

Tiempo	Fase
0 – 4 min	100% fase A
4 – 5 min	100 % fase A a 100 % fase B
5 – 9 min	100 % fase B
9 – 10 min	100 % fase B a 100 % fase A
10 – 15 min	100 % fase A

Fase A. 70:30 (v/v) acetonitrilo: agua
 Fase B. Acetonitrilo

Para poder normalizar los datos obtenidos y reconfirmar los tiempos de retención en cada cromatograma, se dansilaron 20µl de soluciones patrones de cada poliamina junto al estándar interno, HTD. Las soluciones patrones consisten en: diaminopropano 250mM (Dap); putrescina 250mM (Put); espermidina 250mM (Spd) y espermina 250mM (Spm).

III. RESULTADOS

III.1 ESTUDIO *in silico* DE LAS CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE GENES Y PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DE POLIAMINAS EN *VITIS VINIFERA*

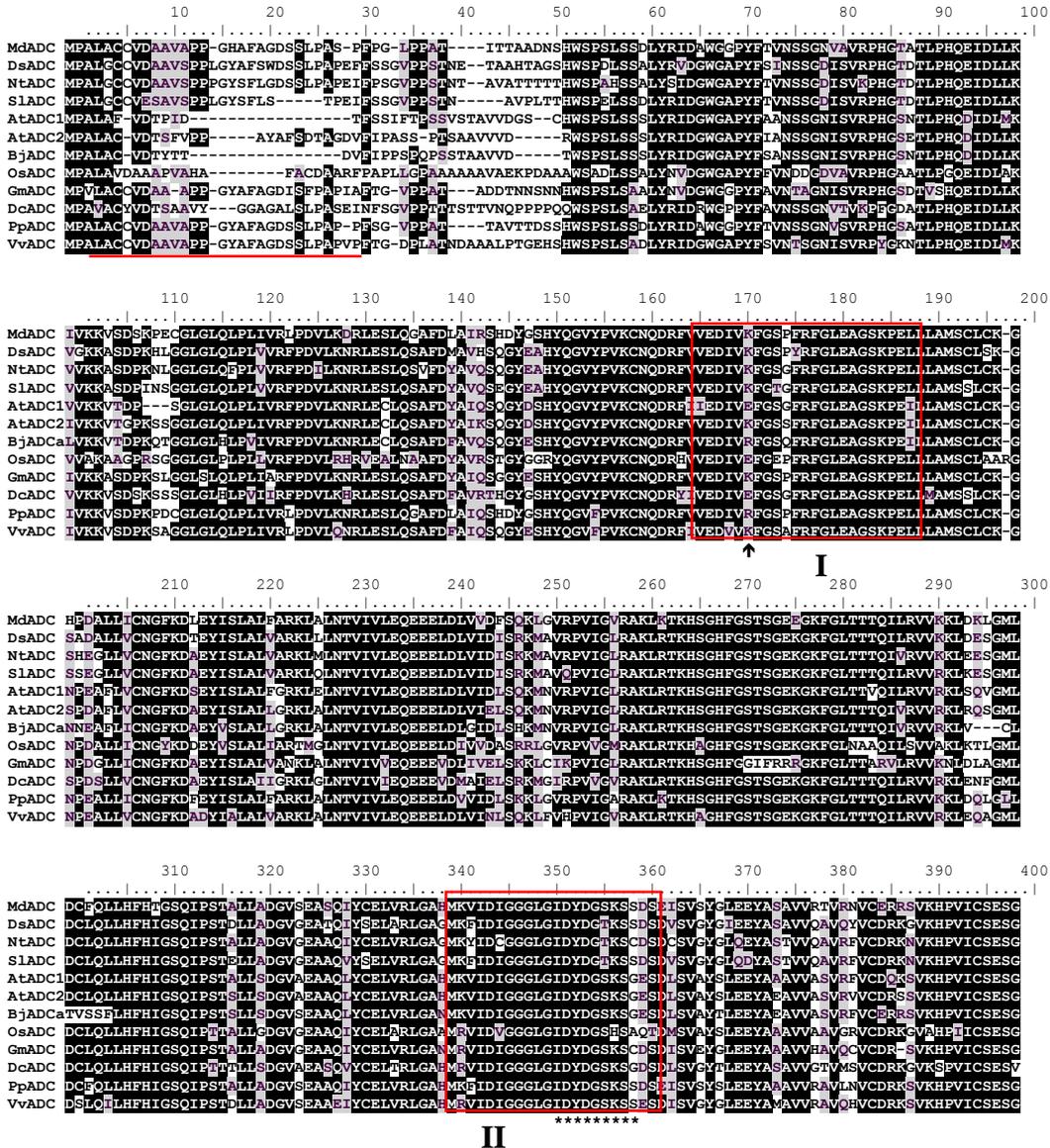
Las poliaminas como reguladores del crecimiento, se ven involucradas en el proceso de desarrollo de los frutos como se ha demostrado en una gran variedad de especies. Dentro de la vía metabólica de las poliaminas existen genes que no han sido descritos hasta este momento. Por lo tanto en esta sección se presentan los resultados del estudio *in silico*.

III.1.1 Identificación de secuencias codificantes para arginina descarboxilasa (ADC) en el genoma de la vid.

En la base de datos DEGECHIVID se encuentra un contig (CT046514) para ADC, (Genoscope: GSVIVT01024167001; NCBI: X96791.1, XP_002269030.1). Este contig consta de 2959 nucleótidos, un marco de lectura abierto (ORF) putativo de 2163 pb el cual codificaría una proteína de 720 aminoácidos y corresponde a la ADC de vid descrita por Primikirios y Roubelakis-Angelakis. (1999, CAA65585.1). Sin embargo, la secuencia de Carménère contiene un fragmento de 90 aa, en el extremo amino terminal adicional. Utilizando la base de datos Genoscope, se localizó el gen *VvADC* en el cromosoma 3 del genoma de la vid.

El análisis comparativo de *VvADC* y las secuencias homólogas de otras especies vegetales mostró un alto grado de identidad de secuencia: ADC de manzana (74%), tabaco (72%), tomate (71%), ADC1 y ADC2 de *Arabidopsis* (68%) (Figura 4). Este análisis permite localizar dos motivos conservados en las ADC de clase 2: el motivo I (posición 154 – 172) que incluye el sitio de unión a piridoxal fosfato (K157) y el motivo II (posición 335-348) que incluye al putativo sitio de unión al sustrato (I/L)DIGGGLGI. Además se ubicó un sitio de unión a difluorometil ornitina, inhibidor de la ODC (DFMO, C547). Mediante la iPSORT, se encontró la presencia de un péptido señal de destino a cloroplasto en el extremo N-terminal: MPALACCVDA AVAPP GYAFA GDSSL PAPVP. Con la finalidad de establecer las relaciones filogenéticas entre la ADC de vid y las ADC de otras especies vegetales se generó un árbol filogenético con el método neighbor-joining, el cual mostró que *VvADC* está más relacionada con secuencias de plantas leñosas conformando

un clado diferente al de las otras especies herbáceas dentro de este conjunto de secuencias analizado (Figura 5).



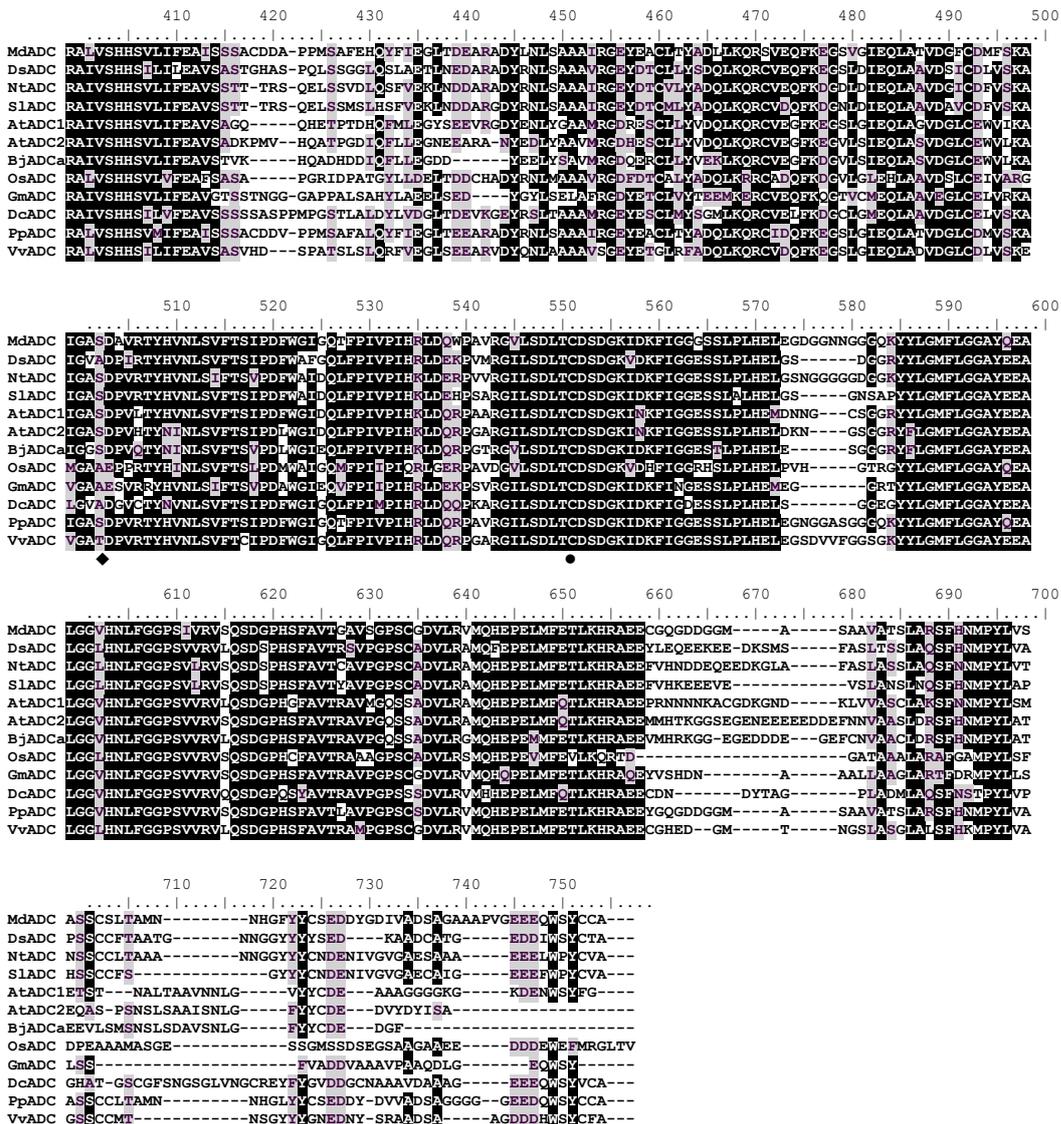


Figura 4: Comparación de la secuencia aminoacídica deducida de ADC de diferentes especies vegetales. Los residuos idénticos están indicados por cajas negras. En un recuadro rojo de marca los motivos I que incluye la Lys (K 157, \uparrow) de unión a piridoxal fosfato y el motivo II con los residuos del putativo sitio de unión a sustrato (*). Además están señalados la Cys (C547) de unión a DFMO (\bullet) y el sitio putativo de procesamiento de la ADC (\blacklozenge).

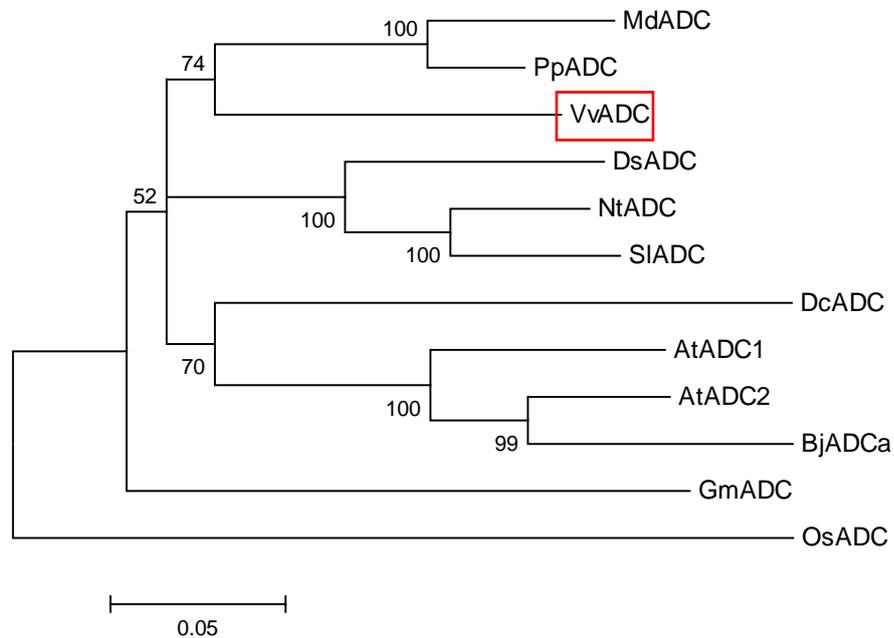


Figura 5: Árbol filogenético de las ADC de diferentes especies vegetales. Se detallan los valores bootstrap. Los números de accesoión de las secuencias son los siguientes: gi|56377971| *Malus x domestica* (MdADC), gi|6646840| *Datura stramonium* (DsADC), gi|40645472| *Nicotiana tabacum* (Nt), gi|59668404| *Solanum lycopersicum* (Sl), gi|63002634| *Prunus persica* (PpADC), gi|15227223| ADC1 *Arabidopsis thaliana* (AtADC1), gi|15236176| ADC2 *Arabidopsis thaliana* (AtADC2), gi|6715492| *Brassica juncea* (BjADC), gi|47716667| *Oryza sativa* (OsADC), gi|1163181| arginine decarboxylase *Glycine max* (GmADC), gi|2102689| *Dianthus caryophyllus* (DcADC) y XP_002269030.1 *Vitis vinifera* (VvADC).

III.1.2 Identificación de secuencias codificantes para arginasa (*ARGI*) en el genoma de la vid.

En la base de datos DEGECHIVID (VVCCGS1013H10.g) se encuentra una secuencia singleton de 851 nucleótidos anotada como una putativa arginasa *VvARGI* (XP_002280690). La secuencia aminoacídica deducida es de 341 aminoácidos, y la base de datos Genoscope entrega una única secuencia genómica codificante, ubicada en el cromosoma 15 del genoma de la vid.

El alineamiento múltiple de la putativa proteína *ARGI* de vid muestra un alto nivel de conservación de su estructura primaria, siendo 91, 88, 87 y 85% idéntica a las secuencias de arginasa reportadas para *Ricinus communis*, *Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis thaliana* (*AtARGI1*) y maíz, respectivamente. La conservación aminoacídica se refleja en los elevados porcentajes de identidad obtenidos entre las 12 secuencias analizadas, siendo el menor valor de 68% entre *VvARGI* y la secuencia de soja. En *VvARGI* se encuentran los sitios característicos para la unión al cofactor Mn^{+2} y también los residuos de unión al grupo guanidinio del sustrato. En el alineamiento también queda en evidencia que la mayor divergencia de secuencia está en la región N-terminal (Figura 6). La búsqueda de señales de destino en iPSORT no dio resultado positivo. El elevado porcentaje de identidad entre las 12 secuencias de arginasa de plantas muestra un elevado nivel de conservación de esta proteína debido a una función importante de la misma previo a los procesos de especiación vegetal. Las relaciones filogenéticas no denotan un agrupamiento de acuerdo a grupos como leñosas, herbáceas, monocotiledóneas o dicotiledóneas (Figura 7).

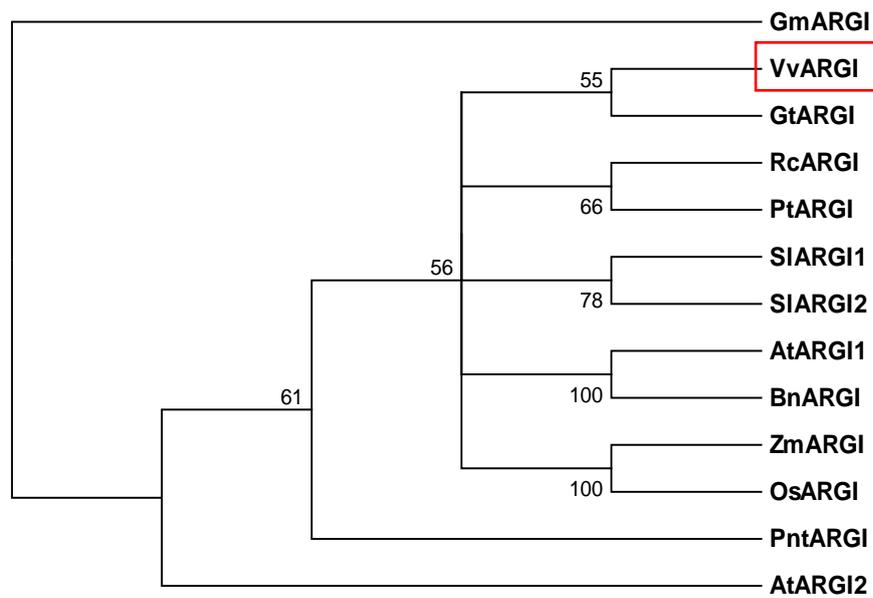


Figura 7: Árbol filogenético para arginasa de especies vegetales. Se detallan los valores bootstrap. Las secuencias incluidas son: GmARGI de *Glicine max* (O49046.1), VvARGI de *Vitis vinifera* (XM_002280654.1), GtARGI de *Gentiana triflora* (BAI22841.1), RcARGI de *Ricinus comunis* (XP_002511686.1), PtARGI de *Populus trichocarpa* (XP_002301277.1), SIARGI1 y SIARGI2 de *Solanum lycopersicum* (AAV36809.1 y AAV36808.1 respectivamente), BnARG de *Brassica napus* (AAK15006.1), ZmARGI de maíz (ACF85494.1), OsARGI de *Oryza sativa* (NP_001052013.1), PntARGI de *Pinus taeda* (AF130440_1) AtARGI1 y AtARGI2 de *Arabidopsis thaliana* (NP_192629.1 y NP_192626.1 respectivamente).

III.1.3 Identificación de secuencias codificantes para S-adenosil-metionina descarboxilasa (SAMDC) en el genoma de vid.

Se seleccionó una secuencia anotada como SAMDC VVCCGC1003E04.g (DEGECHIVID) y fue localizada en el cromosoma 11. Tassoni *et al.*, (2007) describieron un gen SAMDC (AJ567368.2), el que está localizado en el cromosoma 1. La búsqueda de secuencias parálogas en la base de datos del genoma de la vid arrojó 2 secuencias adicionales localizadas en el cromosoma 14 y 5, respectivamente. En el presente trabajo estas secuencias se denominaron de acuerdo al porcentaje de identidad con respecto a las secuencias descritas de *Arabidopsis thaliana* y en el caso de VvSAMDC11, su numeración corresponde al cromosoma donde se localiza en el mapa físico del genoma de la vid, ya que su mayor porcentaje de identidad corresponde a 57% con la SAMDC de orquídea. En la tabla 3 se detallan los números de acceso para las 4 secuencias analizadas.

Tabla 3: Detalle de cada una de las secuencias SAMDC. Se detalla el nombre asignado en este trabajo, grupo de ligamiento al que pertenecen, código de GenBank, de la base de datos Genoscope y descripción donde además se denota el código DEGECHIVID en el caso que corresponda.

Nombre	NCBI	Genoscope	Descripción
VvSAMDC1	XM_002272143.1 AJ567368.2	GSVIVT00021193001	Cromosoma 1 gi 86990288:403-1479 Vitis vinifera samdc gene for S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme, mRNA (Tassoni, 2007), 66% AtSAMDC3
VvSAMDC4	XM_002282680.1	GSVIVT00038126001	Cromosoma 14 gi 18152533 emb CAD20741.1 S-adenosyl-L-methionine decarboxylase [Vitis vinifera] fragmento62% AtSAMDC1
VvSAMDC2	XM_002272143.1	GSVIVT00017121001	Cromosoma 11 VVCCGC1003E04.g XP_002272179.1 Vitis vinifera hypothetical protein LOC100241620 (LOC100241620), mRNA
VvSAMDC3	XM_002277280.1	GSVIVT00019871001	Cromosoma 5 gi 157336382 emb CAO71067.1 unnamed protein product [Vitis] 63% AtSAMDC4

La secuencia aminoacídica deducida para VvSAMDC2 es de 387 aa, VvSAMDC4 de 360aa, VvSAMDC3 de 350 aa y para VvSAMDC1 de 360 aa. El análisis de las secuencia de SAMDC muestra un conjunto de motivos conservados asociados a distintos elementos de la función de la proteína. Existen tres residuos de Glu del sitio de activación y el motivo YVLSESS que posee un residuo de Ser, a partir de la cual se forma el piruvato durante la activación de la enzima que se encuentra conservado (Figura 8). Otro motivo presente es

PEST que está asociado a la proteólisis de la enzima. El análisis comparativo de las secuencias muestra que VvSAMDC1 comparte un 74% de identidad con VvSAMDC4, 75% con las proteínas de *R. communis* y de manzana y un 66% con la SAMDC3 de *Arabidopsis*. Por su parte, VvSAMDC4 tiene una elevada similitud con las secuencias de SAMDC2 de manzana, tabaco y las SAMDC1, 2 y 3 de *Arabidopsis*, con 72%, 70%, 62%, 61% y 62% de identidad respectivamente. VvSAMDC2 se asemeja más a las secuencias de especies monocotiledóneas (57% de identidad SAMDC de orquídea) que a las secuencias de dicotiledóneas (50% *I. batata* y 36% con *P. persica*). La VvSAMDC3 tiene su mayor porcentaje de identidad con la AtSAMDC4 con 63%: La identidad es menor con las otras SAMDC de vid, 38% con VvSAMDC1 y VvSAMDC4, y 36% con VvSAMDC2. Los niveles de identidad se ven reflejados en el árbol filogenético de la Figura 9. Al igual que el gen descrito VvSAMDC1, los 3 restantes putativos genes para SAMDC no presentan intrones en el marco de lectura principal.

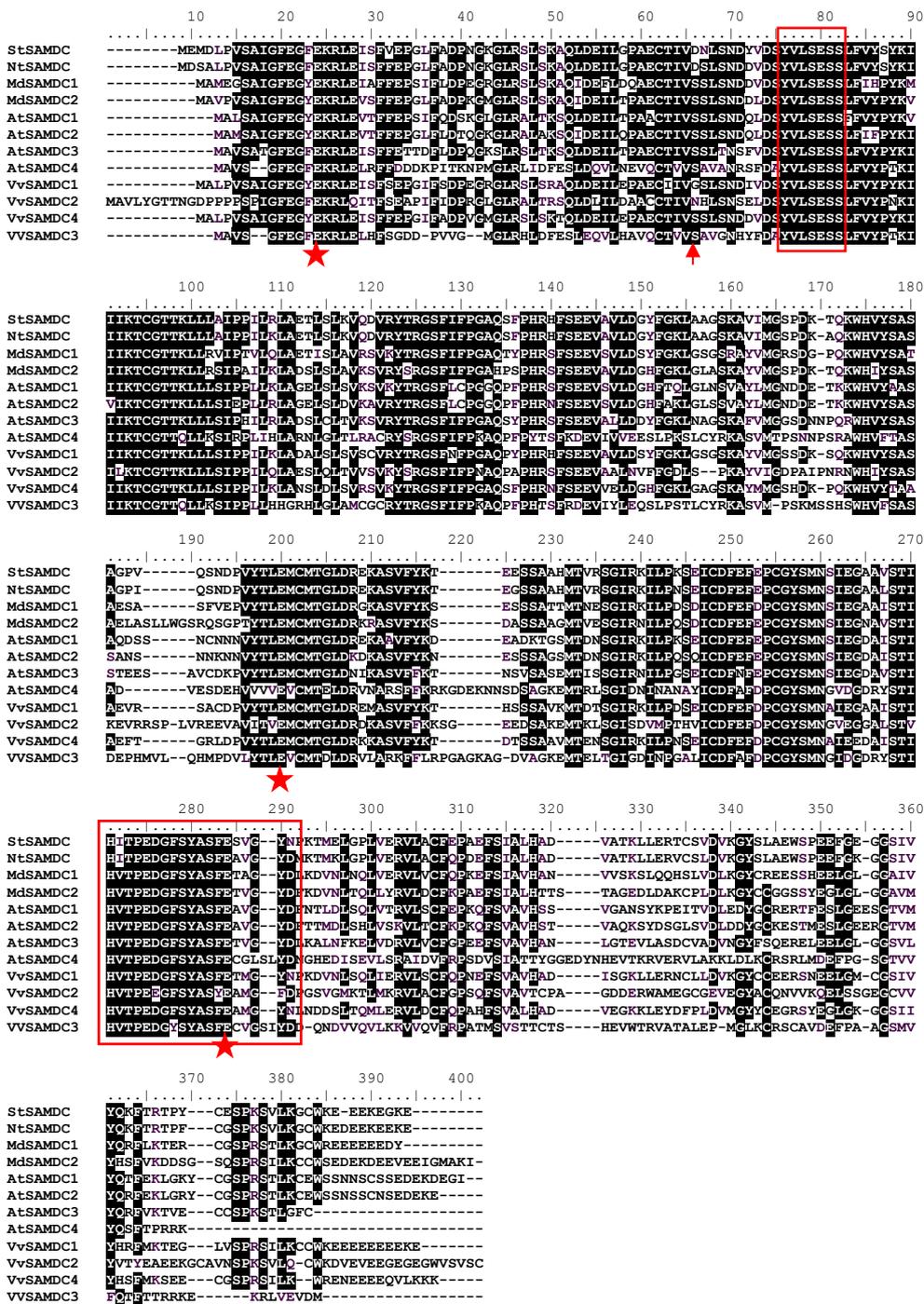


Figura 8: Comparación de la secuencia aminoacídica de SAMDC de diferentes especies vegetales. El alineamiento múltiple fue realizado usando el programa Clustal W Sequence Alignment (Altschul *et al.*, 1990). Los residuos idénticos están indicados por cajas negras. Los residuos de ácido glutámico importante en humanos están marcados con estrellas y la ubicación del sitio de procesamiento de la pro enzima está marcado con una flecha. Con recuadros rojos se demarcan la región importante en el clivaje de la proteína y la secuencia PEST de degradación para un rápido recambio de la proteína.

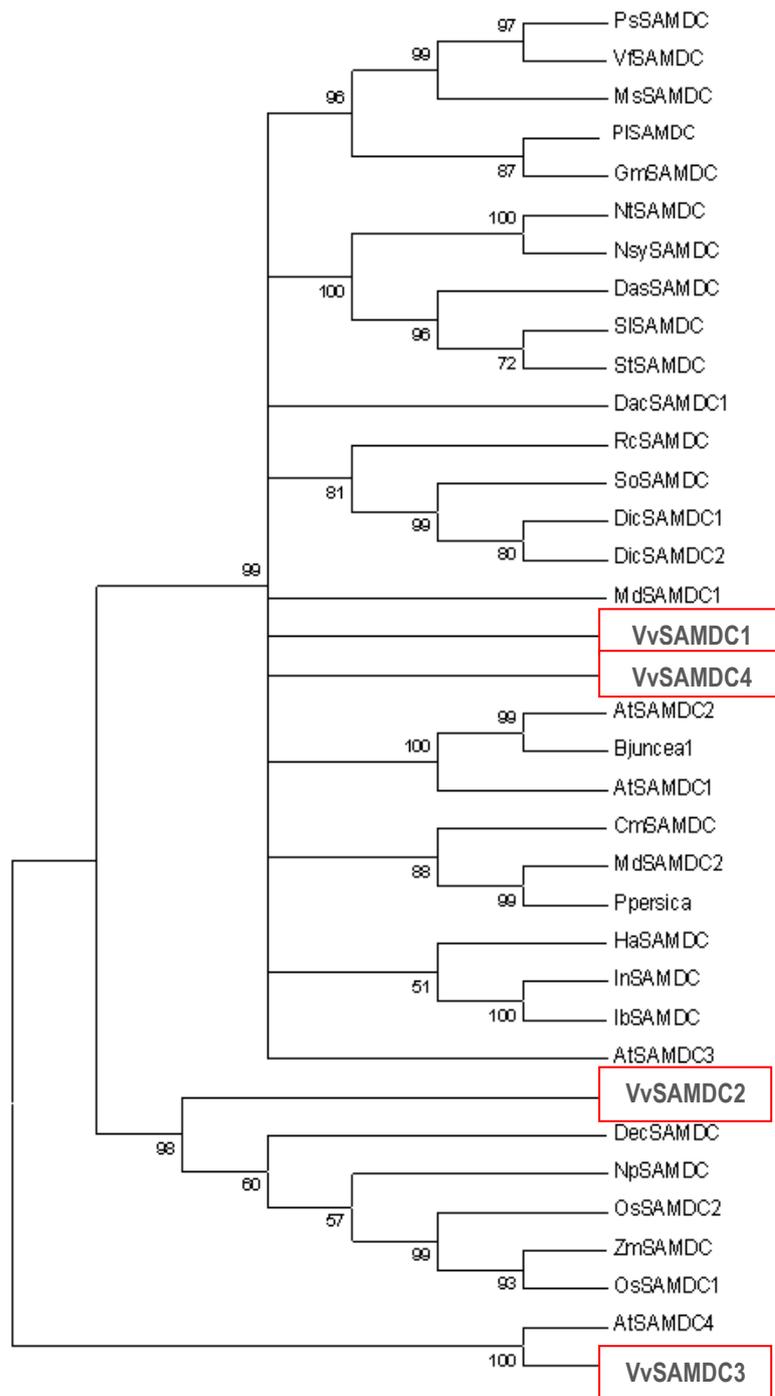


Figura 9: Análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas deducidas para SAMDC de plantas. Se detallan los valores bootstrap significativos en los nodos del árbol. Las secuencias incluidas son las siguientes: *Arabidopsis thaliana* AtSAMDC1, AtSAMDC2, AtSAMDC3, AtSAMDC4 (U63633, AJ251899, AAT06473 y NP_197394.1 respectivamente), *Brassica juncea* BjSAMDC (CAA65044), *Citrofortunella mitis* CmSAMDC (AF512545), *Datura stramonium* DsSAMDC (Y07768), *Daucus carota* DcSAMDC1(AF334029), *Dendrobium crumenatum* DecSAMDC (AF420239), *Dianthus caryophyllus* DicSAMDC1 y DicSAMDC2 (U38526 y U38527 respectivamente), *Glycine max* GmSAMDC (AF488307), *Helianthus annuus* HaSAMDC (AF066078), *Ipomea batatas* IbSAMDC (AF291761), *Ipomea nil* InSAMDC (U64927), *Malus domestica* MdSAMDC1 y MdSAMDC2 (AB077441 y AB077442 respectivamente), *Medicago*

sativa MsSAMDC (ABO77440) *Narcissus pseudonarcissus* NpSAMDC (AY232672), *Nicotiana sylvestris* NsSAMDC (AB015609), *Nicotiana tabacum* NtSAMDC (AF033100), *Solanum lycopersicum* SisSAMDC (ABQ42184), *Solanum tuberosum* StSAMDC (AAB32507), *Spinacia oleracea* SoSAMDC (X81414), *Vicia faba* VfSAMDC (AJ250026), *Narcissus pseudonarcissus* NpSAMDC (AY232672), *Oryza sativa* OsSAMDC2 y OsSAMDC1 (AJ251899 y Y07766 respectivamente), *Phaseolus lunatus* PisSAMDC (BAB83763.1) *Pisum sativum* PsSAMDC (U60592), *Prunus persica* PpSAMDC (CAG28949.1), *Ricinus communis* RcSAMDC (EEF47640), *Zea mays* ZmSAMDC (Y07767), en recuadros rojos *Vitis vinifera* VvSAMDC3, VvSAMDC4, VvSAMDC11 y VvSAMDC1.

III.1.4 Identificación de secuencias codificantes para aminopropil transferasas en el genoma de vid.

Inicialmente la búsqueda en la base de datos DEGECHIVID identificó tres secuencias que se describen a continuación. Primero se identificó un contig correspondiente a una putativa SPD sintetasa, **VvSPDS1** (Genoscope: GSVIVT00028846001; NCBI: XM_002263726.1) cuyo transcrito de 894 pb codificaría para una proteína de 297 aminoácidos que se encuentra en el cromosoma 1 del genoma de la vid. La segunda secuencia identificada corresponde a una putativa termoespermina sintetasa (Genoscope: GSVIVP00019965001; NCBI: XM_002281846.1). Esta secuencia corresponde a un mensajero deducido de 1287 nucleótidos y presenta un marco de lectura abierto que codificaría una proteína de 329 aa y se localiza en el cromosoma 5 de la vid, por lo que en adelante esta secuencia génica será denominada **VvACL5-5**. La tercera secuencia identificada codificaría para una putativa espermina sintetasa, denominada **VvSPMS** (Genoscope: GSVIVT00006512001; NCBI: XM_002270754.1) y su secuencia aminoacídica es de 369 aa.

Posteriormente la revisión en el genoma de la vid (Genoscope) entregó dos putativos genes, uno en el cromosoma 4, **VvACL5-4** (Genoscope: GSVIVT00032257001, NCBI: XP_002281111.1) y otro en el cromosoma 17 denominado **VvSPDI7** (NCBI: XM_002270754.1). El tamaño de las proteínas putativas es de 336 aa y 369 aa respectivamente. Los nombres asignados son en función del análisis de secuencia. El análisis comparativo de las secuencias aminoacídicas de estas putativas aminopropiltransferasas de vid conjuntamente con las Spd, Spm y termoespermina sintetisas de *A. thaliana* (Figura 10), muestra la presencia de un motivo rico en glicina GGGDG de unión al sustrato S-adenosil metionina descarboxilada y la conservación de

aminoácidos de unión a Spd y Put, los cuales son clave para la actividad catalítica. El árbol filogenético de las secuencias aminoacídicas espermidina/espermina sintetasa muestra 4 grupos diferenciados (Figura 11). Por un lado **VvSPDS1** se agrupa en el mismo clado con AtSPDS1 y AtSPDS 2 con las que posee una identidad de secuencia de 80 y 78% respectivamente; mientras que la identidad con AtSPMS es de 58% y con AtACL5 es de 22%. **VvSPMS** se agrupa con AtSPMS, presentando entre ellas un porcentaje de identidad de secuencia de 77%. Por su parte con AtSPS1, AtSPDS2 y AtACL5 el porcentaje es menor 55%, 54% y 21% respectivamente. Las proteínas hipotéticas de los putativos genes identificados en los cromosomas 4 y 5 denominados **VvACL5-4** y **VvACL5-5**, tienen mayor porcentaje de identidad con AtACL5 con 75 y 61% respectivamente, mientras que con AtSPM, AtSPDS1 y AtSPD2 el porcentaje de identidad no supera el 25%. Finalmente, la comparación de la secuencia aminoacídica correspondiente a **VvSPDS17** con las proteínas de *A. thaliana* presenta una identidad de secuencia de 52 y 51% con las AtSPDS1 y AtSPDS2 y 46% con AtSPMS, con AtACL5 solo comparte un 20% de su secuencia.

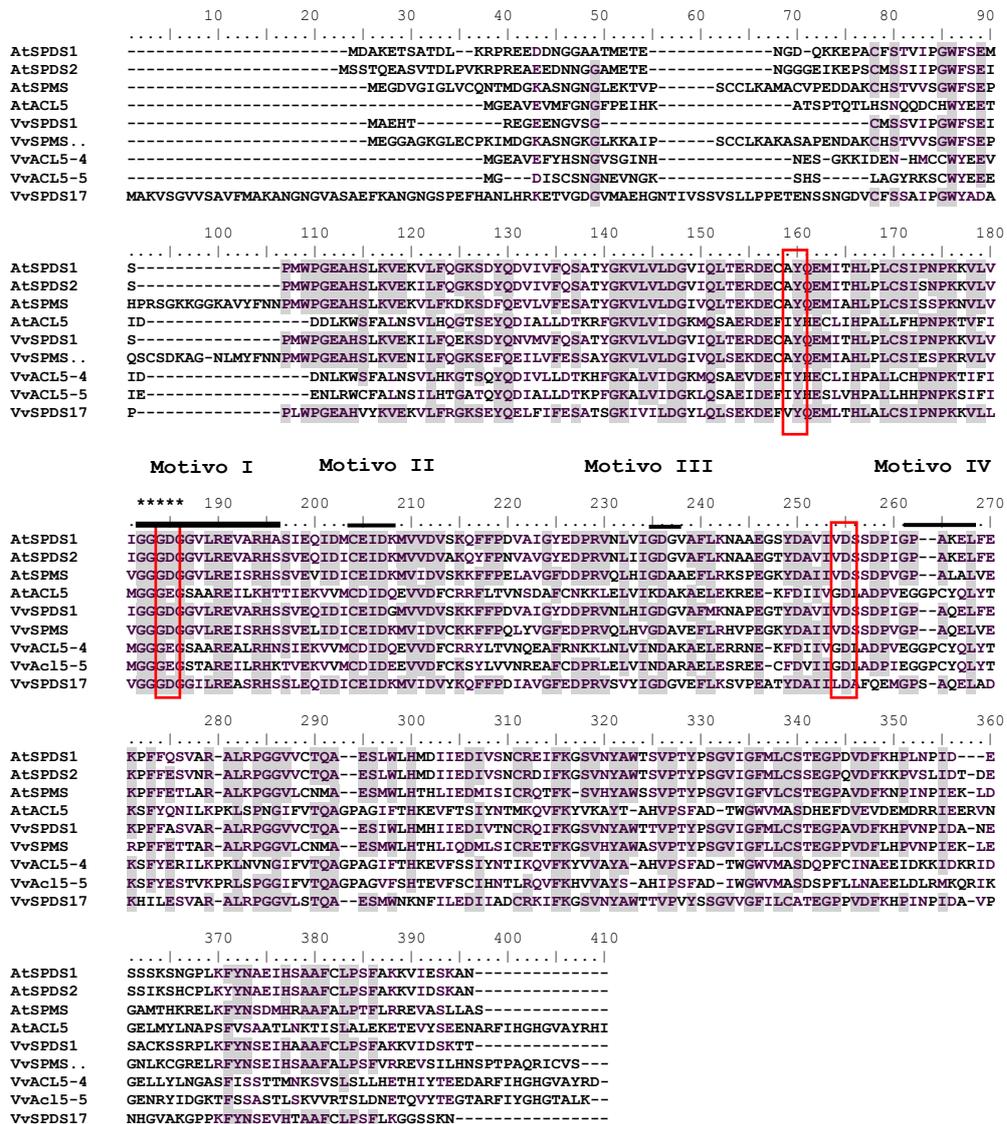


Figura 10: Comparación de la secuencia aminoacídica deducida de Aminopropil transferasas *Arabidopsis thaliana* y *Vitis vinifera*. El alineamiento múltiple fue realizado usando el programa Clustal W Sequence Alignment (Altschul *et al.*, 1990). Las secuencias incluidas son: AtSPDS1 (AJ251296), AtSPDS2 (AJ251297), AtSPMS (NP_568785.1), AtACL5 (NP_568376.1), las proteínas hipotéticas VvSPDS1 (XP_002263762.1), VvSPMS (XP_002270790.1), VvACL5-4 (XP_002281111.1), VvACL5-5 (XP_002281882.1) y VvSPDS17 (XP_002270790). Los residuos idénticos están indicados por cajas grises, con recuadro rojo están señalados los aminoácidos catalíticos que interaccionan con Put y SPD y con * el motivo involucrado en la unión de SAM descarboxilado. (Korolev *et al.*, 2002).

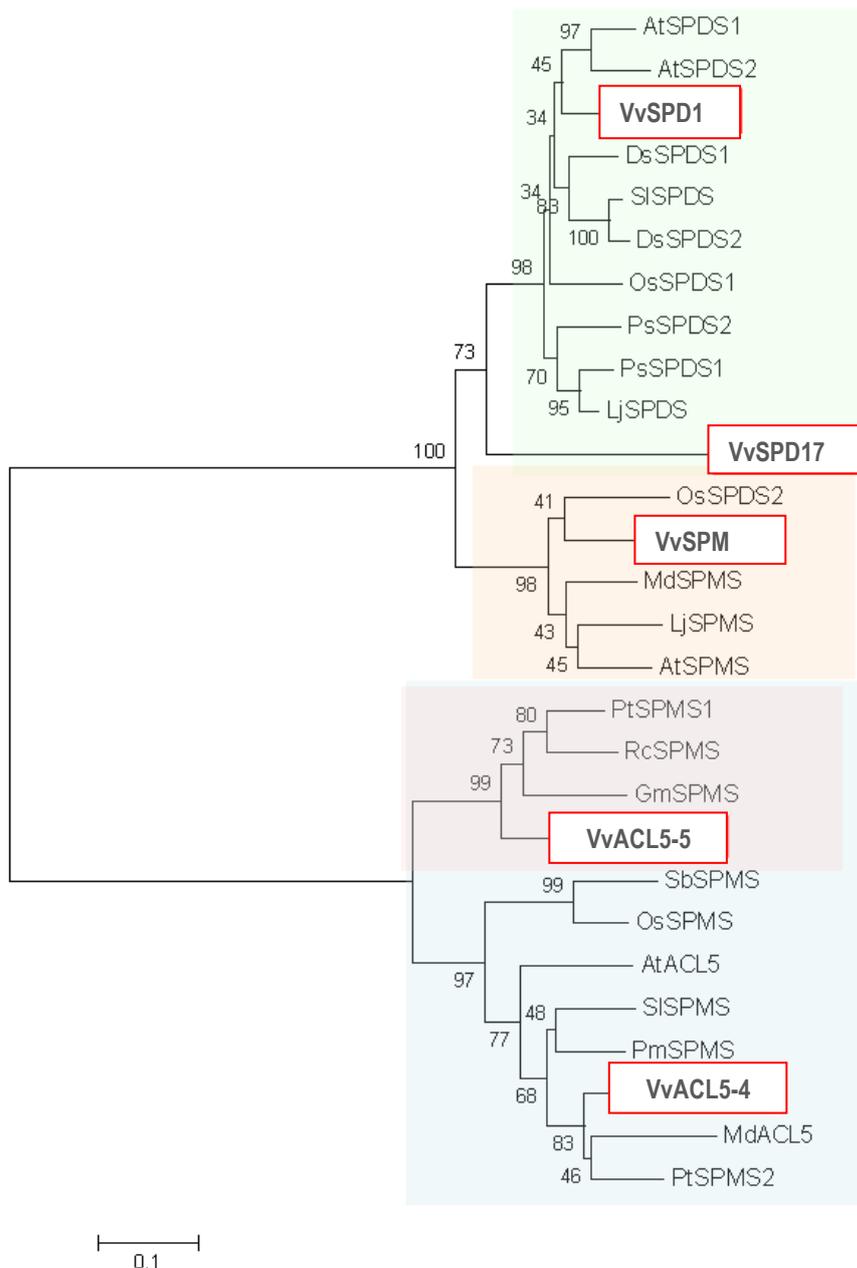


Figura 11: Árbol filogenético para aminopropil transferasas de plantas. Se detallan los valores bootstrap. Las secuencias incluidas son las siguientes: *Arabidopsis thaliana* AtSPDS1 (AJ251296), AtSPDS2 (AJ251297), AtSPMS (NP_568785.1) y AtACL5 (NP_568376.1), *Pisum sativum* PsSPDS1 (AF043108.1) y PsSPDS2 (AF043109), *Lotus japonicus* LjSPDS, (AM494000) y LjSPMS, (AM494001), *Oriza sativa* OsSPDS1 (AJ251298), OsSPDS2 (AB098063) y OsSPMS (NP_001046395.1), *Solanum lycopersicum* SISPDS (AJ006414) y SISPMS (CAE54353.1), *Malus domestica* MdSPMS (BAE19758.1), MdACL5 (AB204521.1), *Glycine max* GmSPMS (ACU24632.1), *Sorghum bicolor* SbSPMS (XP_002460285.1), *Populus trichocarpa* PtSPMS1 (XP_002312526.1) y PtSPMS2 (XP_002308531.1), *Ricinus communis* RcSPMS (XP_002516774.1), *Plantago major* PmSPMS (CAJ43615.1), DsSPDS1 (Y08252) y DsSPDS2 (Y08253) y en recuadros rojos *Vitis vinifera* VvSPDS1 (XP_002263762.1), VvACL5-4 (XP_002281111.1) VvACL5-5 (XP_002281882.1), VvSPMS (XP_002270790.1) y VvSPDS17 (XP_002270790.1).

III.1.5 Identificación de genes para poliamina-oxidasa (PAO) en el genoma de vid.

Para poliamina oxidasa se identificaron dos secuencias putativas de la base de datos DEGECHIVID: CT304549 y VVCCGC2030C02.b. La identidad de estas secuencias fue analizada mediante alineamientos múltiples utilizando las bases de datos públicas Genoscope y NCBI. Estas secuencias se denominaron *PAO1* (CT304549) y *PAO5* (VVCCGC2030C02.b). El primer gen analizado de PAO, *VvPAO1* (GSVIVP00002692001 de Genoscope, XM_002267631.1 de NCBI), presenta un marco de lectura abierto putativo de 1488 pb que codifica para una proteína de 495 aa. Por su parte, *PAO5* corresponden a las secuencias: GSVIVT00014490001 de Genoscope y XM_002280595.1 de NCBI con 3771 pb y codifica para una proteína de 1256 aa. Adicionalmente a los putativos genes para PAO evaluados se realizó una búsqueda en la base de datos del genoma de la vid lo que arrojó la presencia de al menos 4 secuencias adicionales (*PAO2*: GSVIVT00016561001, *PAO3*: GSVIVT00018843001, *PAO4*: GSVIVT00028738001, *PAO6*: GSVIVT00027608001) las que se incluyeron en el análisis de secuencia. En *PAO5* y *PAO6* sólo se incluyeron las regiones 184-756 y 128-609 respectivamente, excluyendo las regiones sin homología. El alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de PAOs de vid y de otras especies vegetales se muestra en la Figura 12, donde se han marcado las regiones de unión a sustrato, de unión a FAD y aminoácidos implicados en el dominio de unión al sustrato y en el sitio catalítico con la posición referida a la PAO de maíz.

A continuación se construyó un árbol filogenético de las secuencias aminoacídicas deducidas de proteínas de poliamina oxidasa de organismos vegetales cuyo resultado se muestra en la Figura 13. Del análisis del árbol filogenético es posible observar que la secuencia *PAO1* se agrupa junto con la secuencia de maíz y de avena con las que tiene un porcentaje de identidad de 63% y 60% respectivamente. Mientras que con otras proteínas de especies dicotiledóneas como *Arabidopsis* (*AtPAO1*) y manzana (*MdPAO1*) el grado de identidad es menor (43% y 40% respectivamente, Figura 13).

Con respecto a las 4 secuencias para PAO de vid restantes, *PAO2* presenta 57% de identidad con *ATPAO5*, *PAO3*: 79% *ATPAO2*, *PAO4*: 75% con *ATPAO1* y *PAO6* 18% con *ATPAO4*. Para *PAO5*, se observó un nivel bajo de identidad con las PAOs analizadas (26% con *AtPAO2*, 25% con *ATPAO3* y 20% con *ZmPAO*), *PAO5* se agrupa dentro del tercer grupo de PAOs propuesto por Moschou *et al.*, (2008b). Las PAOs del tercer tipo se caracterizan por poseer además del grupo poliamina oxidasa, un grupo SWRIM, de unión a DNA, presente en proteínas involucradas en el remodelado de la cromatina y un dominio

conservado de desmetilación de histonas (Shi *et al.*, 2004), dominios encontrados en la secuencia deducida correspondiente a PAO5. Por lo tanto, para PAO5 se realizó un alineamiento múltiple con representantes de la familia de las lisina desmetilasa donde se observó una elevada identidad de secuencia 72% con una LSD1 putativa de *R. communis* (XP_002510487.1), 52% con AtLDL3(NP_193364.5), 55% con OsAO (ABB47924.2) y 17% AtLDL1 (NP_176471.1, Figura: 14).

La búsqueda, en el genoma de la vid, de copias de los genes involucrados en el metabolismo de poliaminas ha dado información acerca de la redundancia posible de algunos de los genes involucrados. ADC y ARG1 se presentan como genes de copia única. Por otra parte la SAMDC y las aminopropil transferasa presentarían al menos 4 genes putativos, cada familia. Por último, las PAO que también mostraron estar en varias copias en el genoma de la vid. Un grupo de estas fueron evaluadas mediante qRT-PCR.

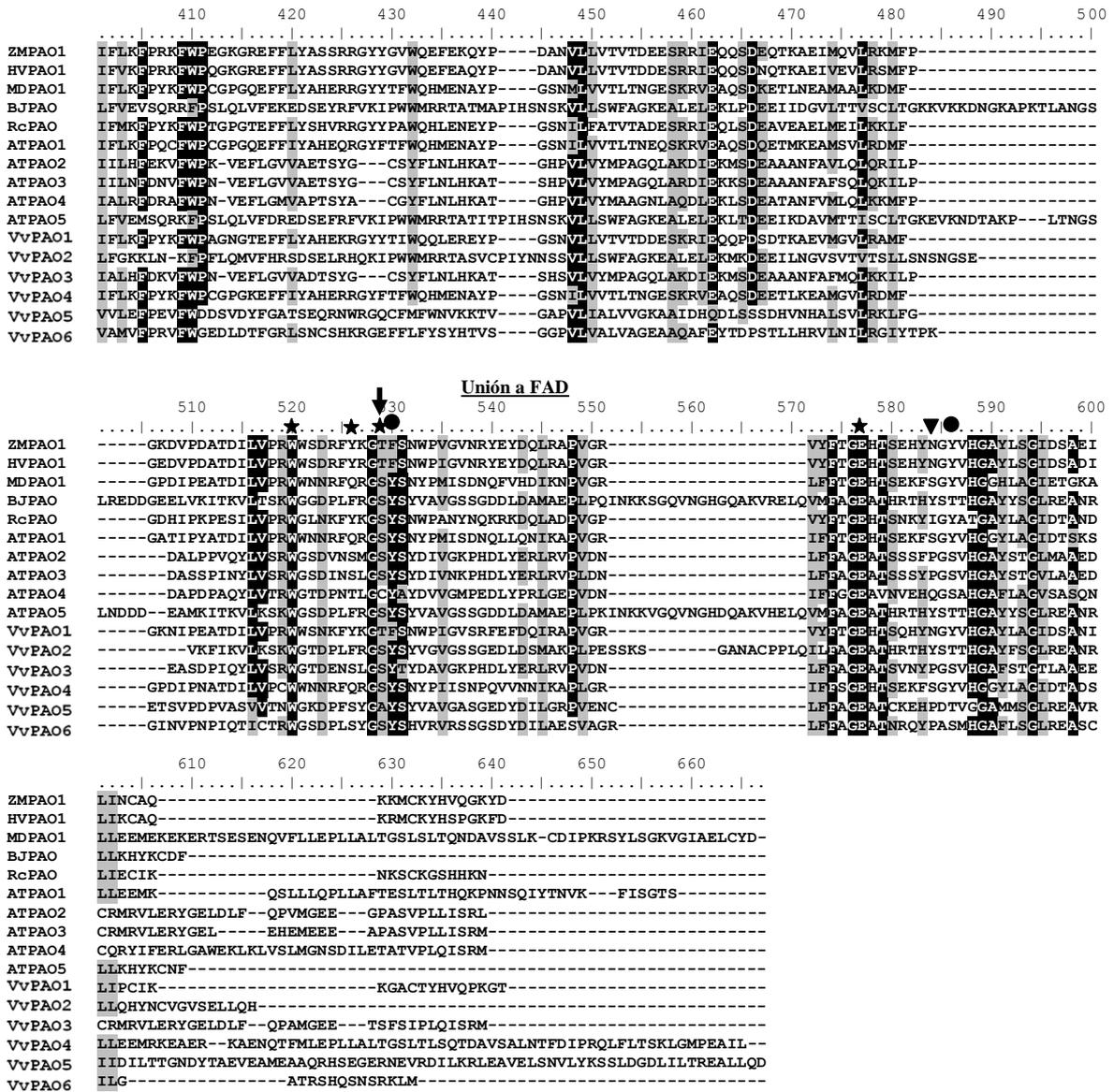


Figura 12: Alineamiento de la secuencia aminoacídica de amino oxidasas dependientes de FAD de plantas. El péptido señal de ZMPAO está subrayado. El porcentaje de identidad es relativo a ZPAO. Los residuos idénticos están indicados por cajas negras. La posición homóloga al residuo Cys 452 de unión covalente al átomo C8 alfa de flavina de la proteína humana MAO-A está señalada con una flecha (↓). Los residuos de ZMPAO involucrados en el unión a FAD (★), centro catalítico (• entrada en el túnel y ▼ posicionamiento del anillo flavina) y el residuo glicosilado en ZPAO (■, Binda *et al.*, 1999).

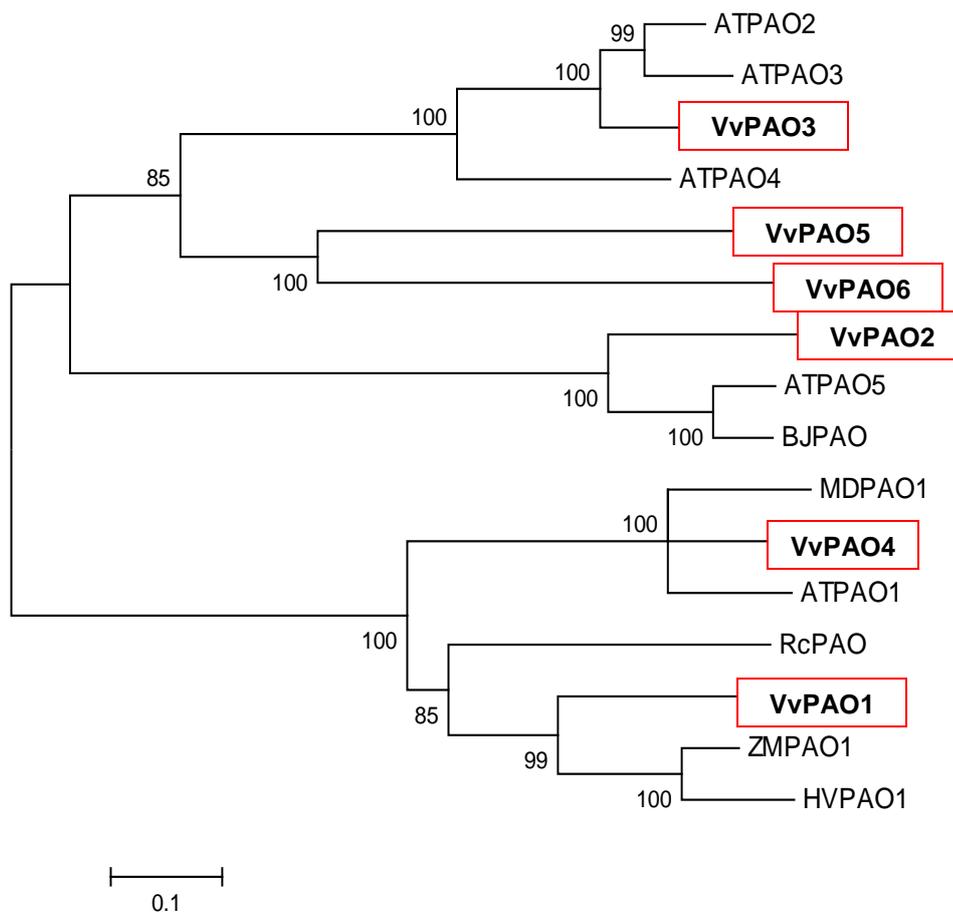


Figura 13: Árbol filogenético de PAOs de plantas: Relaciones filogenéticas entre las secuencias de poliamino oxidasas: El árbol filogenético fue generado por el programa MEGA v3.1 a partir de un alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas deducidas para las secuencias putativas PAO de la vid y de las proteínas homólogas conocidas en plantas. Se detallan los valores bootstrap. Los números de accesoión son los siguientes: *Zea maiz* ZM gi|162459777|, *Hordeum vulgare* HV gi|14485485|, *Malus domestica* MD gi|112293230|, RC gi|255540703|, BJ gi|27543472| *Arabidopsis thaliana* AtPAO1 gi|15240690|, AtPAO2 gi|15224204|, AtPAO3 gi|15231622|, AtPAO4 gi|15218830|, AtPAO5 gi|1523367| y en recuadros rojos *Vitis vinifera*: VvPAO1, VvPAO2, VvPAO3, VvPAO4, VvPAO5 y VvPAO6.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
AtLDL1  VGVKVEVDSEALDMSVCFPPVYSLTEEIEANVVVSIIGGKQDANIVVVRNHITALRSNVSNNVTRDHALESIR----AEHKITVDTANFTLHGYINFG
AtLDL2  LEKETETEALALSVCFPIDELLEIEIRAGVVRELGGKEQNDYIVVRNHIVARVGNVGIWLLKQDQIRETVS----SDFEHLISAANDPFLFNGYINFG
AtLDL3  ISKEIIGRAAAVTAQLKAQSVSPKIIILKEVLKRRGNSQEVIVVCRNSILGLVSKNVSRIIPVTECGVTGGPSESELPSASLIREVVKFLDQRGYINAG
RcLDLp  GVTEPDSGGAAAVSVLAKARAAGPVKIKFKFVKLRRKCGLQGVLECRNQLLGLVSKNVSRIIPVTEPDSGVTDPSEDESSRDSLIREVVKFLDQSGYINAG
OsAO    LDNDDGSG-VAAVRAKAKAVTPIKIKFKFDLKKRRGGLQEVLECRNMLLGLVSKNVSRIIPVTEPDSGVTDPSEDESSRDSLIREVVKFLDQSGYINAG
VvPAO5  MVSGTDNCGAAAVSVLAKARAAGPVKIKFKFVKLRRKCGLQGVLECRNMLLGLVSKNVSRIIPVTEPDSGVTDPSEDESSRDSLIREVVKFLDQSGYINAG

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
AtLDL1  LAPVIKEAKLRSF-----
AtLDL2  VSPILFAPYIPE-----
AtLDL3  ISSVNGKAASSTN-QDYDLLQGRQLEESSMASVAD-----SEEGVAFTLGQVAVESTSEGKCALQNDERLVGCATSEMLESISKKEASIIDDN
RcLDLp  IASNKEKAEPNVK-HNYKLLKEKTFEVNPGASVAD-----LEDGVSFILG-----QVKTGD IQQTGTVNEKLSN-
OsAO    IASDKVKTDEHSPPEDEVSVKLNSEHERKSVSIQDCIVTEAVDQKKAQVQKTDVLTAEANESSAAIHCDADQLLPPKSEELIFKKNQG---VLTE
VvPAO5  IASEKADPDK-HNYKLLKEKTFGEKSGIAIAD-----SEGDVSTLEPSTLVEP-----KECLADYQEHCGMDANEFN-

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
AtLDL1  -----DGVPEPNVVVVGAGLGLVAAARQLLSMGERVIVLECRDRFGGRVKT
AtLDL2  -----EGTEG-SVIVVGAGLGLVAAARQLLSFGKRVVLECRSRGGRRVYT
AtLDL3  KRVSMMNALQSTASNVEKHPETFVSVAKPALSSSTLSSAHSN--QMRGRDC-VPCEVIDEKKVIIVGAGPAGLTAARHLQRQGSVAVLEPSSRIGGRVYT
RcLDLp  -GLANLDDVHADPFCATLES--TANVITPELRNDLQSQSSCNDAGRDYNFLCDSEGRKKIIVGAGPAGLTAARHLQRQGSVAVLEPSSRIGGRVYT
OsAO    GRDESALPNSNDIHSKSDLDGFIKVEGGSLHQAEADIEHSENKHEASDRVESGGYG-KKIIVVGAGPAGLTAARHLQRQGSVAVLEPSSRIGGRVYT
VvPAO5  -RKVNLD-VSESSCRIDDSG--TIPTIAPELMN-----ESCGRDHNVQFSDVVRKIIIVGAGPAGLTAARHLQRQGSVAVLEPSSRIGGRVYT

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
AtLDL1  RRMKGGDGVGEMADVCGSVLTCING-----NPLGLVLAARQLLPHKVRDLCPLYLP-NGLADASVDSKIEASPNKLLIDRVCKLRQSMIEENKS
AtLDL2  QKMGGKD-RFAAVELGCGSVITCLHA-----NPLGLVLAARQLLPHKVRDNCPLYNS-EGVLVDKVAQSNVVEFGSNKLLIDRVTEVREMGGAAK---
AtLDL3  DRS-----SLSVPVDLGASHITGVEADVPERMPDPSVLCVNOQLGLLBSVLHGGCPLYDTVTGKVPALDDALQAEFNSLDDVLLVEIIGREBRANKMS
RcLDLp  DRS-----SLSVPVDLGASHITGVEADVATERRPDSSLICAOQLGLLBSVLNLSNCPLYDITVREKVPDLDLAEAEVNSLDDMLVLAQKQ-EGHAMKMS
OsAO    DRV-----SLSVPVDLGASHITGVEADIDATERRADPSSLICAOQLGLLBSVLNLSNCPLYDVTGDKVPDLDLDESEVNSLDDMLVLAQKQ-EGSAVGLS
VvPAO5  DHS-----SLSVPVDLGASHITGVEADVDTERRRPDSSLVCAQLGLLIT-----KVPADLDLAEAEVNSLDDMLVLAQKQ-EGHAMKMS

      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
AtLDL1  YDVEVGEAEETFRVYVVAE-----DQERMLLDWHLANLEYANATLLGNLSMAVWQDDPEM-EMGGDH
AtLDL2  -KISLGEVPEFTRVLYGVAK-----DSEERKLFDDWHLANLEYANAGCLSNLSMAVWQDDPEM-EMGGDH
AtLDL3  LEDGLEYAQRRLRMPHDKVNIDKFGLLNSSS-----KTGIRGPFMQDESWKDDFLNPLERRVMNWHBAHEVYGCAMLRKESVLPYVWQDDVGGFGGPH
RcLDLp  LEDGLEYAKRRRAARSRTDIDETFATAED-LYGSSECSVDGGVHEK-SSKEEILSPLERRVMDWHBAHEVYGCAMLRKESVLPYVWQDDVGGFGGPH
OsAO    LEDGLEYAKRRNRVTRSQDDQLRNVSAGAVDISESASTEKIHAHCKEDKTDVLSPLERRVMNWHBAHEVYGCAMLRKESVLPYVWQDDVGGFGGPH
VvPAO5  LEEGLEYAKRRRMPRLGSDYTENELQNDKPSLSEKIIVDRKMLERNSSKEEVLSPERRVMDWHBAHEVYGCAMLRKESVLPYVWQDDVGGFGGPH

      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
AtLDL1  CFFPGNEIFVHADAEVNDLFFYGSTVESIRVCSN-----GVLVYTGKNEESHODMALCTVPLGLVLRKGSIFVYPPDHPKKKEATLRLGFGVLRNKV
AtLDL2  CFLACGNRLINLDAEGLPIHYGKSVDTIRYGDG-----GVEVTSQSITIQADMILCTVPLGLVLRKRSIKFPPDPRRQAAITRLGFGVLRNKV
AtLDL3  AMIRGCVSRVVESEGLDILHNLKIVSDVSVSDVSAMDNSK-HKVRVYVSTNGCEVLDGAVLITVPLGCLRAETIKFSPDPPQWYASIKOLGFGVLRNKV
RcLDLp  CMIRGCVSNVVESEGLDILHNLKIVSDVSVSDVSTNGCEVLDGAVLITVPLGCLRAETIKFSPDPPQWYASIKOLGFGVLRNKV
OsAO    CMIRGCVDTVLESIAKGLDVLQNLHVYVEVILGSEELGASGNSRKFVKIISTNGNEVYGDAVLITVPLGCLRAETIKFSPDPPQWYASIKOLGFGVLRNKV
VvPAO5  CMIRGCVSSVVESEGLDILHNLQVYVSDVSVSSKDGAGTGSQCKKVKVSTNGSEVYGDAVLITVPLGCLRAETIKFSPDPPQWYASIKOLGFGVLRNKV

      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
AtLDL1  AMLPFCNFWGEEIDTFGRILTDPSTRGEEFFVYSYSSVSGPPLVAVLVAGDAERFETLSPDTSVRRVQLRLGIVHPKGIWVPPDVPQALCSRWGQDKES
AtLDL2  AMLPFCNFWGEEIDTFGRCLNDESSINRGEFFVYAYHTVSGPPLVAVLVAGDAERFETLSPDTSVRRVQLRLGIVHPKGIWVPPDVPQALCSRWGQDKES
AtLDL3  VLEFPVFWDDSDVDFGATABETDLRGECEFWNVKKTVGAPEVILALVVGAAAFYETNKSKESEVNHAMMVLRLKLF--GDLVDPDPAASVVDWGRDPEPS
RcLDLp  VLEFPVFWDDSDVDFGATABETDLRGECEFWNVKKTVGAPEVILALVVGAAAFYETNKSKESEVNHAMMVLRLKLF--EAVVDPDPAASVVDWGRDPEPS
OsAO    VLEFPVFWDDSDVDFGATABETDLRGECEFWNVKKTVGAPEVILALVVGAAAFYETNKSKESEVNHAMMVLRLKLF--DASVDPDPAASVVDWGRDPEPS
VvPAO5  VLEFPVFWDDSDVDFGATSEORNRGQCEFWNVKKTVGAPEVILALVVGAAAFYETNKSKESEVNHAMMVLRLKLF--ETSVPDPAASVVDWGRDPEPS

      710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
AtLDL1  YGSYSYVAVGSSEGDYDILAESVCDGRVFFAGEATNROYPATMHGAFISGUREAANILRVARRRASSALNPQICIDKEEVEDEEPRDLQDLFETPDL
AtLDL2  YGSYSYVVRVGSSEGDYDILAESVSN-RVFFAGEATNROYPATMHGAFISGUREASKILHVAN-YLRSNLKPP-----VQRYSGVNNIN--VLEDMPKRPDI
AtLDL3  YGAYSVVAIGASGDYDILGRPVON-CVFFAGEATCKEHPDVTGGAMTSGUREAVRIIDLIRSGNDYTAETLETKAQRKSVVPRDVRDLIKRLEVVEL
RcLDLp  YGAYSVVAIGASGDYDILGRPLEN-CVFFAGEATCKEHPDVTGGAMTSGUREAVRIIDLIRSGNDYTAEVEAMEAERHTEWERDVRDITRLEAVEI
OsAO    RGAYSVVAIGASGDYDILGRPVD-CVFFAGEATCKEHPDVTGGAMTSGUREAVRIIDLIRSGNDYTAEVEALQYQMSDSEERNEVKMSNKLDACEL
VvPAO5  YGAYSVVAIGASGDYDILGRPVEN-CVFFAGEATCKEHPDVTGGAMTSGUREAVRIIDLIRSGNDYTAEVEAMEAERHTEWERDVRDILKREAVEI

      810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
AtLDL1  T-----FGNFSVLETPNSDEPESMSILRVRIQ--MKRPESGLWLYGLVTRKQATEGEMD--GDELRNEYLRKELGLVVERKLSQEQ
AtLDL2  A-----IGKLSFVNPLTDDPKSFGVVRVCFDNEFDPTNRLQLYTISREQANKIKELDENSNEKSLCOLMNTLGLKLMGANSVDT
AtLDL3  SNVLR-----QSLRNMVFSAKTIVGRLEHAKELLNLPGETLKSFAGTKEGAVLNSWIIDSMGKNGTOPLRHCVRLLVLRVSTDLFALRISG
RcLDLp  SNVLYKNSLDGQ-IVTREALQEMFSTKTTAGRLHAKELLNLPGETLKSFAGTKEGAVLNSWIIDSMGKNGTOPLRHCVRLLVLRVSTDLFALRISG
OsAO    STALCKTSSDASYPLFSKETILQEMFSAKTTSGRHLHAKELLNLPGETLKSFAGTKEGAVLNSWIIDSLGKNGTOPLRHCVRLLVLRVSTDLFALRISG
VvPAO5  SNVLYKNSLDGDL-ILTREALQDMFSNAKTTAGRLHAKELLTFFPVALKSFAGTKEGAVLNSWIIDSMGKNGTOPLRHCVRLLVLRVSTDLFALRISG

```

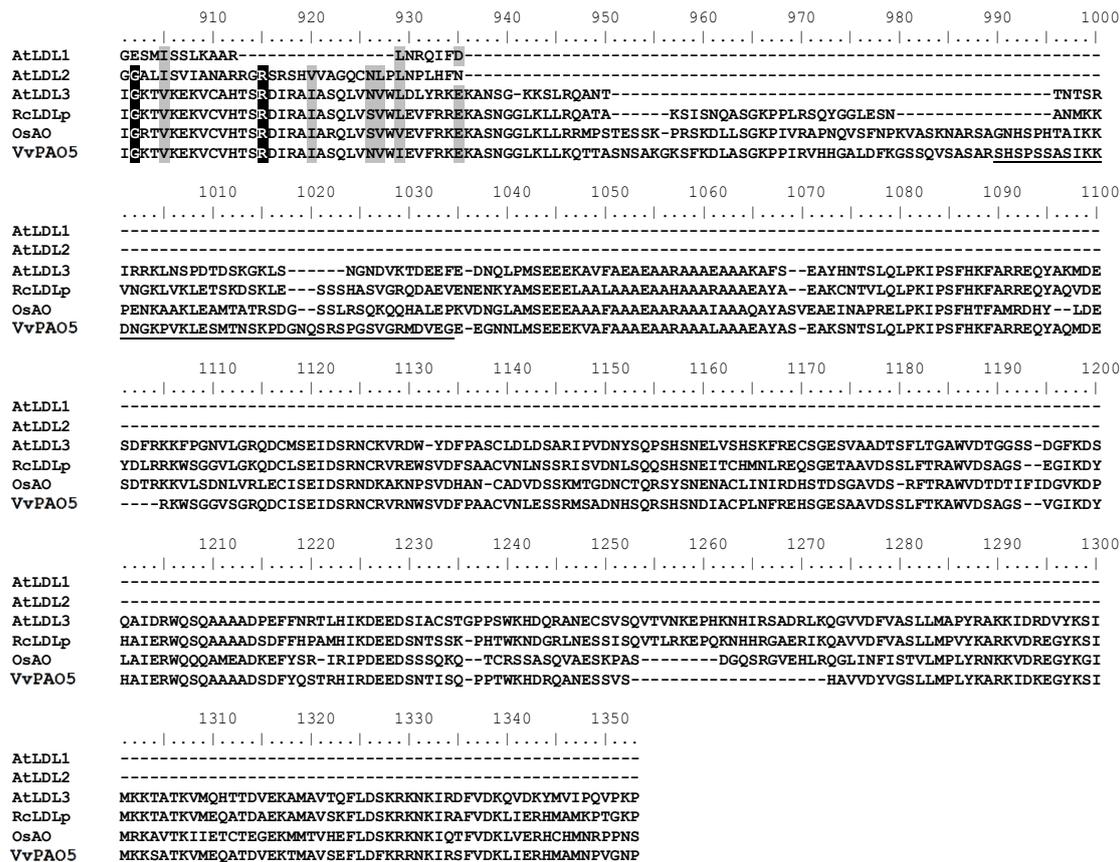


Figura 14: Alineamiento de la secuencia aminoacídica de proteínas de la familia de las lisina desmetilasa PAO tipo III. El dominio SWRIM (pfam04433) está señalado con sombra verde, el dominio conservado de desmetilación de histonas (PLN02328) se señala con sombra amarilla, el cual coincide con el dominio poliamino oxidasa (PNL02268 y PNL02529). LDLp putativa de *R. communis* RcLDLp (XP_002510487.1), AtLDL1 (NP_176471.1), AtLDL2 (NP_187981.1), AtLDL3 (NP_193364.5) y OsAO (ABB47924.2) (Jiang *et al.*, 2007).

III.2 ESTUDIO DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS AL METABOLISMO DE POLIAMINAS Y SÍNTESIS DE ETILENO DURANTE EL DESARROLLO REPRODUCTIVO EN *VITIS VINIFERA* Cv. CARMÉNÈRE

El desarrollo reproductivo de la vid tiene su origen en la primera temporada de crecimiento con el desarrollo de las yemas, donde ocurre la inducción floral, posteriormente al cambiar hostilmente las condiciones ambientales este proceso se interrumpe. Luego en la próxima primavera se reanuda el proceso de diferenciación floral y prosigue hasta completar el ciclo de fructificación. Como primera aproximación para comprender el rol de los genes asociados al metabolismo de las poliaminas durante el desarrollo frutal de la vid se determinaron sus niveles transcripcionales mediante PCR de tiempo real a lo largo del desarrollo de las yemas. Para esto se aisló RNA total a partir de muestras obtenidas a lo largo de dos temporadas de crecimiento consecutivas. Es conveniente mencionar que en los resultados de qRT-PCR se utilizó GPDH como gen normalizador de las muestras y el calibrador es las yemas de Diciembre para las yemas.

III.2.1 Perfiles transcripcionales durante la primer fase del desarrollo reproductivo. Inducción floral.

A) El gen *VvADC* asociado a la síntesis de Put aumenta su nivel de expresión durante la inducción floral.

El inicio de la vía metabólica de las poliaminas utiliza como sustrato primario Arg, tomando dos posibles vías, una directa mediante la actividad arginina descarboxilasa codificada por *VvADC* y una segunda vía con la producción de un intermediario ornitina por la actividad arginasa codificada por la *VvARGI*.

Los genes *VvADC* y *VvARGI* muestran diferencias en sus patrones de expresión durante el desarrollo de las yemas (Figura 15). Durante el periodo de inducción floral se observa un aumento significativo de la acumulación del transcrito *VvADC*, durante los meses de diciembre y enero respecto de los meses de otoño e invierno. Durante el periodo de dormancia el nivel de acumulación de transcrito de *VvADC* es basal pero se registra un aumento significativo al comparar el mes de julio con agosto previo al establecimiento de

las yemas algonosas donde se reanuda el desarrollo de las inflorescencias de inflorescencia generadas la temporada anterior.

Por otra parte, los niveles de expresión de *VvARGI* no variaron a lo largo de los distintos eventos del desarrollo de las yemas representados en las muestras evaluadas.

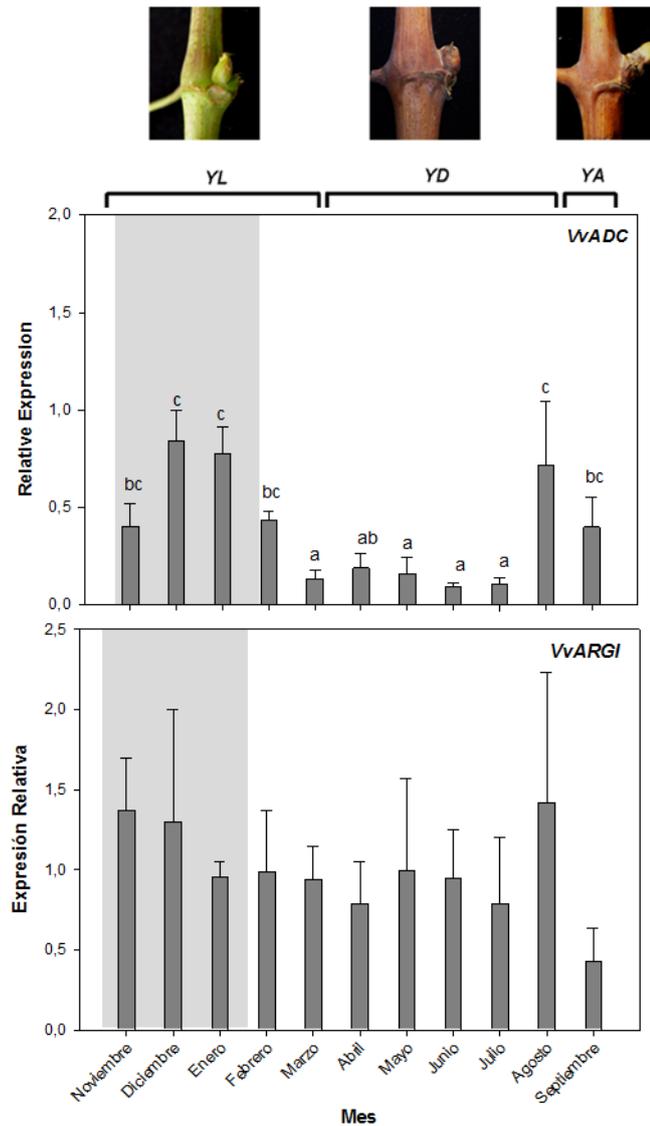


Figura 15: Análisis de la expresión de los genes *VvADC*, *VvARGI* durante el desarrollo de las yemas de vid. Se estudiaron yemas latentes (YL) en la primera estación de crecimiento, yemas en dormancia (YD) y, yemas algonosas al momento de la ruptura de yemas (YA). El área gris indica el periodo del año cuando ocurre la inducción floral en Chile. Los niveles de expresión fueron normalizados utilizando el gen *VvGAPDH* y empleando la muestra correspondiente al mes de diciembre como muestra calibradora. Las barras representan la media \pm DE (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

La síntesis de la triamina espermidina tiene como sustrato Put y S-adenosil metionina, el cual es producido por la descarboxilación de S-adenosil metionina (SAM) mediada por la enzima SAM descarboxilasa (SAMDC).

B) Genes codificantes para SAMDC se expresan diferencialmente en el periodo de inducción floral.

Durante el periodo de inducción floral en yemas latentes (YL) la expresión de *VvSAMDC1* fue constante (Figura 16), sin variaciones significativas hasta el mes de abril entrada la dormancia. Posteriormente su expresión aumentó paulatinamente durante mayo hasta un máximo significativamente elevado durante el mes de junio; luego en julio y agosto el nivel de expresión del gen *VvSAMDC1* disminuyó hasta caer drásticamente en la ruptura de la dormancia cuando la yema está algodonosa (YA) y se reanuda el proceso de desarrollo de las inflorescencias.

Por su parte los genes *VvSAMDC2* y *VvSAMDC4* presentan variaciones en la acumulación de sus transcritos durante la inducción floral. El registro inicial en noviembre disminuye en tanto avanza el desarrollo de las yemas hasta un mínimo significativo en febrero. A continuación estos dos genes se mantuvieron bajos sus niveles de expresión hasta el mes de abril, en yemas en dormancia.

Luego, ambos genes aumentaron su expresión alcanzando niveles significativamente mayores en agosto y luego la expresión de *VvSAMDC2* y *VvSAMDC4* disminuyó de manera abrupta en septiembre (YA) durante la brotación de las yemas.

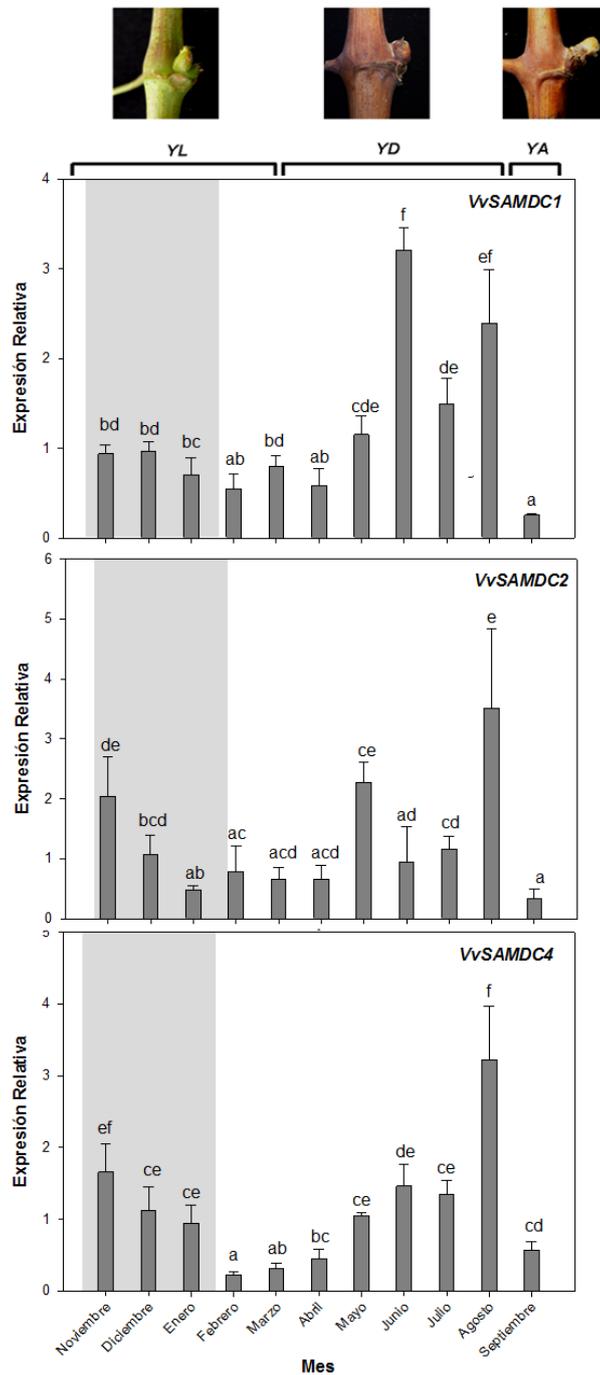


Figura 16: Análisis de la expresión de los genes *VvSAMDC1*, *VvSAMDC2* y *VvSAMDC4* codificantes de SAM descarboxilasa a lo largo del desarrollo de las yemas de vid. Se estudiaron yemas latentes (YL) en la primera estación de crecimiento, yemas en dormancia (YD) y yemas alodonosas al momento de la ruptura de yemas (YA). El área gris indica el periodo del año cuando ocurre la inducción floral en Chile. Los niveles de expresión fueron normalizados utilizando el gen *VvGAPDH* y empleando la muestra correspondiente al mes de diciembre como muestra calibradora. Las barras representan la media \pm DE (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

C--Los transcritos de *VvSPDS1* y *VvACL5-5* se acumulan durante la inducción floral.

Los perfiles de expresión de los genes codificantes para proteínas con actividad aminopropil-transferasas evaluados en las muestras de yemas a lo largo de su desarrollo se detallan en la Figura 17. A lo largo del desarrollo de las yemas el nivel de transcritos del gen *VvSPDS1* se modificó levemente, sin embargo se acumula principalmente durante la etapa de inducción floral. El nivel de transcrito disminuyó en febrero, hasta niveles significativamente menores en marzo y abril. El gen *VvSPMS* mostró un patrón de expresión oscilante a lo largo del desarrollo de las yemas solo registrándose una disminución significativa al evaluar los registros de agosto y septiembre. Por su parte los transcritos de *VvACL5-5* se acumularon significativamente durante el periodo de inducción floral cayendo a niveles muy bajos entre los meses de abril y agosto. Luego una vez establecida la yema algodonosa, en septiembre el nivel de expresión de *VvACL5-5* se incrementó significativamente.

D- En las yemas, los genes *PAO* putativos muestran perfiles de expresión opuestos.

Para la actividad PAO en el genoma de la vid se han encontrado 6 putativas secuencias codificantes y en el presente estudio se evaluaron solo 2 secuencias putativas codificantes de este tipo de proteínas *VvPAOI* y *VvPAO5*.

Al inicio del muestreo durante el mes de noviembre, el gen *VvPAOI* registró un nivel de expresión que disminuyó paulatinamente en tanto en la yema latente ocurría la inducción floral. Su señal se hace nula durante el periodo entre el mes de marzo y agosto. Posteriormente en las yemas algodonosas en septiembre, periodo en que se desarrollan las inflorescencias, el gen *VvPAOI* se induce abruptamente. Distinto es el perfil transcripcional del gen *VvPAO5*, que muestra una sola alza significativa de su expresión durante el mes de enero en el periodo de inducción floral (Figura 18).

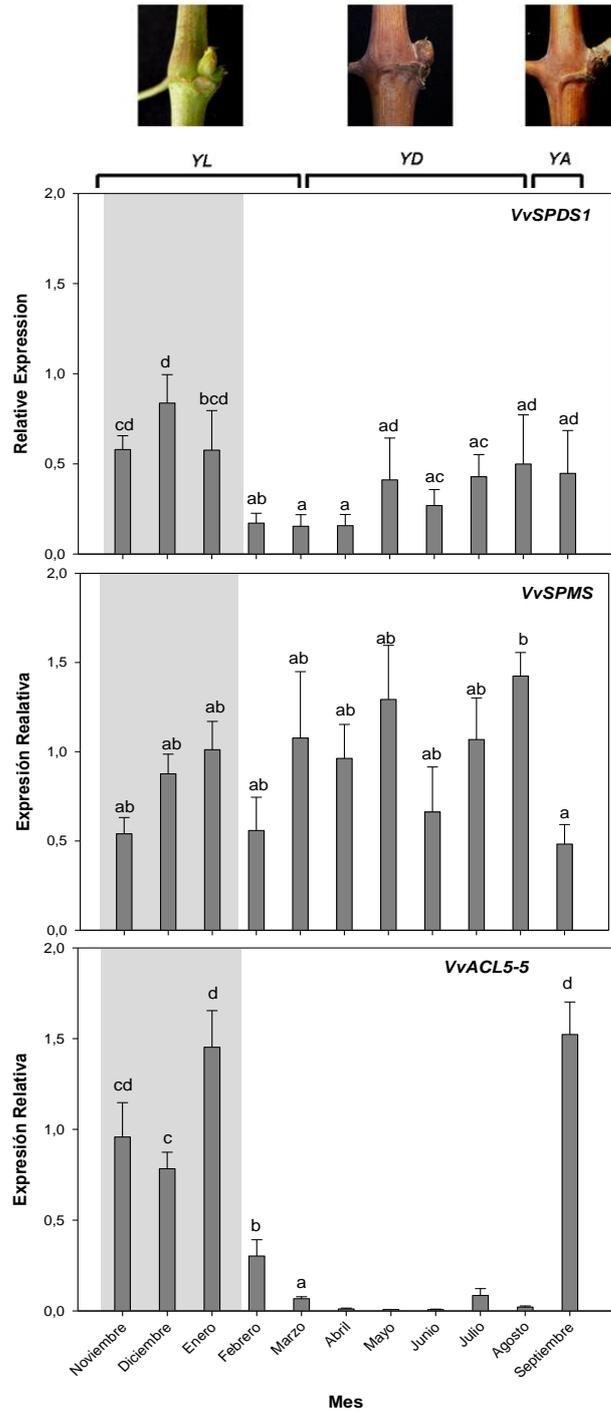


Figura 17: Análisis de la expresión de los genes *VvSPDS1*, *VvSPMS* y *VvACL5-5* a lo largo del desarrollo de las yemas de vid. Se estudiaron yemas latentes (YL) en la primera estación de crecimiento, yemas en dormancia (YD) y yemas algodonosas al momento de la ruptura de yemas (YA). El área gris indica el periodo del año cuando ocurre la inducción floral en Chile. Los niveles de expresión fueron normalizados utilizando el gen *VvGAPDH* y empleando la muestra correspondiente al mes de diciembre como muestra calibradora. Las barras representan la media \pm DE (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

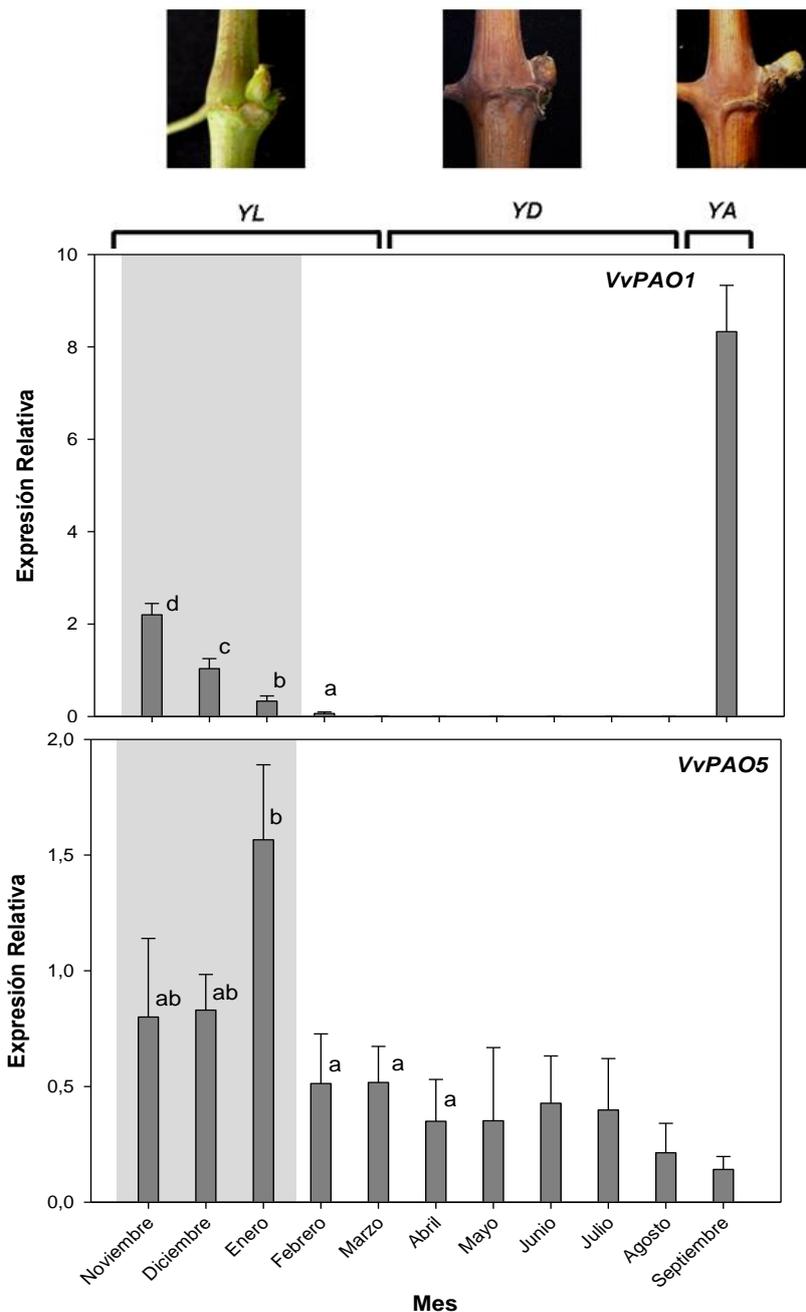


Figura 18: Análisis de la expresión de los genes *VvPAO1* y *VvPAO5* a lo largo del desarrollo de las yemas de vid. Se estudiaron yemas latentes (YL) en la primera estación de crecimiento, yemas en dormancia (YD) y yemas algodinosas al momento de la ruptura de yemas (YA). El área gris indica el periodo del año cuando ocurre la inducción floral en Chile. Los niveles de expresión fueron normalizados utilizando el gen *VvGAPDH* y empleando la muestra correspondiente al mes de diciembre como muestra calibradora. Las barras representan la media \pm DE (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Adicionalmente a los genes involucrados en el metabolismo de poliaminas mostrados se evaluó la expresión de genes codificantes de enzimas involucradas en la vía de síntesis de etileno, la cual, al igual que la vía de síntesis de las poliaminas utiliza S-adenosil metionina como sustrato. Dos actividades proteicas, ACC sintasa y ACC oxidasa, intervienen en la síntesis de etileno a partir de S-adenosil metionina, el sustrato común que contribuye por un lado a la síntesis de poliaminas superiores y por otro a la síntesis de etileno.

E-*VvACO* se inducen durante la inducción floral y *VvACS* durante la salida de dormancia.

La variación de los niveles de expresión es opuesta entre *VvACS* y los dos genes codificantes para ACO. Por un lado *VvACS* se mantuvo relativamente constante desde el inicio del muestreo, en noviembre y hasta junio, abarcando el periodo de inducción floral y la entrada en dormancia. Luego durante los meses de julio y agosto el nivel de expresión se elevó significativamente y en septiembre cuando la yema está algodonosa la expresión de *VvACS* se redujo a niveles mínimos. Por su parte *VvACO6* y *VvACO7* incrementaron el nivel de expresión en tanto avanzaba la entrada en verano, durante el periodo de inducción floral, alcanzando el máximo de expresión durante el mes de enero. Seguido a esto, en febrero, la señal transcripcional se redujo significativamente (Figura 19)

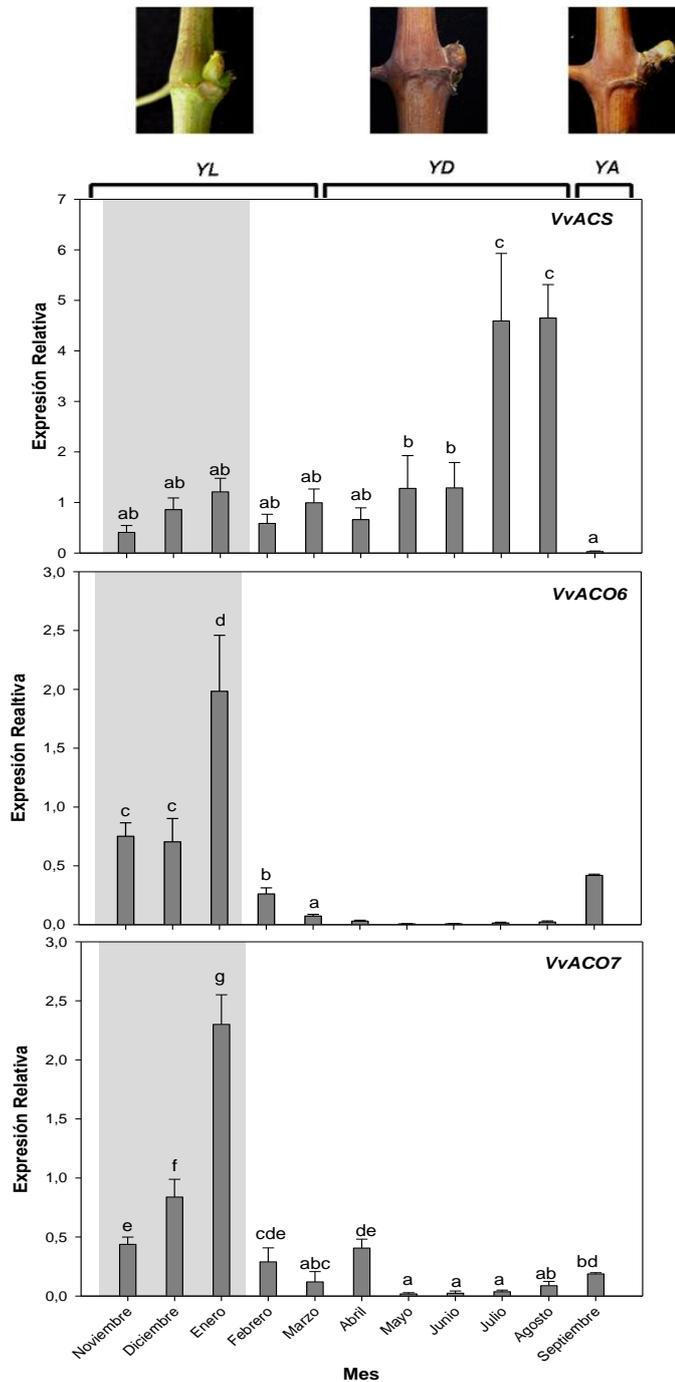


Figura 19: Análisis de la expresión de los genes *VvACS*, *VvACO6* y *VvACO7* a lo largo del desarrollo de las yemas de vid. Se estudiaron yemas latentes (YL) en la primera estación de crecimiento, yemas en dormancia (YD) y yemas algodonosas al momento de la ruptura de yemas (YA). El área gris indica el periodo del año cuando ocurre la inducción floral en Chile. Los niveles de expresión fueron normalizados utilizando el gen *VvGAPDH* y empleando la muestra correspondiente al mes de diciembre como muestra calibradora. Las barras representan la media \pm DE (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

III 2-2 Perfiles transcripcionales durante el desarrollo floral y frutal.

En esta sección se persigue establecer las modificaciones que ocurren en la expresión de genes del metabolismo de PAs y de síntesis de etileno a lo largo del desarrollo floral y frutal de las bayas de vid.

A-*VvADC* y *VvARGI* se expresan diferencialmente durante el desarrollo de flor y fruto.

En la Figura 20 se muestra el patrón de expresión del gen *VvADC* y *VvARGI* en los diferentes estadios desde inflorescencias hasta baya madura. *VvADC* se expresó principalmente en LC y flores luego durante la fructificación, los transcritos de *VvADC* disminuyeron significativamente en bayas verdes y luego aumentaron durante la maduración de las bayas (pinta y madura). Por su parte *VvARGI* no registró variaciones significativas entre las muestras evaluadas.

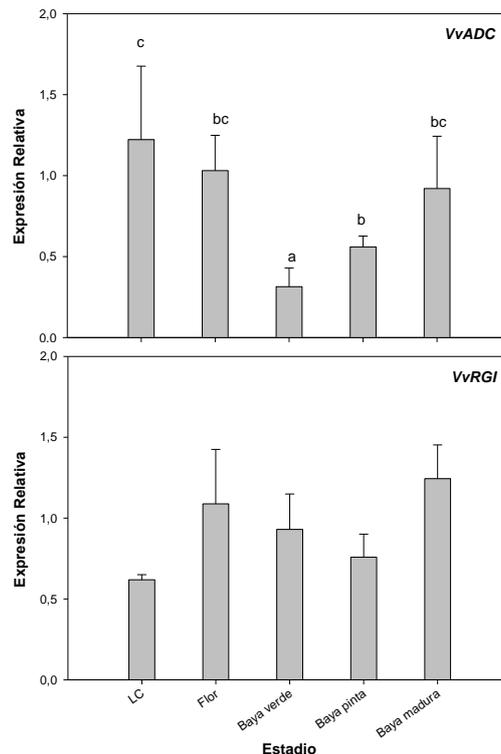


Figura 20: Niveles de expresión de *VvADC* y *VvARGI* a lo largo del desarrollo floral y frutal de vid mediante qRT-PCR. Los niveles de expresión de *VvADC* y *VvArgi* fueron normalizados en relación a aquellos de *VvGAPDH*, empleando Flor como muestra calibradora. Los estadios evaluados fueron LC: “little cluster”, flor, baya verde, pinta y madura. Las barras representan la media \pm DE (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

B- Los tres genes *SAMDC* se expresan durante el desarrollo de las bayas, pero cada uno con un patrón de variación particular.

En la Figura 21 se grafica los cambios en la expresión de tres genes codificantes para *SAMDC*. El gen *VvSAMDC1* mantuvo un nivel de expresión relativamente constante entre los estadios LC, flor y baya post cuaja hasta un nivel mínimo de acumulación de transcrito durante *envero*. Posteriormente, cuando las bayas alcanzaron la madurez los transcritos de *VvSAMDC1* se incrementaron significativamente respecto del estadio anterior, *envero*.

Para *VvSAMDC2* se registró niveles de transcripción similares en LC, flor y baya verde. Sin embargo luego en las bayas en *envero* el nivel de transcripción de este gen se redujo significativamente.

En el caso de *VvSAMDC4* los niveles de expresión obtenidos son similares entre los estadios evaluados, encontrándose un máximo durante el estadio de flor que es significativamente mayor solo respecto de bayas en *envero* y maduras

C- Los genes *VvSPDS1* y *VvACL5-5* presentan patrones de expresión opuestos entre los estadios LC y flor..

La expresión de *VvSPDS1*, *VvSPMS* y *VvACL5-5* en órganos floral y frutal se grafica en la Figura 22. La expresión del gen *VvSPDS1* aumentó significativamente en flores respecto de LC y posterior a esto, los cambios observados fueron menores. El gen *VvSPMS* no registró variaciones significativas en la acumulación de transcrito en los tejidos reproductivos evaluados. Por su parte el gen *VvACL5-5* marcó una fuerte expresión en LC respecto del resto de los estadios evaluados, este nivel disminuyó significativamente en antesis y progresivamente a través del desarrollo del fruto. De acuerdo a los datos obtenidos la expresión de *VvSPDS1* y *VvACL5-5* estaría relacionada de forma inversa con la transición de LC a antesis y también en el desarrollo frutal.

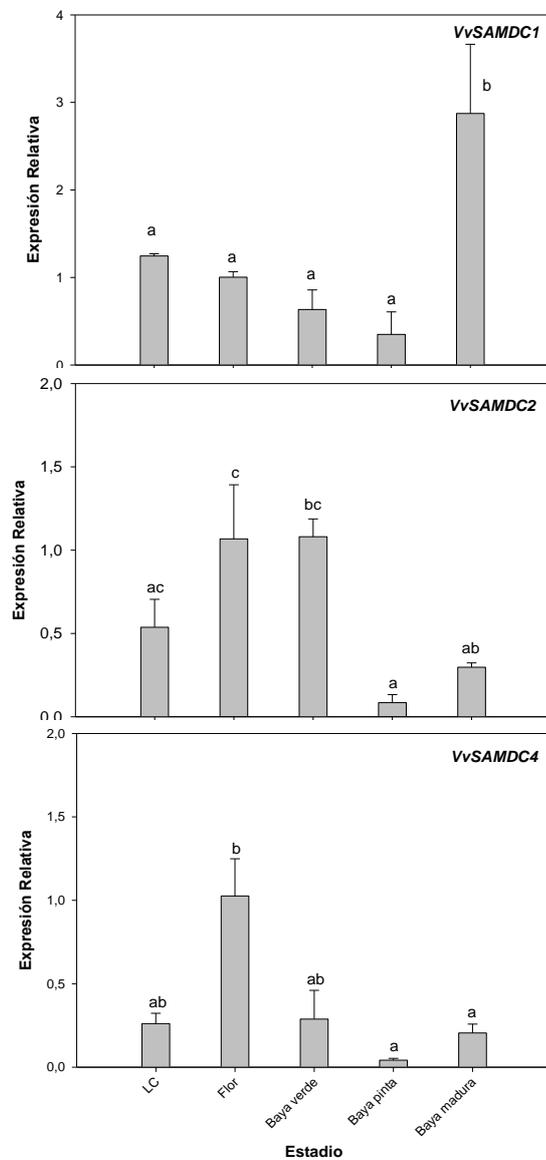


Figura 21: Niveles de la expresión de los genes *VvSAMDC1*, *VvSAMDC2* y *VvSAMDC4* a lo largo del desarrollo floral y frutal de vid mediante qRT-PCR. Los niveles de expresión fueron obtenidos mediante PCR en tiempo real y normalizados en relación a *VvGAPDH*, empleando el órgano flor como muestra calibradora. Los estadios evaluados fueron LC: little cluster, flor, baya verde, pinta y madura. Las barras representan la media \pm DE (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

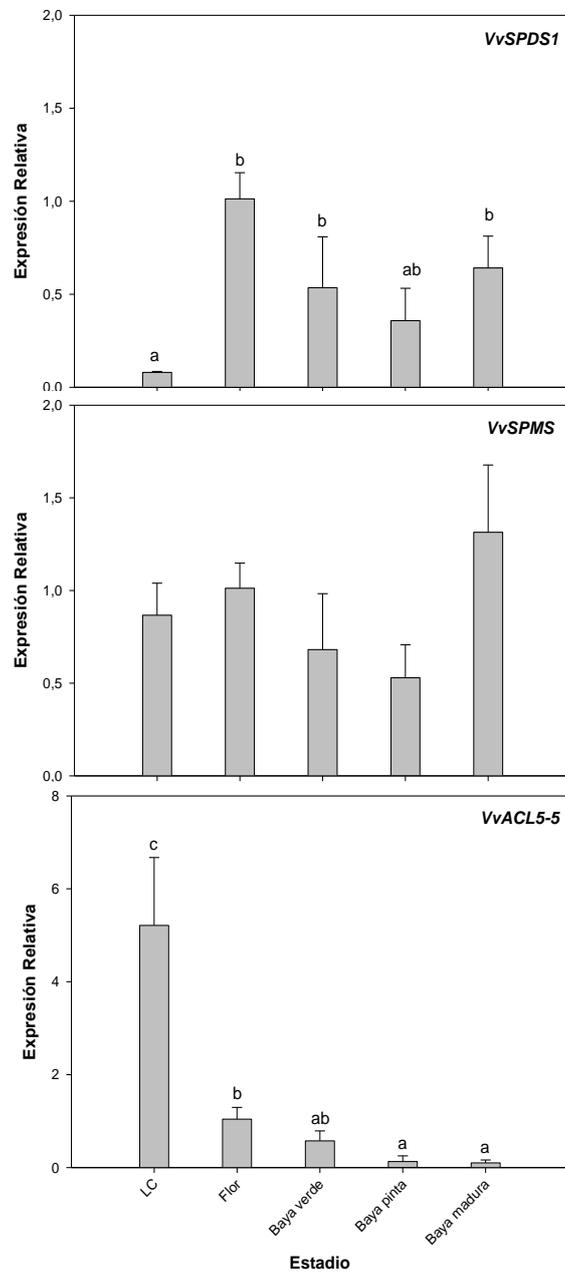


Figura 22: Niveles de expresión de *VvSPDS1*, *VvSPMS* y *VvACL5-5* a lo largo del desarrollo floral y frutal de vid mediante qRT-PCR. Los niveles de expresión de los tres genes fueron normalizados en relación a aquellos de *VvGAPDH*, empleando Flor como muestra calibradora. Los estadios evaluados fueron LC: “little cluster”, flor, baya verde, pinta y madura. Las barras representan la media \pm DE (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

D- Dos genes *VvPAO* muestran patrones de expresión muy diferentes entre los órganos reproductivos.

En la Figura 23 se observa los niveles de acumulación de transcrito de 2 genes poliamina oxidasa (PAO). La expresión del gen *VvPAO1* se limitó a los estadios LC y flor. Sin embargo, *VvPAO5* se expresó a lo largo de todos los estadios evaluados y si bien se observa una disminución en tanto avanza el desarrollo, esta no es significativa.

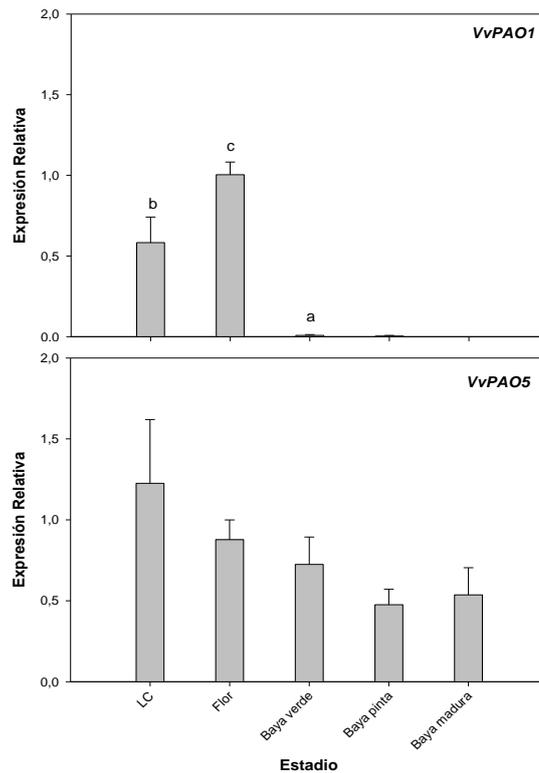


Figura 23: Niveles de expresión de *VvPAO1* y *VvPAO5* a lo largo del desarrollo floral y frutal de vid mediante qRT-PCR. Los niveles de expresión de *VvPAO1* y *VvPAO5* fueron normalizados en relación a aquellos de *VvGAPDH*, empleando Flor como muestra calibradora. Los estadios evaluados fueron LC: “little cluster”, flor, baya verde, pinta y madura. Las barras representan la media \pm DE (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

E- La expresión de *VvACS* no se modifica a lo largo del desarrollo normal de las bayas, los dos *VvACO* putativos si lo hacen.

La expresión de *VvACO7* mostró un comportamiento diferencial entre todos los tejidos. Durante el desarrollo de órganos reproductivos, el gen *VvACO7* se expresó en LC, luego la cantidad de transcritos del gen disminuyó en flores para posteriormente aumentar

en bayas en *envero* y maduras (bp/f=3.6 y bm/f= 7.6). En órganos vegetativos, *VvACO7* se expresó fuertemente en hojas y cantidades menores de transcritos del gen se encontraron en el resto de los órganos estudiados (Figura 24).

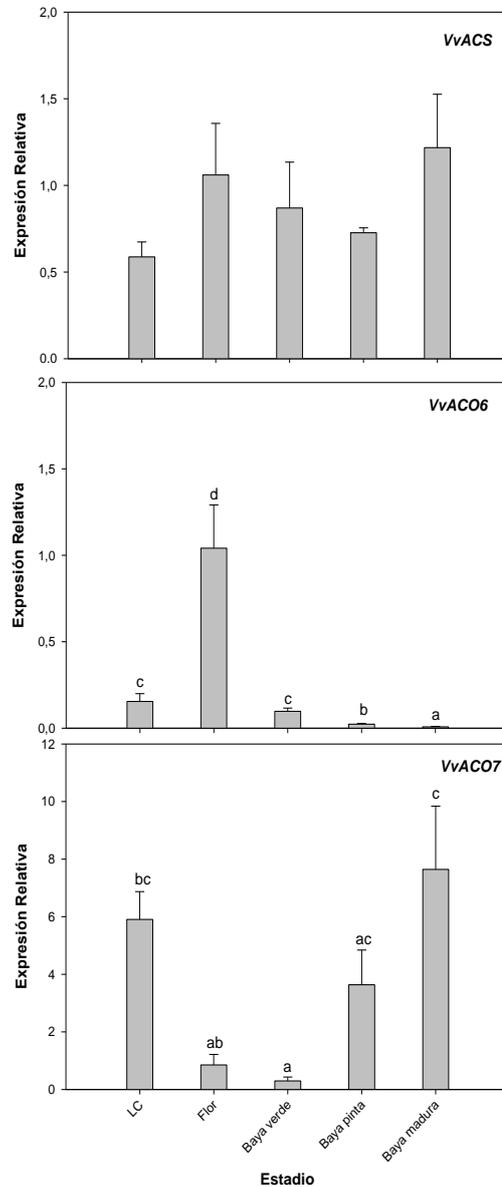


Figura 24: Niveles de expresión de *VvACO6*, *VvACO7* y *VvACS* a lo largo del desarrollo floral y frutal de vid mediante qRT-PCR. Los niveles de expresión de los tres genes fueron normalizados en relación a aquellos de *VvGAPDH*, empleando flor como muestra calibradora. Los estadios evaluados fueron LC: “little cluster”, flor, baya verde, pinta y madura. Las barras representan la media \pm DE (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

III.3 ESTUDIO DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO DE POLIAMINAS EN BAYAS NORMALES Y PARTENOCÁRPICAS DE *V. VINIFERA* CV. CARMÉNERE.

En la vid en el cv Carménère, 4 semanas después de la floración y una vez ocurrida la fructificación, ya es posible diferenciar bayas partenocárpicas de las bayas semilladas. Esto nos permite tener dos fenotipos diferentes en un solo sistema idéntico genéticamente y sometido a las mismas condiciones medioambientales. De aquí que la ocurrencia del *millerandage* en la vid se nos presenta como una oportunidad invaluable para el estudio del desarrollo frutal en etapas tempranas. La colección de ESTs (Expressed Sequence Tags) perteneciente al consorcio DEGECHIVID (<http://www.genomicafrutos.cl/>) ha permitido la confección de membranas conteniendo un total de 4807 secuencias totales. Este macroarreglo incluye secuencias expresadas en flores y frutos colectados en diferentes estadios de desarrollo, lo cual permitió analizar la expresión en muestras de bayas partenocárpicas y bayas semilladas provenientes de racimos en fase I de crecimiento 4 semanas posterior a la floración. A continuación se describen los resultados obtenidos del análisis de datos de los datos de expresión.

III.3.1 Análisis global de la expresión génica diferencial en bayas partenocárpicas respecto de bayas semilladas

A- Identificación de genes regulados diferencialmente mediante el análisis de un macroarreglo de bayas partenocárpicas vs. bayas semilladas en etapa I del crecimiento.

Con el objeto de identificar a escala masiva los transcritos acumulados de manera diferencial entre bayas partenocárpicas (BP) respecto de bayas verdes normales (bv), se calculó la razón de cambio bp/bv. De un total de 4807 ESTs analizados, 955 presentaron diferencias significativas en su tasa de cambio ($p\text{-value} \leq 0.05$). La Figura 25 muestra la distribución de los datos en función de la razón de cambio y el nivel de confianza. Estos dos parámetros delimitan un grupo de 805 ESTs de los cuales 420 ESTs presentaron una inducción > 2 veces en las bayas partenocárpicas en las bayas partenocárpicas y 385 ESTs

presentaron una represión de < 2 veces en las bayas partenocárpicas lo que corresponde a un 17% de total de secuencias evaluadas.

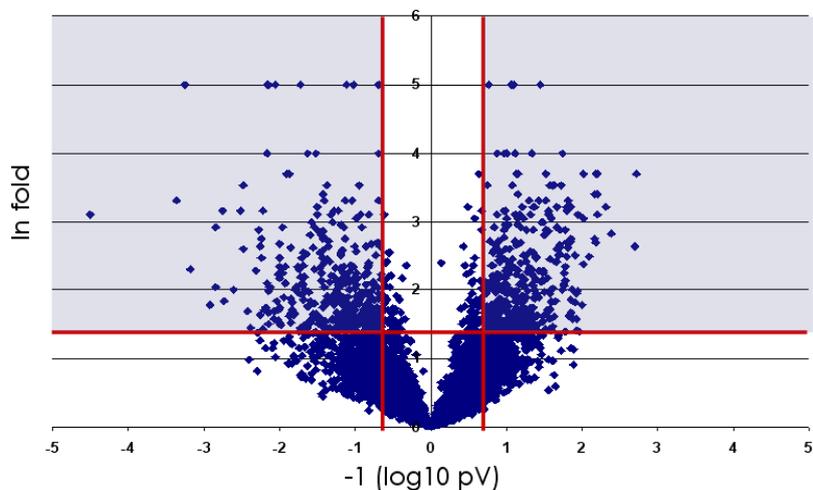


Figura 25: Distribución de los datos respecto de la tasa de cambio y la significancia estadística. Las líneas verticales indican una tasa de cambio de 2 veces, mientras que la línea referencial horizontal en 1,3 indica un nivel de confianza del 95%. Estos límites delimitaron un total de 805 genes.

Cada uno de estos conjuntos de ESTs reprimidos e inducidos fue categorizado funcionalmente utilizando la plataforma informática disponible de DEGECHIVID. Una representación de la distribución de los EST en cada categoría se grafica en la Figura 26 donde se observa una diferencia en cuanto al número de ESTs asignados a cada categoría funcional. Las categorías más numerosas corresponden a actividad catalítica con 19% y metabolismo con 12% de las secuencias en el grupo de genes inducidos. En el grupo de genes reprimidos estos valores fueron mayores, se incluyó al 21% de los ESTs en actividad catalítica y 13% en metabolismo. En las diferentes categorías se incluye la asignación de un mismo EST a 1 o más categorías según corresponda, lo cual es característico de la clasificación de secuencias por categorías funcionales. Un ejemplo de esto es un EST(VVCCGC2069H11.b1) que presenta similitud con una arginina metil transferasa (pam1) de *Arabidopsis thaliana*, ha sido asignada por un lado a la categoría “metabolitos secundarios” y también a “actividad catalítica”, otro caso es el del EST VVCCGS1045H03.g, con similitud a la fenil amonio liasa la cual está involucrada en “actividad catalítica”, “metabolismo”, “metabolismo secundario” y “aminoácidos y nitrógeno”. Específicamente en la categoría de matriz extracelular, en las bayas partenocárpicas se produce una represión de 5 ESTs que incluyen una expansina, una

proteína de unión a auxina, una proteína de inducción por luz y dos proteínas relacionadas con patogénesis. De las 16 categorías mostradas en la Figura 26 se observa que en 13 de ellas la cantidad de ESTs reprimidos es mayor, pero se observa que 64 EST no categorizados se inducen en el estado de bayas partenocárpicas.

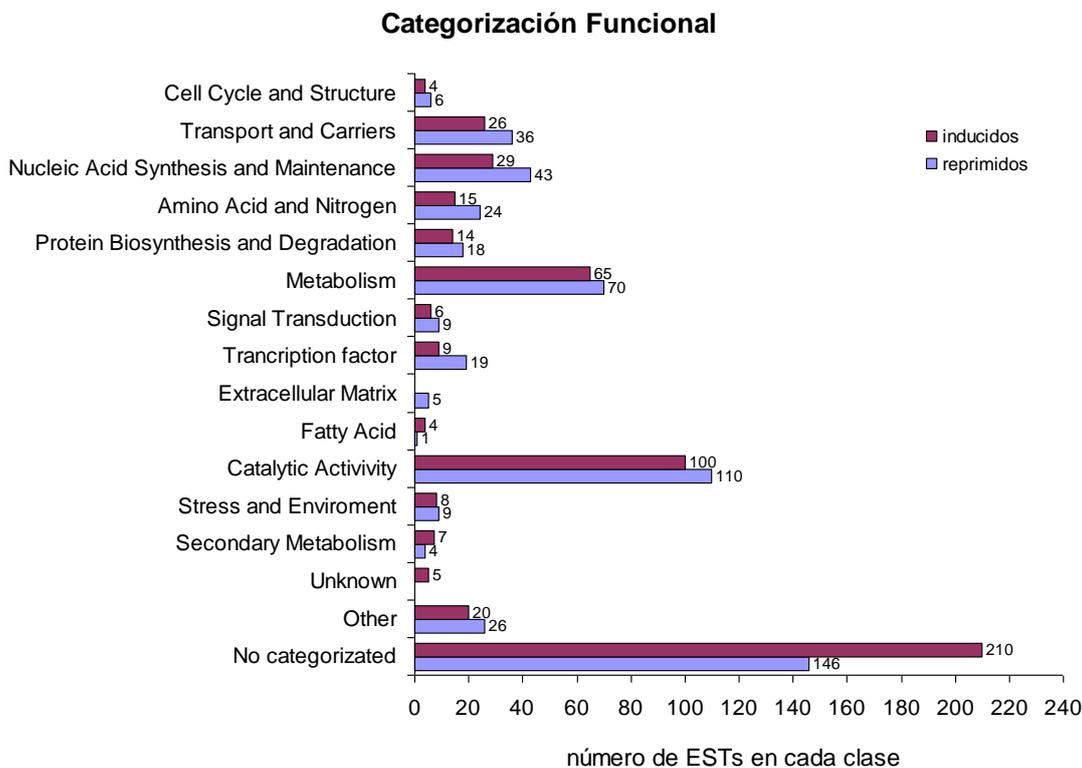


Figura 26: Categorización funcional de genes inducidos y reprimidos en las bayas partenocárpicas. Distribución de los ESTs de *Vitis vinifera* cv Carménère. Inducidos y reprimidos. Se analizaron 805 secuencias diferencialmente expresadas.

Un listado de los 30 genes más inducidos en bayas partenocárpicas se detalla en la Tabla 4. El mayor nivel de inducción correspondiente a 15 veces fue observado en dos ESTs; uno corresponde a VCCGC2038D06.b asignado a espermidina sintetasa, involucrada en la síntesis de poliaminas adicionando un grupo amino propilo a la putrescina para producir espermidina y el segundo EST inducido 15 veces es VVCCGC3051B08.b que codifica para una putativa endo glucano 1,3 beta glucanasa involucrada en la respuesta a ataque por patógeno y cuya expresión estaría regulada por etileno (Jacobs *et al.*, 1999), ácido salicílico (Renault *et al.*, 1996) y metil jasmonato (Belhadj A., *et al.*, 2006). Luego con un nivel de inducción (10,9 veces) una putativa cafeoyl CoA O- metil transferasa (VVCCGS2208D04.b) involucrada en la síntesis de lignina, específicamente en una de las vías de metilación de lignina (Zhong *et al.*, 1998),

también se identificó un EST que presenta una razón bp/bv=9, con similitud a una proteína DEX1 de arroz (VVCCGS1025E11.g), la cual está involucrada en la formación de exina en el desarrollo del polen (Paxson-Sowders *et al.*, 2001). Un EST con homología a una acuaporina (VVCCGC1046C09.g) también se encuentra inducida en las bayas partenocárpicas 8,8 veces; la expresión de aquaporinas en vid depende del estadio del desarrollo (Fouquet R *et al.*, 2008).

En las bayas partenocárpicas se encuentran fuertemente inducidos dos genes involucrados en la biosíntesis de flavonoides; la chalcona sintasa (VVCCGC2047E09.b, bp/bv=6,4) y chalcona isomerasa (VVCCGC2086C11.b bp/bv=7), sin embargo otros 6 ESTs anotados como putativos genes chalcona sintasa se encuentran reprimidos en distinta intensidad en las bayas partenocárpicas (VVCCGC1016F07.g -8.4v; VVCCGC1054H01.g -6.2v VVCCGC1033A12.g -3.2v VVCCGS2227C10.b -6.4v , VVCCGS1054D06.g, -3.3v y VVCCGC1032H11.g -2.2v).

Por otro lado, en la Tabla 5 se detalla el listado de los 30 ESTs con mayor nivel de represión en las bayas partenocárpicas. En primer lugar, con una represión de 91 veces se encuentra el EST VVCCGS2117F10.b con homología a una proteína hipotética de *Arabidopsis thaliana* sin función asignada. Con una represión en las bayas partenocárpicas respecto de las bayas semilladas de 29,1 veces aparece un EST con similitud a un factor de elongación putativo (VVCCGC2061A04.b). También se encuentra un EST con similitud a una secuencia de glutathion S- transferasa (VVCCGC3060C04.b) reprimida 25,9. Un conjunto de secuencias relacionadas con la síntesis de fenilpropanoides y flavonoides se incluyen en esta lista, una antocianina permeasa (VVCCGS2230B05.b) reprimida 23,9 involucrada en la acumulación de antocianinas en la vacuola Conn *et al.*, 2008 y Mathews *et al.*, 2003), la fenil amonio liasa (VVCCGS1015E02.g, bp/bv= -17,4) y flavonoide 3',5'-hidroxilasa (VVCCGS1001G01.g) reprimida 8,5 veces en las bayas partenocárpicas respecto de las bayas verdes. Se destaca también el ESTVVCCGS2104A10.b que codifica para un receptor de etileno putativo y que está reprimido en las bayas partenocárpicas 11,8 veces. Asociados a la regulación del desarrollo floral y frutal se encuentran reprimidos los genes representados por los ESTs, VVCCGC3073C10.b (bp/bv= 8,7) ortólogo de LFY (V-FUL) y VVCCGC3081A10.b (bp/bv= 9,7) homólogo de MADS4, ambos factores de transcripción son claves durante el proceso de desarrollo.

Tabla 4: Detalle de los 30 genes con mayor nivel de inducción en bayas partenocárpicas respecto de las bayas semilladas. Se especifica la anotación funcional asignada a cada secuencia la tasa de cambio de expresión (fold= bp/bv) y el valor de significancia estadística (p-value).

EST	Función	p-value	Fold
WCCGC3051B08.b	Weakly similar to Putative glucan endo-1,3-beta-glucosidase 1 precursor ((1->3)-beta-glucan endohydrolase) ((1->3)-beta-glucanase) (Beta-1,3-endoglucanase) (Beta-1,3-glucanase), partial (21.5%)	0,00	15,0
WCCGC2038D06.b	Weakly similar to spermidine synthase 1 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)], partial (29.2%)	0,00	14,9
WCCGS2208D04.b	Homologue to caffeoyl-CoA O-methyltransferase [Solanum tuberosum], partial (67.4%)	0,00	10,9
WCCGS1038D01.g	Weakly similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana], partial (82.6%)	0,00	10,1
WCCGC1060B11.g	Weakly similar to transfactor-like [Oryza sativa (japonica cultivar-group)], partial (30.4%)	0,00	9,0
WCCGS1025E11.g	Weakly similar to putative dex1 protein [Oryza sativa], partial (14.3%)	0,00	9,0
WCCGC1043F10.g	Weakly similar to putative translation-initiation factor 3 subunit [Prunus avium], partial (26.7%)	0,00	9,0
WCCGC3038H04.b	Similar to Al-induced protein [Gossypium hirsutum], partial (49.5%)	0,00	8,9
WCCGC1046C09.g	Homologue to aquaporin [Vitis vinifera], partial (84.8%)	0,00	8,8
WCCGC3029C06.b	Similar to Similar to ATP-citrate-lyase [Arabidopsis thaliana], partial (48.1%)	0,00	8,7
WCCGC1039H09.g	Weakly similar to glutathione S-transferase 2 [Papaver somniferum], partial (70.1%)	0,00	8,7
WCCGS1048G10.g	Weakly similar to hypothetical protein [imported] - Arabidopsis thaliana, partial (12.6%)	0,00	8,0
WCCGS1066A06.g	Similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana], partial (60.7%)	0,00	7,5
WCCGC2033H01.b	Homologue to receptor-like protein kinase 2 [Glycine max], partial (21.3%)	0,00	7,5
WCCGS1045E03.g	Similar to ubiquitin-specific protease 7, putative (UBP7) [Arabidopsis thaliana], partial (68.2%)	0,00	7,5
WCCGS1050B10.g	Weakly similar to putative Na ⁺ /H ⁺ -exchanging protein [Arabidopsis thaliana], partial (13.0%)	0,02	7,4
WCCGC1074F12.g	Similar to transfactor, putative [Arabidopsis thaliana], partial (64.6%)	0,04	7,2
WCCGC2018A08.b	Similar to putative protein kinase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)], partial (51.5%)	0,00	7,0
WCCGC1079H03.g	Weakly similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana], partial (31.0%)	0,01	7,0
WCCGC2086C11.b	Weakly similar to putative chalcone isomerase [Lycopersicon esculentum], partial (71.4%)	0,01	6,9
WCCGS1035F04.g	Weakly similar to OSJNBa0001M07.1 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)], partial (47.6%)	0,04	6,9
WCCGS1045H07.g	Weakly similar to triterpene UDP-glucosyl transferase UGT71G1 [Medicago truncatula], partial (60.7%)	0,03	6,8
WCCGS1011G03.g	Weakly similar to putative protein [Arabidopsis thaliana], partial (48.4%)	0,00	6,8
WCCGS1016F10.g	Weakly similar to putative AtBgamma protein [Arabidopsis thaliana], partial (41.0%)	0,01	6,7
WCCGC3034H07.b	Similar to putative ripening-related protein [Vitis vinifera], partial (62.0%)	0,03	6,5
WCCGS1076B01.g	Weakly similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana], partial (38.2%)	0,01	6,5
WCCGC3039C02.b	Weakly similar to unnamed protein product [Arabidopsis thaliana], partial (10.5%)	0,01	6,4
WCCGC2083C02.b	Similar to At5g46570 [Arabidopsis thaliana], partial (43.7%)	0,00	6,4
WCCGS1015A01.g	No hits found.	0,02	6,4
WCCGC2047E09.b	Homologue to chalcone synthase [Vitis vinifera], partial (86.8%)	0,00	6,4

Tabla 5: Detalle de los 30 genes con mayor nivel de represión en bayas partenocárpicas respecto de las bayas semilladas. Se especifica la anotación funcional asignada a cada secuencia, la tasa de cambio de expresión (fold= Bp/Bv) y el valor de significancia (p-value).

EST	Función	p-value	Fold
VCCGS2117F10.b	Weakly similar to hypothetical protein [Arabidopsis thaliana], partial (31.7%)	0,00	-91,1
VCCGC2061A04.b	Weakly similar to putative elongation factor [Solanum demissum], partial (57.9%)	0,00	-29,1
VCCGC3060C04.b	Weakly similar to putative glutathione S-transferase [Arabidopsis thaliana], partial (65.0%)	<.0001	-25,9
VCCGS2230B05.b	Weakly similar to putative anthocyanin permease [Lycopersicon esculentum], partial (77.0%)	0,00	-23,9
VCCGS2243G12.b	Weakly similar to SNF2/SWI2 family global transcription factor [Arabidopsis thaliana], partial (11.9%)	0,02	-18,4
VCCGS1015E02.g	Homologue to Phenylalanine ammonia-lyase, partial (73.4%)	0,00	-17,4
VCCGS1083D04.g	Weakly similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana], partial (38.1%)	0,01	-17,2
VCCGS1013C07.g	Weakly similar to OSJNBb0065J09.17 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)], partial (14.9%)	0,00	-15,8
VCCGS2104F10.b	Weakly similar to putative DNA-damage inducible protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)], partial (43.8%)	0,01	-15,4
VCCGS2202C11.b	Weakly similar to unnamed protein product [Arabidopsis thaliana], partial (28.2%)	0,01	-13,7
VCCGC3072D02.b	Weakly similar to unnamed protein product [Arabidopsis thaliana], partial (27.4%)	0,00	-12,3
VCCGC1012H05.g	Similar to pyruvate kinase [Glycine max], partial (69.5%)	0,00	-11,9
VCCGS2104A10.b	Weakly similar to ethylene receptor [Delphinium 'MagicFountains dark blue'], partial (26.0%)	0,00	-11,8
VCCGC2031H11.b	Weakly similar to dehydration-induced protein RD22-like protein [Gossypium hirsutum], partial (92.6%)	0,02	-11,3
VCCGC3060C09.b	Similar to putative translation factor [Pinus pinaster], partial (45.0%)	0,01	-10,0
VCCGS2103H01.b	Homologue to polyubiquitin [Pseudotsuga menziesii var. menziesii], partial (41.8%)	0,04	-10,0
VCCGC3073C10.b	Homologue to FUL-like protein; VFUL-L [Vitis vinifera], partial (76.1%)	0,00	-9,7
VCCGS2106E10.b	Weakly similar to OSJNBb0116K07.15 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)], partial (32.4%)	0,00	-9,6
VCCGS2110E04.b	Similar to unknown [Arabidopsis thaliana], partial (49.2%)	0,02	-9,5
VCCGC2036G02.b	Similar to RNA-directed RNA polymerase [Solanum demissum], partial (16.1%)	0,00	-9,4
VCCGC1037E04.g	Similar to At2g33430/F4P9.20 [Arabidopsis thaliana], partial (64.2%)	0,00	-9,3
VCCGC1034C01.g1	Similar to RING-H2 finger protein RHF2a [Arabidopsis thaliana], partial (30.1%)	0,00	-9,3
VCCGC1025E03.g	Similar to expansin [Vitis labrusca x Vitis vinifera], partial (57.4%)	0,04	-9,2
VCCGS1052H11.g	Weakly similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana], partial (42.1%)	0,02	-9,1
VCCGC1022F09.g	Weakly similar to putative protein [Arabidopsis thaliana], partial (26.4%)	0,02	-8,8
VCCGS2111B07.b	Weakly similar to At1g07140/F10K1.27 [Arabidopsis thaliana], partial (55.5%)	<.0001	-8,7
VCCGC3081A10.b	Homologue to MADS-box protein 4 [Vitis vinifera], partial (48.7%)	0,01	-8,7
VCCGS2121E10.b	Weakly similar to exonuclease family protein [Arabidopsis thaliana], partial (57.5%)	0,00	-8,7
VCCGC1017B02.g	Similar to chlorophyll ab binding protein [Gossypium hirsutum], partial (35.3%)	<.0001	-8,6
VCCGS1001G01.g	Similar to flavonoid 3',5'-hydroxylase [Gossypium hirsutum], partial (27.9%)	0,02	-8,5

B- Metabolismo de Poliaminas y contenidos de poliaminas libres.

A continuación en la Figura 27 se representa la tasa de cambio de expresión de ESTs de genes relacionados con el metabolismo de poliaminas. Los ESTs inducidos corresponden a una SAM sintetasa (VVCCGS2257E04.b), SAM descarboxilasa (VVCCGC3002E08.b) y espermidina sintetasa (SPDS1; VVCCGC2038D06.b y VVCCGS2208G09.b), y poliamino oxidasa (PAO; VVCCGC2030C02.b). Un EST para espermina sintetasa se encuentra reprimido (SPMSyn; VVCCGC2061H02.b1), en la Tabla 6 se detalla la anotación de cada EST.

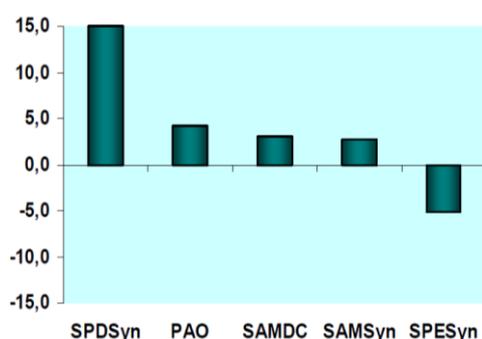


Figura 27: Tasa de cambio de la expresión de genes involucrados en el metabolismo de poliaminas en bayas partenocárpicas respecto de bayas semilladas en estadio I; SDPSyn1: espermidina sintetasa 1, PAO: poliamina oxidasa, SAMDC: SAM descarboxilasa, SAMSyn1: SAM sintetasa 1, SPESyn: espermina sintetasa, SAMSyn2: SAM sintetasa 2. Los valores positivos significan inducción y los valores negativos indican represión en las bayas partenocárpicas.

Tabla 6: Detalle de los EST del metabolismo de poliaminas. Nombre de cada EST de la colección de DEGECHIVID, su anotación y porcentaje de similitud y la relación de expresión en bayas partenocárpicas respecto de las bayas verdes normales:

EST	Función	p-value	Fold
VVCCGC2038D06.b	Weakly similar to spermidine synthase 1 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)], partial (29.2%)	0,00	14,93
VVCCGC2030C02.b	Weakly similar to putative polyamine oxidase [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)], partial (12.7%)	0,06	4,16
VVCCGC3002E08.b	Similar to S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme [<i>Vitis vinifera</i>], partial (73.2%)	0,00	3,06
VVCCGS2257E04.b	Similar to S-adenosyl-L-methionine synthetase 1 [<i>Catharanthus roseus</i>], partial (35.0%)	0,00	2,62
VVCCGC2061H02.b1	Similar to putative spermine synthase [<i>Taxodium distichum</i>], partial (60.4%)	0,003	-5.2

Los resultados obtenidos sugieren alteraciones en la síntesis y/o catabolismo de las poliaminas, por lo tanto, con la finalidad de comparar el contenido de poliaminas entre las bayas semilladas y las bayas partenocárpicas, se determinaron los contenidos de Dap, Put y Spd solubles en el estadio del desarrollo más temprano posible donde se puede discriminar entre estos dos tipos de bayas, esto es 4 semanas después de la colecta de las flores como tejido referencial. El contenido de poliaminas expresado como nmoles/gr de peso fresco en flores es Dap: 0,6; Put: 6,3 y Spd 15,6. Posteriormente, en las bayas en desarrollo (bv), las PAs aumentan considerablemente su nivel en las siguientes proporciones respecto de las flores Dap 30 veces, Put: 13 veces y Spd: 6,4 veces. En las bayas partenocárpicas el contenido de Dap aumenta en un 50% respecto al valor encontrado en bayas verdes (bv), mientras que Put y Spd duplican su título (Figura 28).

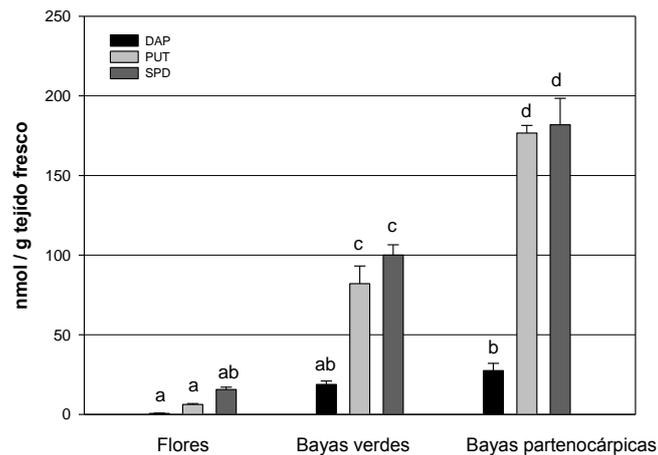


Figura 28: Contenido de Poliaminas libres en flores y bayas en fase I del desarrollo donde se diferencian bayas verdes semilladas y bayas partenocárpicas del cv. Carménère. Las barras representan la media \pm DE (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

C- Señalización mediada por etileno

La vía de síntesis de las poliaminas superiores se inicia en una molécula de S-adenosil metionina, la cual es sustrato para dos vías biosintéticas: la vía de biosíntesis de las poliaminas y la biosíntesis del etileno, por lo que se analizó el comportamiento de las secuencias relacionadas con ambas vías metabólicas incluidas en el macroarreglo. Dentro del conjunto de secuencias de trabajo se encontraron 4 ESTs relacionados con la vía del etileno y todos ellos presentan una represión marcada en las bayas partenocárpicas respecto de bayas semilladas (Figura 29). El EST VVCCGS2104A10.b descrito como un receptor de etileno (ETR), está reprimido 11,8 veces. El EST VVCCGC1059C09.g presentó una razón de expresión bp/bv=-4,1 veces y tiene alta similitud de secuencia con el gen ETR4 de *Solanum lycopersicon*, expresado específicamente durante en desarrollo frutal (Tieman & Klee, 1999). El EST VVCCGS2255G03.b codifica para una proteína similar al factor de transcripción 4 de respuesta a etileno de *Arabidopsis* (ERF4), mostró estar reprimido 4,3 veces respecto de bayas semilladas. AtERF4 es inducido por etileno, ácido jasmónico y ABA actuando como un represor transcripcional en la defensa y resistencia al ataque por patógeno fúngico (Yang *et al.*, 2005). El EST VVCCGC3071C01.b codifica para una proteína similar a la ACC oxidasa de *Arabidopsis thaliana* y se encuentra reprimida en bayas partenocárpicas 4,1 veces respecto de bayas semilladas.

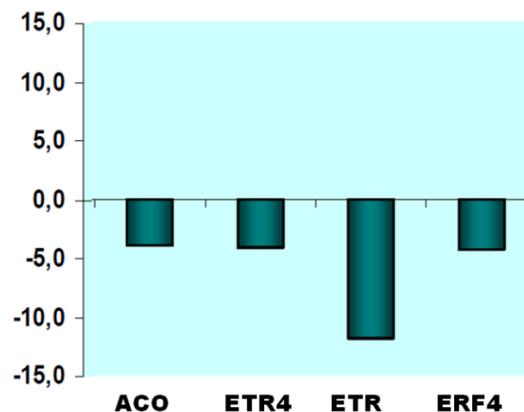


Figura 29: Tasa de cambio de la expresión de genes para la vía de síntesis de etileno en bayas partenocárpicas respecto de bayas semilladas en estadio I. ACO: ACC oxidasa, ETR: receptor de etileno 4; ETR: receptor de etileno, ERF4: factor de transcripción 4 de respuesta a etileno. La razón de expresión indica BP/BV y los valores negativos indican represión en las bayas partenocárpicas.

De acuerdo a los resultados mostrados la diferencia fenotípica entre las bayas partenocárpicas y las bayas “normales” va acompañada de la modificación global del perfil transcripcional (805 ESTs). Específicamente los genes asociados al metabolismo de poliaminas se encuentran en su mayoría inducidos lo cual se correlaciona con el contenido de PAs libres que aumenta en las bayas partenocárpicas y adicionalmente, genes relacionados con la vía de síntesis y respuesta a etileno están reprimidos.

III.3.2 Expresión de genes involucrados en el metabolismo de poliaminas y etileno determinados mediante qPCR tiempo real.

Los resultados presentados hasta acá nos indican que a nivel transcripcional el metabolismo de PAs y etileno se modifica a lo largo del desarrollo reproductivo (yemas →flores→frutos. El *millerandage* que ocurre en vides nos permite, en un mismo racimo, la comparación de las bayas de mayor tamaño ($\geq 4\text{mm}$) que formarían semillas y las que detendrían su desarrollo ($\approx 2\text{mm}$). Con el objetivo de conocer una posible relación entre el metabolismo de poliaminas y la ocurrencia de partenocarpia se determinó los niveles de expresión relativa de los genes involucrados en la síntesis de poliaminas, los cuales fueron medidos separadamente en bayas verdes normales (bv) y partenocárpicas (bp), las que son distinguibles en racimos obtenidos 4 semanas después de la floración. Adicionalmente se estableció el patrón génico para la variedad Merlot que al igual que Carménère presenta este fenómeno y Cabernet Sauvignon como cultivar no afectado.

A- Expresión de genes involucrados en la síntesis de Put.

Los niveles de expresión de genes involucrados en la síntesis de Put se detallan en la Figura 30. En el cv. Carménère el nivel de los transcritos del gen *VvADC* disminuyó 4 veces luego de establecido el fruto (f/bv), esta tendencia también ocurrió en C. Sauvignon (f/bv: 4), pero no en Merlot. Al comparar las bayas semilladas con las partenocárpicas del mismo estadio se observó que la expresión de *VvADC* se mantuvo elevada en el cultivar Carménère estableciéndose una diferencia bp/bv=6 veces. Por otra parte los mensajeros de *VvARGI* se acumularon de igual forma en flores y bayas en desarrollo y en las bayas partenocárpicas se acumuló el doble que en bayas semilladas. Entre los tejidos de los cv. C. Sauvignon y Merlot no se observó diferencias significativas. La expresión de *VvODC*

aumentó de manera importante durante el desarrollo de las bayas respecto de las flores en las tres variedades C. Sauvignon: bv/f= 200, Carménère bv/f= 15 y Merlot: bv/bp=104. Al comparar las bayas partenocárpicas con las normales respecto de las mediciones en flores, esta inducción no ocurrió en la variedad Carménère, en Merlot la inducción fue bp/f= 3,3.

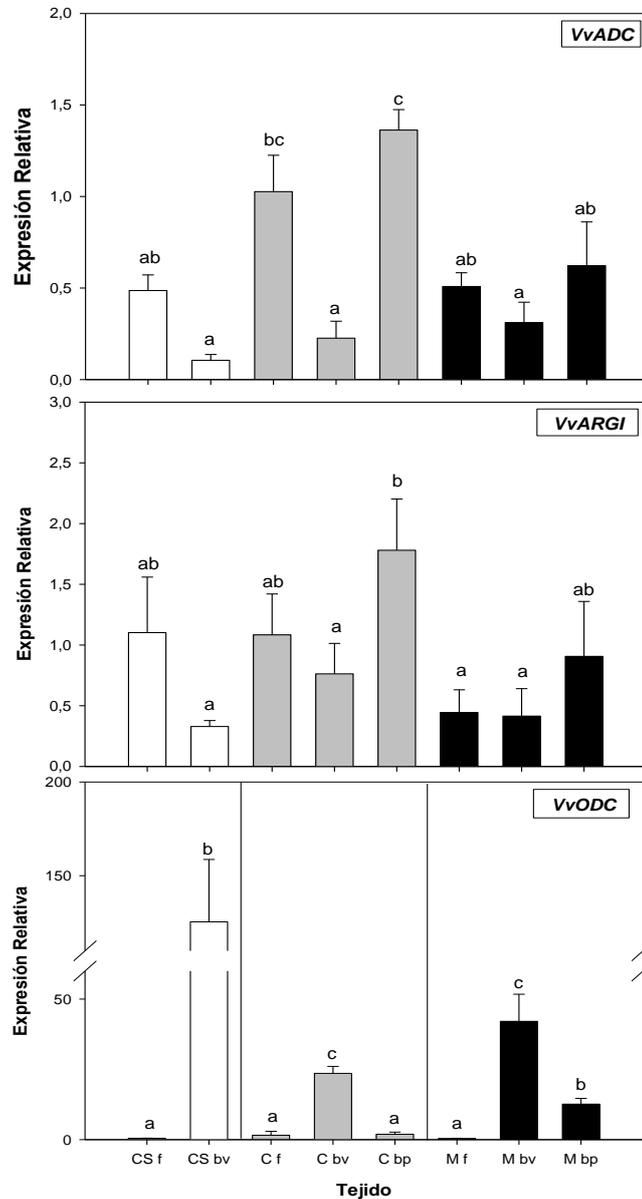


Figura 30: Análisis de la expresión de genes involucrados en la síntesis de Put en relación a la ocurrencia de partenocarpia en *Vitis vinifera*. Los niveles de expresión de VvADC, VvARG1 y VvODC fueron normalizados utilizando el gen VvGAPDH, empleando flor de la variedad Carménère como muestra calibradora. Las muestras utilizadas fueron de tres cultivares: Cabernet Sauvignon (CS), Carménère (C) y Merlot (M) y los órganos evaluados fueron: flores en antesis y a partir de un mismo racimo (f), bayas verdes normales (bv) y bayas partenocárpicas (bp). Las barras representan la media \pm DE (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

B- S-adenosil metionina descarboxilasa.

Para la síntesis de Spd y Spm es necesaria la producción de SAM descarboxilado, reacción llevada a cabo por la SAM descarboxilasa. En el presente trabajo se evaluaron tres genes de vid *VvSAMDC1*, *VvSAMDC2* y *VvSAMDC4*. La expresión de *VvSAMDC1* fue diferente entre las tres variedades evaluadas (Figura 31). Por un lado la expresión del gen cayó luego de la floración en C. Sauvignon (f/bv=4,5), en Carménère y Merlot, esto no ocurrió. Por otro lado comparando entre las bayas partenocárpicas y las normales en Carménère se registró una inducción significativa de *VvSAMDC1* (bp/bv=4), lo que no ocurrió en Merlot entre cuyas muestras no hubo diferencia significativa. La expresión de *VvSAMDC2* se disminuyó luego de la floración en las bayas verdes en crecimiento en C. Sauvignon (f/bv=3.8), mientras que en Carménère y Merlot esto no ocurrió. Comparando entre las bayas semilladas y partenocárpicas del mismo estadio, el nivel de transcritos de *VvSAMDC2* fue significativamente mayor en las bayas partenocárpicas en Carménère (bv/bp=4.8). En Merlot las tres muestras evaluadas no presentaron diferencia significativa.

Finalmente la expresión de *VvSAMDC4* muestra un comportamiento similar en los tres cultivares donde el nivel de transcrito registrado en flores cae significativamente en bayas verdes. En las bayas partenocárpicas se mantiene el mismo nivel de expresión que las flores sin descender como ocurre en las bayas verdes semilladas presentando una diferencia bp/bv de 4 en Carménère y 3,5 en Merlot

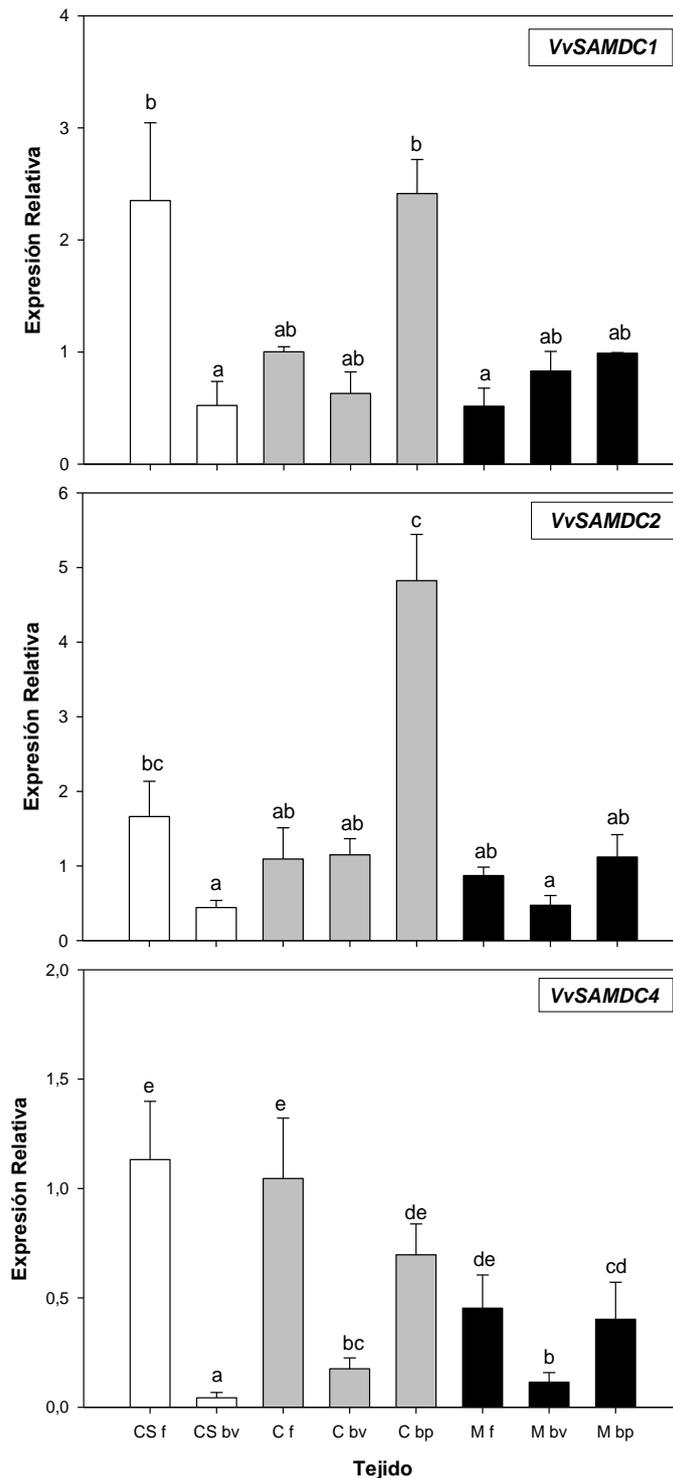


Figura 31: Análisis de la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en la descarboxilación de SAM en relación a la ocurrencia de partenocarpia en *Vitis vinifera*. Los niveles de expresión de *VvSAMDC1*, *VvSAMDC2* y *VvSAMDC4* fueron normalizados utilizando el gen *VvGAPDH*, empleando Flor de la variedad Carménère como muestra calibradora. Las muestras utilizadas fueron de tres cultivares: Cabernet Sauvignon (CS), Carménère (C) y Merlot (M) y los órganos evaluados fueron: flores en anthesis y a partir de un mismo racimo (f), bayas verdes normales (bv) y bayas partenocárpicas (bp). Las barras representan la media \pm DE (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

C- Expresión de genes asociados a la síntesis de poliaminas Spd y Spm.

Los niveles de expresión de tres genes para aminopropiltransferasas se grafican en la Figura 32 considerando los tres cultivares C. Sauvignon, Carménère y Merlot. El nivel de expresión del gen *VvSPDS1* fue mayor en tejido floral que en el de fruto verde en desarrollo siendo esta diferencia significativa en C. Sauvignon y Carménère (F/Bv=6 F/Bv=3). La comparación entre bayas semilladas y partenocárpicas reflejó diferencias en la expresión de este gen en Carménère (Bp/Bv=2,6) pero no en Merlot. Por su parte en la var. C. Sauvignon, el gen *VvSMPS* se vio reprimido en su expresión en bayas verdes comparándolo con flores (Bv/F=-2,5). En las variedades Carménère y Merlot no hubo diferencias en los niveles de mensajero *VvSMPS* entre el tejido floral y el frutal temprano (bayas verdes). Respecto de la partenocarpia, Carménère presentó diferencias significativas en la expresión de este gen donde la razón Bp/Bv es 3.7, en Merlot esto no se observó. Por último el gen putativo de termoespermina sintetasa (*VvACL5-5*) presentó una diferencia de expresión entre flores y bayas en crecimiento en C. Sauvignon (F/Bv=7) pero no en las otras dos variedades. En la variedad Carménère no se registraron diferencias entre los tres tejido evaluados. Sin embargo en Merlot hubo una inducción de 4 veces de *VvACL5-5* en bayas partenocárpicas respecto de las normales y de tejido floral. En resumen estos tres genes tienden a ser reprimidos durante el desarrollo de las bayas respecto de las flores en C. Sauvignon; por otro lado en las dos variedades con incidencia de la partenocarpia, la represión en el fruto no ocurre de igual forma. En las bayas partenocárpicas de Carménère *VvSPDS1* y *VvSPMS* se inducen respecto de las bayas semilladas, pero en Merlot solo se induce *VvACL5-5*.

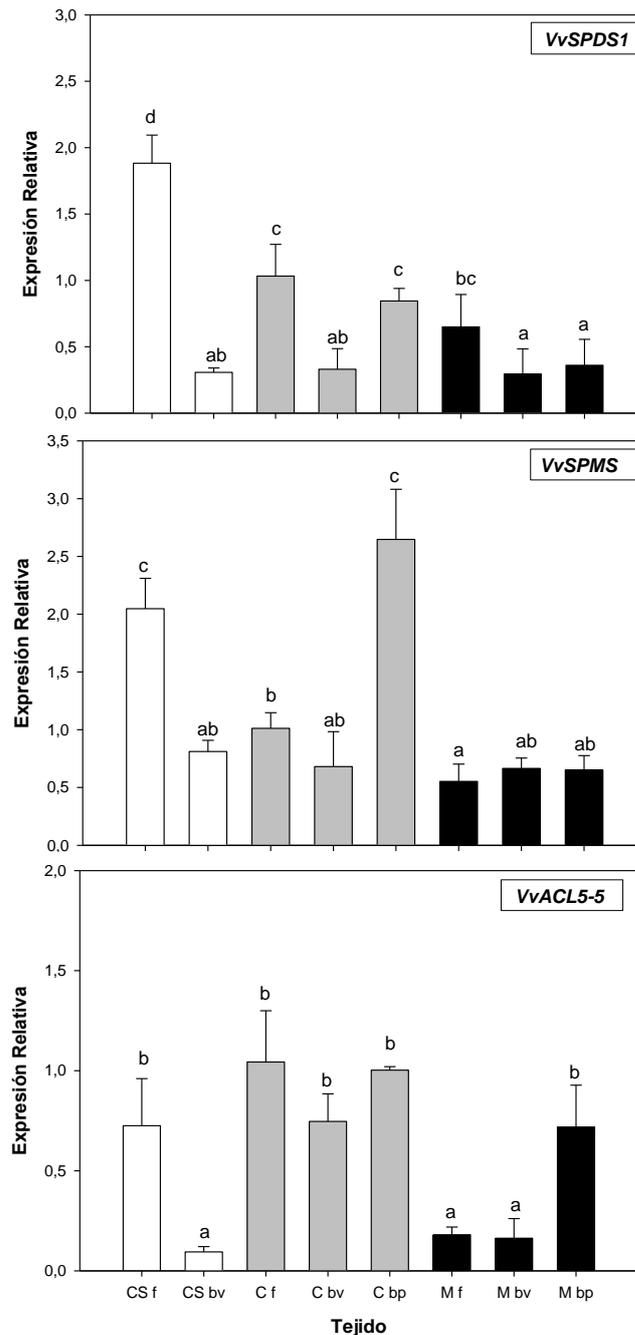


Figura 32: Análisis de la expresión de genes involucrados en la síntesis de Spd en relación a la ocurrencia de partenocarpia en *Vitis vinifera*. Los niveles de expresión de *VvSPDS1*, *VvSPMS* y *VvACL5-5* fueron normalizados utilizando el gen *VvGAPDH*, empleando Flor de la variedad Carménère como muestra calibradora. Las muestras utilizadas fueron de tres cultivares: Cabernet Sauvignon (CS), Carménère (C) y Merlot (M) y los órganos evaluados fueron: flores en antesis y a partir de un mismo racimo (f), bayas verdes normales (bv) y bayas partenocárpicas (bp). Las barras representan la media \pm DE (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

D- Genes involucrados en el catabolismo de poliaminas, *VvPAOs*

La expresión de cinco putativos genes poliamina oxidasa están graficados en la Figura 33. En el caso del gen, *VvPAO1*, en las tres variedades evaluadas su expresión se registró principalmente en tejido floral y luego no se detectó fluorescencia en bayas verdes, sin embargo una pequeña cantidad se registró en bayas partenocárpicas en las variedades afectadas por *millerandage*. El putativo gen *VvPAO2* mostró una disminución significativa de su expresión después de la floración, en bayas verdes en las tres variedades, aunque en Merlot esta variación no fue significativa. Esta represión no ocurrió en bayas partenocárpicas manteniéndose los niveles de expresión de *VvPAO2* casi invariables respecto de flores. Para *VvPAO3* también disminuyó su expresión luego de la floración en C. Sauvignon pero esta disminución no fue significativa para las variedades con *millerandaje*. En las bayas partenocárpicas de Carménère y Merlot la acumulación de *VvPAO3* fue significativamente mayor respecto de las bayas semilladas. *VvPAO4* disminuyó 14 veces el nivel de expresión en bayas verdes en pleno crecimiento en relación a los niveles encontrados en flores en la variedad C. Sauvignon, esto no ocurrió en las variedades que presentan *millerandage* manteniéndose los niveles de transcritos de este gen invariables entre estos dos estadios, sin embargo la relación bp/bv fue de 4 veces en Merlot mientras que Carménère no hubo variación significativa entre las muestras evaluadas. Por último el gen putativo *VvPAO5* que pertenecería al tercer grupo de PAOs, (lisina demetilasa) no presentó variación de la expresión entre flores y bayas verdes en las tres variedades evaluadas, pero si mostró una diferencia significativa entre las bayas verdes, normales y las partenocárpicas en Carménère y Merlot (Bp/Bv= 7 y 12 veces respectivamente).

Las poliamina oxidasa es un grupo de enzimas que difieren en el tipo de reacción que catabolizan y en el sustrato que utilizan y se agrupan en tres grupos descritos por Moschou *et al.* (2008b). Los putativos genes PAO de vid se pueden clasificar de acuerdo a este criterio basándonos en la identidad de secuencia de la proteína deducida para estos genes. De esta forma el producto del gen *VvPAO1* pertenece al primer grupo de catabolismo terminal de Spd y Spm. En el grupo II donde la actividad catalítica es la de reconversión de Spd y Put se incluirían a los putativos genes *VvPAO3* y *VvPAO4*, mientras que la secuencia aminoacídica deducida de *VvPAO2* tiene mayor identidad de secuencia con AtPAO5 cuya actividad enzimática no ha sido descrita previamente. Por último la putativa proteína

codificada por *VvPAO5* tiene mayor identidad con el grupo III de PAOs las cuales tiene actividad Lisina desmetilasa, involucradas en el remodelamiento de cromatina.

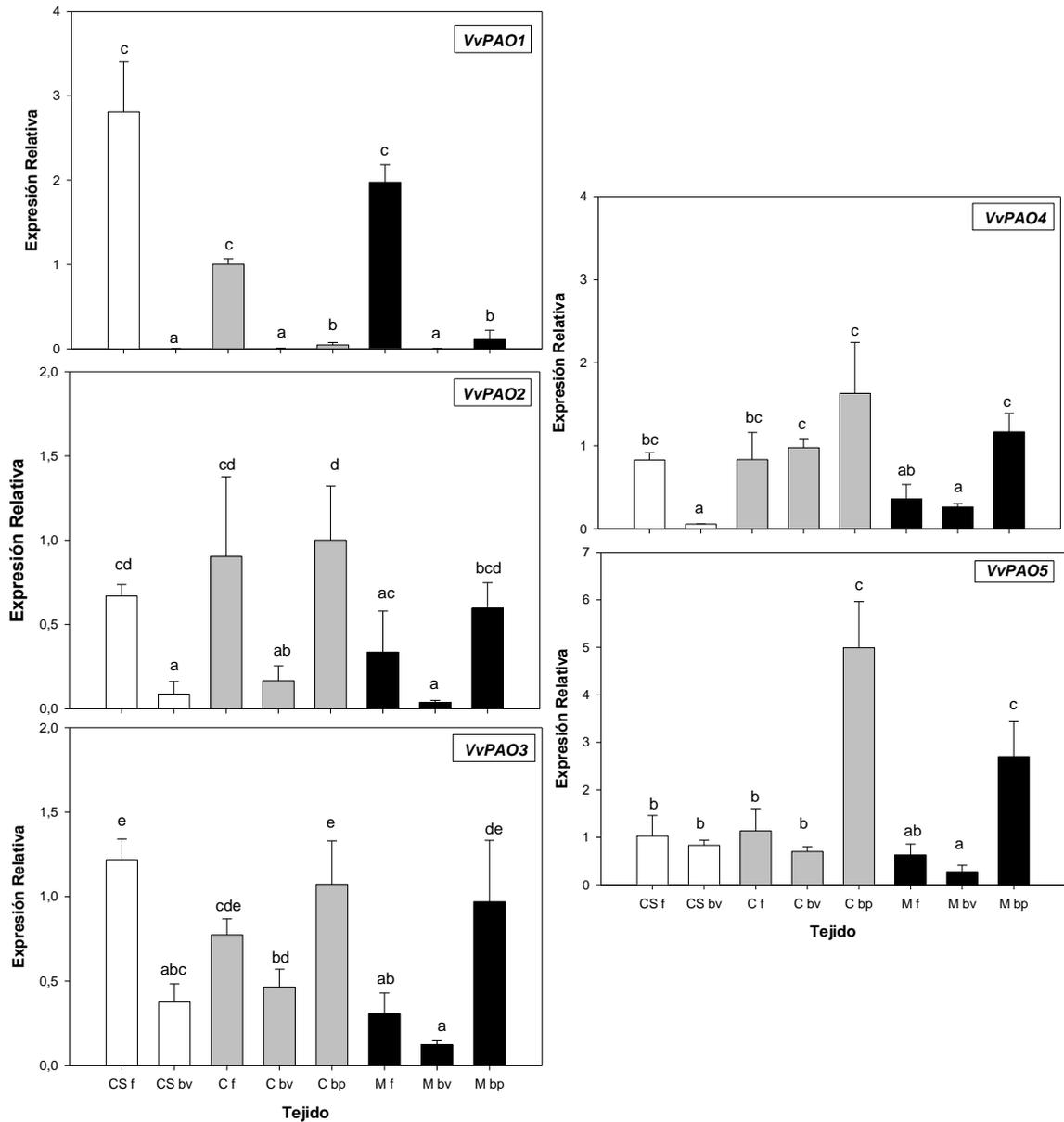


Figura 33: Análisis de la expresión de genes que codifican poliamina oxidasa en relación a la ocurrencia de partenocarpia en *Vitis vinifera*. Los niveles de expresión de *VvPAO1*, *VvPAO3*, *VvPAO4*, *VvPAO2* y *VvPAO5* fueron normalizados utilizando el gen *VvGAPDH*, empleando flor de la variedad Carménère como muestra calibradora. Las muestras utilizadas fueron de tres cultivares: Cabernet Sauvignon (CS), Carménère (C) y Merlot (M) y los órganos evaluados fueron: flores en antesis y a partir de un mismo racimo (f), bayas verdes semilladas (bv) y bayas partenocárpicas (bp). Las barras representan la media \pm DE (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

E- Genes involucrados en la síntesis de etileno

En la síntesis de poliaminas superiores es necesaria la descarboxilación de S- adenosil metionina (SAM), este compuesto es a la vez sustrato inicial en la síntesis de etileno por la acción de la ACC sintasa. Se evaluó el perfil transcripcional de genes los genes *VvACS*, *VvACO6* y *VvACO7* (Figura 34). *VvACS* presentó niveles de transcrito constante entre tejido floral y frutal en las tres variedades que se evaluaron. Existe una diferencia significativa entre las bayas semilladas y las bayas partenocárpicas, estas últimas presentaron una inducción del gen de 10 veces en el cv. Carménère y 4 veces en Merlot. Por su parte el gen *VvACO6* se vio reprimido en bayas verdes respecto de flores en las tres variedades (C. Sauvignon: F/Bv=22; Carménère: F/Bv=12; Merlot: F/Bv=15) y al analizar los niveles de transcritos en bayas partenocárpicas se observó que la acumulación fue significativamente mayor que en bayas semilladas en los dos. El segundo gen codificante de una ACC oxidasa putativa, *VvACO7*, se observó reprimido en bayas verdes respecto del tejido floral, y considerando las bayas partenocárpicas y normales de Carménère y Merlot se evidencia una inducción del gen incluso superando los registros de expresión en flores (Carménère: Bp/Bv=6 y Merlot: Bp/Bv=8).

Los niveles de poliaminas libres mostrados en la sección III.3.1 b (Figura 28), muestran que los contenidos de Put, Spd y Dap en las bayas partenocárpicas son mayores que los valores determinados en las bayas semilladas, lo cual concuerda con los resultados de expresión.

Los resultados de esta sección muestran una clara modificación del perfil transcriptómico del metabolismo de poliaminas y de los genes asociados a la síntesis etileno evaluados. Las modificaciones del nivel de transcripción observadas en la transición flor→baya en el cv. Carménère presentan una tendencia a disminuir o mantener la transcripción de los genes evaluados luego de que ha ocurrido la fructificación. Esta tendencia también se observa en el cv C. Sauvignon, aunque en cv. Merlot esto no se mantiene estrictamente.

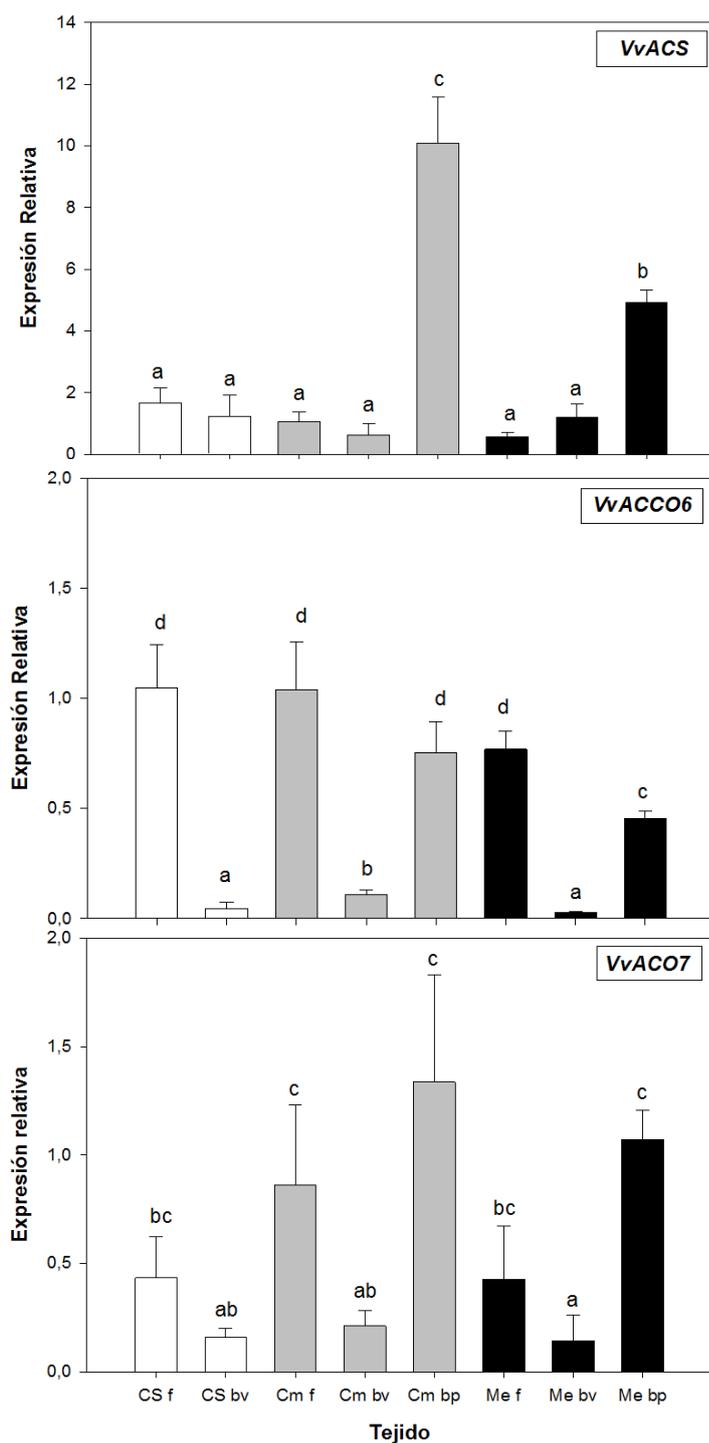


Figura 34: Análisis de la expresión de genes que codifican poliamina oxidasa en relación a la ocurrencia de partenocarpia en *Vitis vinifera*. Los niveles de expresión de *VvACS*, *VvACO6* *VvACO7* fueron normalizados utilizando el gen *VvGAPDH*, empleando flor de la variedad Carménère como muestra calibradora. Las muestras utilizadas fueron de tres cultivares: Cabernet Sauvignon (CS), Carménère (C) y Merlot (M) y los órganos evaluados fueron: flores en antesis y a partir de un mismo racimo (f), bayas verdes normales (bv) y bayas partenocárpicas (bp). Las barras representan la media \pm DE (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

IV. DISCUSIÓN

IV.1 En el genoma de la vid, las enzimas del metabolismo de poliaminas son (en general) codificadas por familias génicas.

Como primera etapa en el estudio de la expresión de genes asociados al metabolismo de poliaminas durante el proceso global de desarrollo reproductivo en vides, ellos fueron identificados y caracterizados estructuralmente. La disponibilidad del genoma de la vid (Jaillon *et al.* 2007) permitió la búsqueda de las diferentes secuencias codificantes para enzimas del metabolismo de poliaminas. En base a este análisis se ha establecido que:

VvADC: la secuencia descrita en las librerías de expresión de Carménère (DEGECHIVID) corresponde a aquella descrita previamente por Priminkirios *et al.*, (1999). La ausencia de secuencias adicionales en el genoma de la vid (www.genoscope.fr) confirma que este gen es de copia única. El análisis de las relaciones filogenéticas basado en el árbol construido demuestra que VvADC se encuentra cercanamente relacionada con aquellas secuencias de las dos especies leñosas incluidas en el análisis, manzana y durazno, con las que comparte la presencia de un péptido señal de destinación a cloroplasto (Hao *et al.*, 2005, Liu *et al.*, 2009). El alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas permitió identificar los motivos conservados de unión a sustrato (Poulin *et al.*, 1992); el sitio de unión a piridoxal fosfato, cofactor requerido por las descarboxilasas para su actividad (Moore y Boyle, 1990) y el sitio de procesamiento proteolítico de ADC (Bell y Malmberg, 1990) La secuencia aminoacídica deducida a partir del gen VvADC aislado de la variedad Carménère contiene un sitio de unión a DFMO, compuesto descrito como inhibidor de ODC (Michael *et al.*, 1996).

VvARGI: La secuencia del gen obtenido desde la base de datos DEGECHIVID indica que éste codifica para una putativa arginasa. En el genoma de la vid se ubica en el cromosoma 15 y corresponde a un gen de copia única. Ello difiere de lo descrito en *Arabidopsis* (Flores *et al.*, 2008) y tomate (Chen H *et al.*, 2004) donde se han descrito dos genes para esta enzima. El alineamiento múltiple muestra un elevado porcentaje de similitud (91%) con ARG1 de *Ricinus communis*, destacando la conservación de los sitios de unión a Mn^{+2} y de unión a del grupo guanidinio del sustrato, típicos de arginasas eucarióticas (Figura 6; Chen H. *et al.*, 2004). Filogeneticamente, VvARGI se agrupa junto con AtARG1I de *A. thaliana*, sin embargo, la región N-terminal presenta la mayor divergencia entre estas proteínas dado que en este dominio se localiza un péptido señal que

determina la localización mitocondrial de las enzimas de *Arabidopsis* y tomate (Flores *et al.*, 2008 y Chen H. *et al.*, 2004), el cual estaría ausente en VvARGI.

VvSAMDCs: La secuencia VVCCGC1003E04.g anotada como un gen codificante para una SAMDC-like proveniente de las librerías de DEGECHIVID, se ubicaría en el cromosoma 11 y que en este estudio ha sido denominada como VvSAMDC2. VvSAMDC1 homóloga a aquella descrita por Tassoni *et al.*, (2007) se localizó en el cromosoma 1. La búsqueda de secuencias parálogas resultó en la identificación de 2 genes adicionales, VvSAMDC3 y VvSAMDC4 localizadas en el cromosoma 5 y en el cromosoma 14, respectivamente. Los cuatro genes para SAMDC conservan los motivos característicos de estas proteínas específicamente tres residuos de glutámico, requeridos para el procesamiento proteolítico de la pro enzima y su activación (Xiong H, *et al.*, 1997). El motivo YVLSESS de activación de enzima y el motivo PEST que está asociado a la degradación proteolítica de la enzima y por lo tanto importante en el rápido recambio de ella (Lee *et al.*, 1997), están presentes en todas las VvSAMDCs codificadas en el genoma de la vid. El árbol filogenético agrupa las proteínas VvSAMDC1 y VvSAMDC4 con las enzimas de dicotiledóneas y a VvSAMDC2 con similares proteínas de especies monocotiledóneas. VvSAMDC3 se ubica en un clado más divergente junto con AtSAMDC4, la que ha demostrado tener un rol importante durante el desarrollo del sistema vascular en inflorescencias y raíces y durante alteraciones en el metabolismo de PAs (Ge *et al.*, 2006).

Al igual que el gen VvSAMDC1 descrito por Tassoni *et al.*, (2007) los tres genes adicionales para SAMDC no presentan intrones en el marco de lectura principal y poseen en su extremo 5' un par de marcos de lectura pequeños (μ ORFs), los cuales son característicos de los genes para SAMDC de plantas que se asocia con un mecanismo de regulación traduccional (Franceschetti *et al.*, 2001).

Genes para aminopropiltransferasas: Las reacciones de síntesis de poliaminas superiores como Spd y Spm son llevadas a cabo por un grupo de enzimas llamadas aminopropil transferasas que catalizan la adición consecutiva de grupos aminopropilo en lados opuestos de la putrescina. Estas reacciones son llevadas a cabo por la Spd sintetasa, que utiliza como sustrato la Put, y por la Spm sintetasa cuyo sustrato es Spd. En *A. thaliana* se han descrito dos genes para SPD sintetasa (*AtSPDS1* y *AtSPDS2*) y un gen para Spm sintetasa *AtSPMS* (Panicot *et al.*, 2002; Urano *et al.*, 2003; Imai *et al.*, 2004). Adicionalmente se ha identificado un gen cuyo producto es responsable de la síntesis de

termoespermina denominado *AtACL5* (Hanzawa *et al.*, 2000; Imai *et al.*, 2004). En las librerías de expresión de DEGECHIVID se identificó 3 genes denominados *VvSPDS1*, *VvACL5-5* y *VvSPMS*; y adicionalmente se identificaron a *VvACL5-4* y *VvSPDS*. El análisis filogenético las agrupó en cuatro clados distinguibles y en el alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de aminopropil transferasas de vid y *Arabidopsis* se identifican regiones conservadas como el motivo de unión a S-adenosil metionina descarboxilado y los aminoácidos de unión a Spd y Put esenciales para la actividad catalítica (Figuras 10 y 11; Korolev, *et al.*, 2002).

Poliamina oxidasas: En el presente trabajo se identificó 6 genes putativos codificantes para la actividad PAO, en el genoma de la vid: *VvPAO1*, *VvPAO2*, *VvPAO3*, *VvPAO4*, *VvPAO5* y *VvPAO6*. Los dominios característicos de las PAOs incluyen un sitio de unión no covalente a flavina y utiliza como sustrato derivados no acetilados. De acuerdo a Moschou *et al.*, (2008b), se clasifican de la siguiente forma: i) aquellas que están involucradas en el catabolismo terminal de las PAs, la oxidación ocurre en el C en el sitio interno al amino secundario como las PAOs de *Zea mays* (Federico *et al.*, 1989), *Hordeum vulgare*: *HvPAO1* y *HvPAO2* (Cervelli *et al.*, 2001) *Avena sativa* (Maiale *et al.*, 2001); ii) las que efectúan la reconversión “back converssion” de las poliaminas donde la oxidación ocurre en el C externo al amino secundario como las PAO1 de *Nicotiana tabacum* (Yoda *et al.*, 2003) *Arabidopsis thaliana*, *AtPAO1* (Yoda *et al.*, 2003, Tavladoraki 2006), *AtPAO3* (Moschou *et al.*, 2008), *AtPAO4* (1-5 T. Kamada-Nobusada *et al.*, 2008), *AtPAO1-5* (Takahashi *et al.*, 2010) y iii) las que contienen un dominio PAO pero no pueden desaminar PAs, poseen dominio amino oxidasa y motivo SWRIM de unión a DNA, presente en proteínas involucradas en el remodelado de la cromatina y un dominio conservado de desmetilación de histonas (Shi *et al.*, 2004)

De acuerdo al análisis de secuencia, deducimos que *VvPAO1* podría tener una función como PAO de catabolismo terminal, ya que los aminoácidos del sitio catalítico son idénticos a los presentados por la PAO de maíz (Tavladoraki *et al.*, 1998). Las putativas *VvPAO2-4* pertenecerían a las PAOs del grupo II de reconversión caracterizadas y de acuerdo a los porcentajes de identidad determinados *VvPAO2* estaría involucrada en $\text{Spm} \rightarrow \text{Spd}$ (Takahashi *et al.*, 2010), *VvPAO4* y *VvPAO3* en $\text{Spm} \rightarrow \text{Spd} \rightarrow \text{Put}$ (Tavladoraki *et al.*, 2006 y Takahashi *et al.*, 2010.). *VvPAO2* tiene mayor similitud con *AtPAO5* la cual no ha sido descrita en cuanto a su actividad bioquímica. *VvPAO5* y *VvPAO6* se clasifican dentro del grupo III de PAOs propuesto por Moschou *et al.*, (2008b)

las cuales no tendrían actividad sobre las poliaminas, pero si la presencia del dominio SWIRM de unión a DNA característicos de proteínas involucradas en el remodelamiento de la cromatina. En este grupo se encuentran las Lys desmetilasas (Shi *et al.*, 2004). LSD1 funciona como un co-represor transcripcional a través de la actividad histona desmetilasa específica a la H3lysina 4 que está ligada a la transcripción activa. Los homólogos de LSD de *A. thaliana* promueven la transición floral a través de la represión de represores florales (Jiang *et al.* 2007). Por lo tanto, se hace interesante el estudio en profundidad de estos dos putativos genes *VvPAO5* y *VvPAO6* como reguladores de la transcripción.

IV.2 Genes involucrados en la síntesis de poliaminas y de etileno se encuentran transcripcionalmente activos durante la inducción floral.

En vides el desarrollo reproductivo procede a lo largo de dos temporadas de crecimiento consecutivas, la inducción floral ocurre durante la formación de las yemas en la primera temporada (verano año 1), luego cuando las condiciones ambientales se vuelven adversas, las yemas entran en dormancia (otoño –invierno). Luego el desarrollo reproductivo se reanuda con la ruptura de la yema y comienza la segunda temporada de crecimiento (primavera) y prosigue la diferenciación de las inflorescencias. Finalmente, la sucesión de la floración, fructificación y madurez de los frutos ocurren.

La expresión de *VvADC* se incrementó en yemas latentes sugiriendo que la acumulación de Put podría ocurrir durante el proceso de inducción floral en vides. En *Arabidopsis*, la expresión constitutiva de *ADC2* provocó un aumento en el contenido de Put (pero no de Spd y Spm), retraso en la floración y enanismo como consecuencia de una disminución de la concentración de giberelinas activas GA_4 y GA_1 (Alcazar *et al.* 2005). Al inicio del desarrollo de yemas latentes, dos genes que codifican para SAMDC (*VvSAMDC3* y *4*) se expresaron de manera elevada y disminuyeron gradualmente durante el periodo de inducción floral. Las proteínas SAMDC generarían SAM descarboxilado (SAMdc) el cual dona los grupos aminopropilo para la formación de Spd y Spm por la Spd sintasa (*VvSPDS*) y Spm sintasa (*VvSPMS*), respectivamente. En este sentido, se observó niveles elevados en la expresión de los genes *VvSPDS1*, y *VvACL5-5* en yemas latentes, durante el periodo de inducción floral (Figura 17). Estudios en *Arabidopsis* muestran que la Spd sería importante para la inducción floral. La aplicación de inhibidores de la síntesis de Spd (CHA, sulfato de dicitclohexilamonio; DFMO, difluormetilornitina) en *Arabidopsis*

disminuyen la concentración de Spd en la planta y bloquean el proceso de inducción floral (Applewhite *et al.*, 2000). La aplicación de Spd a plantas de *Arabidopsis* en condiciones no inductivas de la floración (días cortos), incrementa la concentración de esta hormona en la planta y la tasa de floración (Applewhite *et al.*, 2000). Un aumento en la concentración de Spd durante la inducción floral ha sido informado en *Polianthes tuberosa*, una planta de día neutro (Huang *et al.*, 2004). Por otro lado, una reducción en el contenido de Put y Spm en cormos de *P. tuberosa* se asociaron con la inducción floral (Huang *et al.*, 2004). Sin embargo, en frutilla (*Fragaria x annanasa*) y en *Xanthium strumarium*, dos plantas de día corto, un aumento en el contenido de Put, Spd y Spm se asoció con el proceso de inducción floral (Tarengi & Martin-Tanguy 1995).

En *Pharbitis nil*, una planta de día corto, se ha observado que la aplicación exógena de etileno durante el periodo nocturno de inducción, producía la disminución de ABA y la inhibición de la inducción floral en las yemas de las plántulas (Wilmowicz *et al.*, 2008). En crisantemo la aplicación de etefon (un inhibidor de etileno) a plantas silvestres induce la formación de roseta, se pierde la capacidad para florecer y la planta entra en dormancia; esta misma aplicación, hecha a plantas de crisantemo transformadas con un receptor de etileno mutado no genera esta respuesta, por el contrario se elonga y florece; de igual forma la aplicación de frío genera la misma respuesta (Sumitomo *et al.*, 2008). En las yemas de *Vitis vinifera* los genes *VvACS* y los dos genes para ACO se inducen durante el periodo de inducción floral, lo que concuerda con un el efecto inductor de dormancia del etileno descrito por Sumitomo. Adicionalmente, y de manera opuesta se comportan los genes tipo *SAMDC* que disminuyen su expresión y por lo que no se acumularía la enzima que compite por el sustrato SAM de la ACS. De esta forma el etileno tendría un rol importante al final de la inducción floral o mejor previo a la entrada en dormancia.

Por lo mencionado, el aumento en la expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de poliaminas durante el desarrollo de yemas latentes en vid sugiere que las poliaminas estarían relacionadas al proceso de inducción floral en esta especie. Sin embargo, estudios adicionales son necesarios para determinar el contenido de poliaminas en yemas de vid al momento de la transición floral y para establecer la distribución espacial de los transcriptos (por ejemplo mediante hibridación *in situ*) dentro de la yema que encierra a primordios de inflorescencia, foliares y de zarcillos.

IV.3. La inducción de *VvACS* y *VvPAO* cuando se retoma el desarrollo de inflorescencias concuerda con el estrés oxidativo que ocurre en las yemas durante esta transición.

El desarrollo de yemas algodonosas marca el reinicio del crecimiento y las primeras etapas del desarrollo de las flores y sus partes en la vid y se produce una vez que la planta ha acumulado una cantidad de “horas frío” necesarias para satisfacer las demandas de cada cultivar. Análisis del contenido de poliaminas en yemas de vid que han satisfecho la cantidad de “horas frío” en el cultivar “Superior Seedless” mostró una disminución significativa en el contenido de Put y un aumento en el contenido de Spm mientras que el contenido de Spd permaneció elevado (Mohamed *et al.*, 2010). La Spd y Spm están implicadas en procesos activos de crecimiento ya que estimularían la síntesis de ADN, ARN y proteínas requeridas para la formación de nuevas células (Igarashi & Kashiwagi, 2000). Por otro lado, estudios de la concentración de poliaminas en yemas en avellano mostraron que altos niveles de Spd y Spm y bajos niveles de Put coinciden con el momento en que se retoma el crecimiento de yemas (Rey *et al.*, 1994). El producto del gen tipo *ACL5* se asocia a la generación de termoespermina a partir de Spd y SAM descarboxilado; en yemas algodonosas de vid, el aumento en la expresión del gen *VvACL5-5* el que codificaría para una putativa termoespermina contribuiría al incremento de poliaminas. Adicionalmente varias líneas de evidencia indican que la liberación de la dormancia provocada por el tratamiento con cianamida y azida sódica involucra un estrés respiratorio que genera estrés oxidativo, inducción de la glicólisis y fermentación e incremento de la producción de etileno (Ophir *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2009). Más aun, se ha establecido que el etileno y el peróxido de hidrógeno actúan como moléculas señal activando genes relacionados con un sistema de defensa antioxidante en respuesta al tratamiento de hipoxia en yemas de vid (Vergara *et al.*, 2012). Los resultados mostrados en esta tesis concuerdan con esto último ya que si el gen *VvPAOI* (putativa poliamina oxidasa de catabolismo) se induce fuertemente a la salida de dormancia y contribuiría al aumento del peróxido en las yemas y además la fuerte inducción de la expresión de *VvACS* previo a la salida de dormancia mediaría la síntesis de etileno.

IV.4. Durante el desarrollo floral-frutal de vid los genes codificantes del metabolismo de PAs y etileno se encuentran regulados de acuerdo al tejido y etapa del desarrollo.

La Put se sintetiza a partir de arginina siguiendo dos vías que incluyen la actividad de ADC y de ARG1. La expresión de *VvADC* y *VvARG1* fue detectada en todos los estadios desde LC hasta baya madura (Figura 20). El perfil del contenido de poliaminas se modifica a lo largo del desarrollo del fruto si lo vemos como un tejido que se inicia con la flor. Así Geny *et al.* (1997, en vid cv. C. Sauvignon) muestra como las PAs (libres, conjugada y unidas) presentan niveles muy elevados en flores al momento de antesis y luego en la fructificación, posteriormente a lo largo del desarrollo de las bayas los valores de PAs totales disminuye hasta valores mínimos en la madurez (Colín *et al.*, 2002; Aziz Aziz, 2003). La expresión de los genes del metabolismo de PAs no siguen esa tendencia: *VvADC*, *VvSAMDC1*, tienden a disminuir desde LC hasta bayas verdes post cuaja o baya pinta y nuevamente aumentan su expresión en bayas maduras. Esto ocurre con el gen *ADC* de durazno donde hay una mayor expresión en frutos maduros comparados con frutos de 23 días después de floración (Liu *et al.*, 2009). Los genes *VvSAMDC2* y *4* y *VvSPDS1* tienen su máximo de expresión en flores y luego cae la expresión en bayas verdes excepto *SAMDC2* que disminuye en baya pinta. *VvPAO1* se expresa casi exclusivamente en LC y flores. Esta putativa PAO1 ha sido clasificada como una PAO de catabolismo terminal Moschou *et al* (2008a), por lo tanto podría estar mediando la acumulación de peróxido como señal, la cual más adelante en el desarrollo ya no sea necesaria.

En el tejido reproductivo se puede observar que hay una fuerte expresión de *VvACL5-5* en LC, la cual decae progresivamente en antesis y a través del desarrollo del fruto. Se ha descrito que el mutante *acl5-1* de *A. thaliana* presenta ausencia de la elongación del tallo (Hanzawa *et al.*, 2000) y que *AtACL5* se inmunolocaliza en el sistema vascular de hojas (Pommerrenig *et al.*, 2011). Adicionalmente la relación filogenética entre *AtACL5* y *VvACL5-5* descrita en este trabajo, nos induce a proponer una posible relación entre la elongación del raquis de la inflorescencia y la expresión de *VvACL5-5* en LC. Una vez que ha ocurrido la fructificación, el tejido carpelar entra en una fase con elevada tasa de división celular. Previo a la síntesis replicación del ADN, en la transición desde la fase G1 a S del ciclo celular, hay un fuerte aumento de la biosíntesis de Spd y Spm, (Kakkar y Sawhney, 2002) lo que podríamos explicar con la inducción de *VvSpd1* en floración.

Durante el proceso de floración hay una gran acumulación de poliaminas especialmente Put (Geny *et al.*, 2002). Este aumento podría deberse principalmente a la translocación de poliaminas o sus precursores desde otros órganos hacia el tejido floral, donde la fuerte inducción de *VvACL5-5*, *VvSPD1*, *VvSAMDC4*, *VvSAMDC2* y *VvPAO1* mantendrían un ciclo de síntesis y catabolismo de Spd. Como producto del catabolismo de PAs habría un aumento en los niveles de H₂O₂ que actuaría como molécula señal.

En vides se ha descrito un alza en el contenido de etileno durante la floración que cae abruptamente en la fructificación (Weaver y Singh 1978) y un segundo incremento de etileno endógeno, previo a la entrada en *veraison*, el cual se corresponde directamente con el aumento de la actividad ACO y el previo aumento transitorio de los mensajeros del gen *ACO* (Chervin *et al.*, 2004). A lo largo del desarrollo reproductivo los cambios morfogenéticos que ocurren en la flor y la baya han sido ampliamente estudiados (Carmona *et al.*, 2008). Adicionalmente se ha descrito la inducción de varios receptores y factores de transcripción asociados con la señalización de etileno durante el desarrollo de las bayas (Chervin & De Luc, 2010). Los resultados presentados en este trabajo indican que a lo largo del desarrollo normal de flor y de bayas, el nivel transcripcional de *ACS* no se modifica pero si aumenta la expresión de dos genes *ACO*, En primer término denominado *VvACO6* que se induce en tejido floral al momento de la antesis coincidiendo con el aumento de etileno descrito por Weaver & Singh (1978), y posteriormente el gen *VvACO7* que se activa en la etapa de envero, coincidiendo con el incremento en la síntesis de etileno descrita por Chervin *et al.* (2004).

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

IV.5.A El análisis transcriptómico global en bayas de vid indica alteraciones del metabolismo de poliaminas y etileno en bayas partenocárpicas de Carménère.

En vides, variedades como Carménère y Merlot poseen alta tendencia al desarrollo de partenocarpia, que se manifiesta en la producción de racimos que contienen tanto bayas semilladas como bayas de pequeño tamaño que no contienen semilla. Este fenómeno también conocido como *millerandage* es variable de temporada en temporada (Mullins *et al.*, 1992) y su origen se ha relacionado con la una baja capacidad germinativa del polen

generada por alteraciones estructurales del grano de polen (Alva, 2013), lo que redundaría en una fertilización incompleta del gametofito femenino. Las bayas partenocárpicas exhiben notorias deficiencias en su desarrollo lo que se traduce finalmente en alteraciones metabólicas que afectan su composición química y por consiguiente la calidad de los frutos obtenidos.

La producción de bayas semilladas y partenocárpicas durante la manifestación del fenómeno de *millerandage* en las variedades referidas, provee un excelente modelo para analizar los procesos de expresión génica asociados al desarrollo frutal en vides. En un primer análisis se ha establecido los perfiles transcriptómicos en diferentes estadios del desarrollo floral/frutal en la variedad Carménère. ESTs representativos de 4803 genes activos durante el desarrollo reproductivo de la vid (Peña-Cortés *et al.*, 2005) fueron incluidos en un macroarreglo e hibridados con cDNAs obtenidos a partir de mRNA total de frutos normales y partenocárpicas al estadio de pre-verano. La comparación de los niveles de expresión registrada para dichos genes en ambos tipos de muestras permitió identificar 805 genes expresados diferencialmente en bayas partenocárpicas (420 inducidos y 385 reprimidos). Antecedentes bibliográficos han relacionado el fenómeno de partenocarpia con déficit de micronutrientes esenciales tales como boro, zinc y molibdeno (Mullins *et al.*, 1992 y Vasconcelos *et al.*, 2009, Gainza *et al.*, 2012 y Pérez-Castro *et al.*, 2012) así como con alteraciones en el metabolismo de poliaminas (Colin *et al.*, 2002).

El trabajo realizado en esta tesis mostró diferencias en la expresión de los genes que codifican para enzimas claves del metabolismo de las poliaminas entre bayas semilladas y partenocárpicas. La inducción de los genes *SAMS*, *SAMDC* y *SPDS* y la represión del gen *SPMS*, sugiere que en bayas partenocárpicas, la acumulación de espermidina se encuentra favorecida. El aumento en los niveles de transcritos de genes del tipo *SAMDC* y *SAMS* en bayas partenocárpicas promueve la acumulación de SAM descarboxilado, sustrato de la enzima *SPDS*, responsable de la síntesis de espermidina. Por otro lado, se observó una inducción de un gen que codifica para una putativa enzima del tipo PAO la cual sería responsable del catabolismo o reconversión de espermidina. Moschou *et al.* (2008a) sugieren que la enzima PAO de *Arabidopsis thaliana* podría mediar no solo el catabolismo de espermidina y espermina, sino también la reconversión de espermina → espermidina y espermidina → putrescina. Tales antecedentes son coherentes con los resultados obtenidos en la determinación de poliaminas en bayas semilladas y partenocárpicas que indican una significativa acumulación de putrescina y espermidina observada en estas últimas. Estos

resultados indican que tal como se ha descrito previamente en la variedad Merlot, las bayas no semilladas registran contenidos elevados de poliaminas (Colin *et al.*, 2002).

Las vías de síntesis de etileno y de poliaminas comparten un precursor común S-adenosil metionina (SAM). El análisis de los resultados de la hibridación del macroarreglo indica que el gen ACO que codifica para ACC oxidasa, enzima clave en la síntesis de etileno, se encuentra reprimido en bayas no semilladas. Este resultado no concuerda con lo detectado mediante qRT-PCR en las bayas partenocárpicas, donde la vía biosintética de etileno podría estar activada, como lo indica la inducción de los genes para ACS y ACO evaluados y la diferencia detectada pueden ser explicada por el hecho que el EST EST VVCCGC3071C12.b anotado como “Similar to putative ethylene-forming enzyme [*Arabidopsis thaliana*], partial, incluido en el macroarreglo, ha sido posteriormente reanotado “PREDICTED: *Vitis vinifera* protein SRG1-like (LOC100263198), mRNA” (NCBI: XM_002272083.2), perteneciente a la superfamilia 2OG-Fe (II), la cual comparte un dominio conservado con los genes *VvACO*.

Sin embargo en las bayas partenocárpicas, la represión de dos putativos receptores de etileno y un factor de transcripción de respuesta a etileno, evaluados en el macroarreglo, si sugieren una reducción del funcionamiento de la vía de señalización de esta hormona. Ello puede explicar algunos atributos exhibidos por las bayas partenocárpicas pues si bien el fruto de la vid no es climatérico, Chervin *et al.*, (2004) han descrito el incremento endógeno de etileno durante el desarrollo del fruto, alcanzando un nivel máximo durante el estadio de pre-verano. El bloqueo de la percepción de etileno en este estadio de desarrollo evitaría el incremento del tamaño de las bayas, un incremento en su acidez total y la inhibición de la síntesis de antocianinas, características que son típicas de las bayas partenocárpicas. Si las alteraciones del metabolismo de PAs detectadas en las bayas partenocárpicas se traducen en un desacoplamiento de la vía de señalización de etileno, es un aspecto que deberá ser estudiado.

IV.5.B El análisis transcripcional mediante qRT-PCR: Las modificaciones transcripcionales del metabolismo de poliaminas respecto de la partenocarpia ocurren en Carménère y Merlot.

El contenido de poliaminas en tejidos reproductivos de vides es esencialmente variable a lo largo del desarrollo frutal, registrando una disminución progresiva luego de la fructificación según ha sido reportado anteriormente (Colín *et al.*, 2002). La evolución del perfil de concentración de PAs es fuertemente dependiente del cultivar analizado. Así mientras que en los cultivares C. Sauvignon y Pinot Noir los niveles de PAs totales alcanzan su máximo en antésis, luego disminuyen en la etapa de fructificación (Geny *et al.*, 1997; Aziz, 2003), en el cultivar Merlot la disminución de PAs totales ocurre en estados previos del desarrollo floral (5 días previos a la antesis; Aziz, 2003). Tales diferencias pueden explicar las distintas características fisiológicas que exhiben los distintos cultivares. Ejemplo de ello es el comportamiento descrito para Pinot Noir y Merlot frente a la abscisión frutal durante la etapa de fructificación, siendo Pinot Noir de baja abscisión y Merlot corresponde a un cultivar de alta abscisión. Sin embargo, la aplicación exógena de Spd disminuye la abscisión en Merlot en tanto que la inhibición de la síntesis de Spd aumenta la abscisión en Pinot Noir (Aziz, 2003). Los resultados obtenidos en este trabajo en relación con el contenido de PAs son distintos a los registrados para los cultivares mencionados anteriormente. En este caso los niveles de PAs libres (Put y Spd) aumentan en las bayas en fase I de desarrollo con respecto a flores, estableciéndose diferencias en el contenido de PAs entre bayas normales semilladas y las bayas partenocárpicas no semilladas. A diferencia de Merlot, el cultivar Carménère no presenta menor tendencia a la abscisión y probablemente estos elevados valores de PAs en las bayas partenocárpicas estarían contribuyendo en este sentido.

Durante el desarrollo de las bayas de vid se ha observado que hay un alza en la actividad PAO justo antes de la floración; al final de la floración y durante la fructificación la actividad de PAO cae abruptamente previo a la acumulación de Dap. En flores los valores de Dap son bajos pero aumentan hasta alcanzar su máximo en bayas pequeñas. De esta forma Colin *et al.*, (1999) propone como indicador del inicio de la floración al máximo en la actividad de PAO y como marcador de la fructificación al máximo en contenido de Dap. La producción de frutos partenocárpicos en *Citrus*

clementina inducida por GAs causa aumento de contenido de Put, disminución de Spd y se mantiene el nivel de Spm; en este sistema estas variaciones están en concordancia con modificaciones transcripcionales de los genes *CcODC2* que aumenta, *CcSPDS* disminuye y *CcSPMS1* y *CCACL5* que no varían en su expresión (Trenor *et al.*, 2010).

En este trabajo hemos presentado como el nivel transcripcional de los genes involucrados en el metabolismo de poliaminas se modifica a lo largo del desarrollo normal de los órganos reproductivos (flores y bayas) del cv. Carménère. A continuación de discutirá sobre los resultados obtenidos durante la transición flor→baya en fase I del desarrollo normal, en comparación con bayas partenocárpicas del cv. Carménère. Conjuntamente se evaluaron los cv. Merlot donde también incide la partenocarpia (Colín *et al.*, 2002) y el cv. C. Sauvignon donde no ocurre la partenocarpia. Los resultados provienen de tres muestras biológicas y en Carménère las mediciones se validaron en dos temporadas adicionales.

De acuerdo a los resultados de esta tesis, después de la floración, en las bayas semilladas la cantidad de Put y Spd se duplica y se acumula Dap. En función de la actividad transcripcional de los elementos genéticos del metabolismo de poliaminas se propone una posible explicación.

En las bayas semilladas en fase I del desarrollo la fuerte inducción de la transcripción de *ODC* mediaría la acumulación de Put en las bayas verdes. Por su parte el mantenimiento de los niveles de mensajeros de *SAMDC*, *SPMS* y *ACL5* favorecerían la síntesis de Spm pero la transcripción sostenida de las PAOs de reconversión (*VvPAO3* y *VvPAO4*) mantendría un flujo Spm → Spd, acumulándose entonces Spd. Por otro lado si bien el gen *PAO* de catabolismo terminal *VvPAO1* se reprime fuertemente en las bayas semilladas, el incremento de Dap en las mismas puede explicarse considerando: i) previo, en la floración, *VvPAO1* ha estado fuertemente inducido lo que favorecería la acumulación de esta proteína y ii) la enzima PAO muestra un desfase entre su máximo de actividad (al inicio de la floración) y el máximo de acumulación del producto de reacción Dap en la fructificación (Colin *et al.*, 1999).

Las modificaciones a nivel transcripcional en la transición flor→fruto para los genes involucrados en el metabolismo de PAs ocurren con la misma tendencia (inducción-represión) en los cv. Carménère y Merlot. Sin embargo existen en el caso de las

aminopropiltransferasas diferencias con el cv. Cabernet Sauvignon, la cual no presenta *millerandage*.

En las bayas partenocárpicas la transcripción de *ODC* no se modifica respecto de lo que ocurre en flores, sin embargo en las bayas partenocárpicas se acumula un tercio más de Put que en las bayas semilladas lo cual estaría favorecido por la inducción de *ADC* y *ARGI* en las bayas partenocárpicas. Por su parte los mensajeros de *SAMDC*, *SPS1* y *SPMS* favorecerían la síntesis de Spd y Spm. El incremento en la transcripción *VvPAO3* y *VvPAO4* mantendría la reconversión Spm → Spd y por lo tanto “ausencia” de Spm. Finalmente, si bien el gen *PAO* de catabolismo terminal *VvPAO1* no se induce fuertemente en las bayas partenocárpicas, el mantenimiento de Dap se podría explicar también por que la enzima PAO muestra un desfase entre su máximo de actividad (al inicio de la floración) y el máximo de acumulación del producto de reacción Dap (en la fructificación, Colin *et al.*, 1999),

VvPAO5 se expresa de manera constitutiva entre los órganos florales y las bayas durante su desarrollo normal, el aumento de *VvPAO5* (este gen codificaría para una putativa PAO del tipo III un tipo de lisina desmetilasa, Moschou *et al.*, 2008a) tendría un rol negativo en algún proceso normal de la baya, ya que también se ve marcadamente inducido en zarcillos y en las bayas partenocárpicas donde el programa de desarrollo ha sido especificado durante la formación de las yemas en la temporada anterior.

El gen *AtPAO4* se expresa de manera basal constitutivamente pero presenta gran inducción en raíz. El mutante deficiente de *AtPAO4* muestra una inducción en genes involucrados en la biosíntesis de flavonoides y lignina (*PAL1*, Kamada- Nobusada *et al.*, 2008). Así el aumento en las bayas partenocárpicas de la expresión de los genes *VvPAO2*, *3* y *4* concuerda con los datos de macroarreglo donde en Bayas partenocárpicas se reprime un homólogo de PAL (bp/bv=-17,4)

Los resultados obtenidos a partir de la hibridación del macroarreglo concuerdan con los resultados provenientes de qRT-PCR. A su vez los resultados de qRT-PCR para el cv. Carménère presentados se repitieron en tres temporadas diferentes, encontrándose que la tendencia en la modificación de los perfiles transcripcionales se mantiene. Una excepción esto fue el EST *SPMS* (VVCCGC2061H02.b1). Luego del análisis de secuencia y de acuerdo a su similitud con el gen *AtACL5*, fue renombrado como *VvACL5-5*; en el macroarreglo este gen se reprime, mientras que las mediciones por qRT-PCR no muestra diferencia significativa. Sin embargo al repetir la medición en dos temporadas adicionales

en el cv. Carménère y comparando con lo que ocurre en cv. Merlot podemos decir que la expresión de este gen se encuentra influenciada por factores concerniente a la temporada de crecimiento como condiciones medioambientales, nutricionales y de manejo.

V. CONCLUSIONES

- 1) Con excepción de los genes para las enzimas ADC y ARG1 que corresponden a genes de copia única, las enzimas del metabolismo de PAs son codificados por familias multigénicas.
- 2) Durante los eventos de inducción floral y desarrollo floral y frutal en vides, los genes que codifican tanto para enzimas del metabolismo de PAs como para la enzima ACC oxidasa de la vía de síntesis de etileno, son expresados diferencialmente en forma estado-específica.
- 3) En bayas partenocárpicas no semilladas se registran modificaciones del patrón de expresión de los genes asociados al metabolismo de PAs, respecto de bayas semilladas. Tales modificaciones concuerdan con el aumento en el contenido de PAs libres detectados en este tipo de frutos.
- 4) En general, cultivares que tienen similar tendencia al “millerandage como Merlot y Carménère, presentan perfiles de expresión similares para la mayoría de los genes asociados al metabolismo de PAs. Excepción a ello son los genes *VvSAMDC1* y 2; *VvSPD1*, *VvSPM* y *VvACL5-5*.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Alabadí, D. & J. Carbonell (1999). Differential expression of two spermidine synthase genes during early fruit development and in vegetative tissue of pea. *Plant Mol. Biol.* **39**: 933-943.
- Alcázar, R., Garcia-Martinez, J.L., Cuevas, J.C., Tiburcio, A.F. & T. Altabella (2005). Overexpression of *ADC2* in *Arabidopsis* induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency. *Plant J.* **43**: 425-436.
- Alcázar, R., Marco, F., Cuevas, J., Patron, M., Ferrando, A., Carrasco, P., Tiburcio, A. & T. Altabella (2006). Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnol. Lett.* **28**: 1867-1876.
- Alcázar, R., Planas, J., Saxena, T., Zarza, X., Bortolotti, C., Cuevas, J., Bitrián, M., Tiburcio, A.F. & T. Altabella (2010). Putrescine accumulation confers drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants over-expressing the homologous Arginine decarboxylase 2 gene. *Plant Physiol. Biochem.* **48**: 547-552.
- Almada, R. (2009). Análisis transcripcional de genes relacionados con las vías de inducción y represión floral en *Vitis vinifera* L. Tesis Doctoral. Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca. 124 pp.
- Alva, O. (2013). Análisis estructural y funcional de genes para aminopropil transferasas de *Vitis vinifera* L. y la evaluación de su rol en el desarrollo frutal. Tesis Doctoral. Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca. 174 pp.
- Applewhite, P., Kaur-Sawhney R. A. & W. Galston (2000). A role for spermidine in the bolting and flowering of *Arabidopsis*. *Physiol. Plant.* **108**: 314-320.
- Aziz, A., Brunb, O. & J-C. Audrana (2001). Involvement of polyamines in the control of fruitlet physiological abscission in grapevine (*Vitis vinifera*). *Physiol. Plant.* **113**: 50-58.
- Aziz, A. (2003). Spermidine and related-metabolic inhibitors modulate sugar and amino acid levels in *Vitis vinifera* L.: possible relationships with initial fruitlet abscission. *J. Exp. Bot.* **54**: 355-363.
- Bagni, N. & A. Tassoni (2001). Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids.* **20**: 301-317.

- Bell, E. & R.L. Malmberg (1990). Analysis of a cDNA encoding arginine decarboxylase from oat reveals similarity to the *Escherichia coli* arginine decarboxylase and evidence of protein processing. *Mol. Gen. Genet.* **224**: 431-436.
- Bhatnagar, P., Minocha, R. & S.C. Minocha (2002). Genetic manipulation of the metabolism of polyamines in Poplar cells. The regulation of putrescine catabolism *Plant Physiol.* **128**: 1455-1469.
- Boss, P., Davies, C. & S. Robinson (1996). Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol.* **111**: 1059-1066.
- Boss, P.K. & M.R. Thomas (2002). Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature.* **416**: 847-850.
- Boss, P.K., Buckeridge, E.J., Poole, A. & M.R. Thomas (2003). New Insights in Grapevine Flowering. *Funct. Plant Biol.* **30**: 593-596.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F. & J. Martin-Tanguy (1999). Polyamines and environmental challenges: recent developments. *Plant Sci.* **140**: 103-125.
- Calò, A., Di Stefano, R., Costacurta, A. & G. Calò (1991). Characterization of Cabernet franc and Carménère (*vitis* sp.) and explanations on their cultivation in Italy. *Riv. Vitic. Enol.* **3**: 3-25.
- Calonje, M., Cubas, P., Martínez-Zapater, J.M. & M.J. Carmona (2004). Floral meristem identity genes are expressed during tendril development in grapevine. *Plant Physiol.* **135**: 1491-1501.
- Carmona, M.J., Chaïb, J., Martinez-Zapater, J.M. & M.R. Thomas (2008). A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. *J. Exp. Bot.* **59**: 2579-2596.
- Cawthon DL & Morris JR (1982) Relationship of seed number and maturity to berry development, fruit maturation, hormonal changes and uneven ripening of 'Concord' (*Vitis vinifera* L.) grapes. *J Am Soc Hortic Sci* 107: 1097–1104.
- Cervelli, M., Cona, A., Angelini, R., Polticelli, F., Federico, R. & P. Mariottini (2001). A barley polyamine oxidase isoform with distinct structural features and subcellular localization. *Eur. J. Biochem.* **268**: 3816-3830.
- Chang, S., Puryear, J. & J. Cairney (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* **11**: 113-116.

- Chen, H., McCaig, B.C., Melotto, M., He, S.Y. & G.A. Howe (2004). Regulation of Plant Arginase by Wounding, Jasmonate, and the Phytotoxin Coronatine. *J. Biol. Chem.* **279**: 45998-46007.
- Chervin, C., El-Kereamy, A., Roustan, JP., Latché, A., Lamon, J. & M. Bouzayen (2004). Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Sci.* **167**: 1301-1305.
- Chervin, C. & L. Deluc (2010). Ethylene signalling receptors and transcription factors over the grape berry development: gene expression profiling. *Vitis.* **49**: 129-136.
- Colin, L., Geny, L., Cherrad, M. & M. Broquedis (1999). Activities of polyamines oxidases and diaminopropane contents during flowering of *Vitis vinifera* L. *Vitis.* **38**: 139-140.
- Colin, L., Cholet, C. & L. Geny (2002). Relationship between endogenous polyamines, cellular structure and arrested growth of grape berries. *Aust. J. Grape Wine R.* **8**: 101-108.
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R. & P. Tavladoraki (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends Plant Sci.* **11**: 80-88.
- Coombe, B.G. (1960). Relationship of growth and development to changes in sugars, auxins, and gibberellins in fruit of seeded and seedless varieties of *Vitis vinifera*. *Plant Physiol.* **35**: 241-250.
- Coombe BG (1995) Growth stages of the grapevine: Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Aust J Grape Wine Res* **1**:104-110
- Cuevas, J.C., Lopez-Cobollo, R., Alcazar, R., Zarza, X., Koncz, C., Altabella, T., Salinas, J., Tiburcio, A.F. & A. Ferrando (2008). Putrescine is involved in *Arabidopsis* freezing tolerance and cold acclimation by regulating ABA levels in response to low temperature. *Plant Physiol.* **148**: 1094-1105.
- Daykin, A., Scott, I.M., Causton, D.R. & D. Francis (1997). Gibberellin dose not accelerate rates of cell division in the dwarf pea shoot apical meristem. *J. Exp. Bot.* **48**: 1147-1150.
- Del Duca, S., Beninati, S. & D. Serafini-Fracassini (1995). Polyamines in chloroplasts: identification of their glutamyl and acetyl derivatives. *Biochem. J.* **305**: 233-237.
- Desjouis, M., Le Dily, F. & J. Boucaud (1996). Evidence for a polyamine-mediated control of soluble nitrogen mobilisation during post-clipping re-growth of white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Growth Regul.* **19**: 257-264.

- D'Orazi D & N. Bagni (1987) in vitro interactions between polyamines and pectic substances. *Biochem Biophys Res Commun.* **148(3)**:1259-63.
- Evans, P.T. & R. Malmberg (1989). Do polyamines have role in plant development? *Annu. Rev. Plant Physiol.* **40**: 235-269.
- Federico R., Alisi C., Forlani F. (1989) Properties of polyamines oxidase from the cell wall of maize seedlings. *Phytochemistry* **28**: 45-46.
- Fennell, A. & E. Hoover (1991). Photoperiod influences growth, bud dormancy and cold acclimation in *Vitis labruscana* and *V. riparia*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **116**: 270-273.
- Feuerstein BG, Williams LD, Basu HS & LJ.Marton (1991) Implications and concepts of polyamine-nucleic acid interactions. *J Cell Biochem.* 46(1):37-47.
- Flores, T., Todd, C.D., Tovar-Mendez, A., Dhanoa, P.K., Correa-Aragunde, N., Hoyos, M.E., Brownfield, D.M., Mullen, R.T., Lamattina, L. & J. C. Polacco (2008). Arginase-Negative Mutants of *Arabidopsis* Exhibit Increased Nitric Oxide Signaling in Root Development. *Plant Physiol.* **147**: 1936-1946.
- Franceschetti, M., Hanfrey, C., Scaramagli, S., Torrigiani, P., Bagni, N., Burtin D. & A.J. Michael (2001). Characterization of monocot and dicot plant S-adenosyl-l-methionine decarboxylase gene families including identification in the mRNA of a highly conserved pair of upstream overlapping open reading frames. *Biochem. J.* **353**: 403-409.
- Fredes, V. (2007). Caracterización de la fertilidad de yemas, componentes del rendimiento y estructura de racimo del cultivar Carménère (*Vitis vinifera* L.) bajo clima templado. Memoria de título, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca. 44 pp.
- Friend, A. P. & M.C.T. Trought (2007). Delayed winter spur-pruning in New Zealand can alter yield components of Merlot grapevines. *Aust. J. Grape Wine R.* **13**: 157-164.
- Galston, A. & R. Kaur-Sawhney (1995). Other hormonal compounds. Polyamines and endogenous growth regulators. En Davies P. J. (ed.) *Plant hormone: Physiology, biochemistry and molecular biology* 2^{da} Edition Kluwer Academic Publishers, Boston pp. 158-178.
- Gainza-Cortés, F., Pérez-Díaz, R., Pérez-Castro, R., Tapia, J., Casaretto, J.A., González, S., Peña-Cortés, H., Ruiz-Lara, S. & E. González (2012). Characterization of a

- putative grapevine Zn transporter, VvZIP3, suggests its involvement in early reproductive development in *Vitis vinifera* L. BMC Plant Biol. **12**: 111.
- Ge, C., Cui, X., Wang, Y., Hu, Y., Fu, Z., Zhang, D., Cheng, Z. & J. Li (2006). BUD2, encoding an S-adenosylmethionine decarboxylase, is required for *Arabidopsis* growth and development. Cell Res. **16**: 446-456.
- Geny, L., Broquedis, M., Martin-Tanguy, J. & J. Bouard (1997). Free, conjugated, and wall-bound polyamines in various organs of fruiting cuttings of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. Am. J. Enol. Vitic. **48**: 80-84.
- Gillaspy, G., Ben-David, H. & W. Gruissem (1993). Fruits: a developmental perspective. Plant Cell. **5**: 1439-1451.
- Gómez-Jiménez, M.C., Paredes, M.A., Gallardo, M. & I.M. Sánchez-Calle (2010). Mature fruit abscission is associated with up-regulation of polyamine metabolism in the olive abscission zone. J Plant Physiol. **167**: 1432-1441.
- Groppa, M. & M. Benavides (2007). Polyamines and abiotic stress: recent advances. Amino Acids **34**: 35-45.
- Hao, Y.J., Kitashiba, H., Honda, C., Nada, K., & T. Moriguchi, (2005). Expression of arginine decarboxylase and ornithine decarboxylase genes in apple cells and stressed shoots. J. Exp. Bot. **56**: 1105-1115.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Symp. Ser. **41**: 95-98.
- Hancock, J.F. (2004). Plant evolution and the origin of crop species. 2^{da} Edición. CABI Publishing, USA.
- Hanfrey, C., Sommer, S., Mayer, M.J., Burtin, D. & A.J. Michael (2001). *Arabidopsis* polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. Plant J. **27**: 551-560.
- Hanzawa, Y., Takahashi, T., Michael, A., Burtin, D., Long, D., Piñeiro, M., Coupland, G. & Y. Komeda (2000). *Acaulis5*, an *Arabidopsis* gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase. Embo J. **19**: 4248-4256.
- Hardie, W.J. (2000). Grapevine Biology and Adaptation to Viticulture. Aust. J. Grape Wine R. **6**: 74-81.
- Hatanaka, T., Sano, H. & T. Kusano (1999). Molecular cloning and characterization of coffee cDNA encoding spermidine synthase. Plant Sci. **140**:161-168.

- Hernández, A. (2000). Introducción al vino de Chile. Colección en agricultura de la Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal de la Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile. 106 pp.
- Hidalgo, L. (1993). Tratado de viticultura. Ed. Mundi Prensa, Madrid.
- Howell, S.H. (1998). Molecular genetics of plant development. Cambridge University Press cap.11 pp. 281.
- Huang, C.K., Chang, B.S., Wang, K.C., Her, S.J., Chen, T.W., Chen, Y.A., Cho, C.L., Liao, L.J., Huang, K.L., Chen, W.S., & Z.H. Liu (2004). Changes in polyamine pattern are involved in floral initiation and development in *Polianthes tuberosa*. J. Plant Physiol. **161**: 709-713.
- Igarashi, K. & K. Kashiwagi (2000). Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. Biochem. Biophys. Res. Commun. **271**: 559-564.
- Imai, A., Matsumaya, T., Hanzawa, Y., Akiyama, T., Tamaoki, M., Saji, H., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., Komeda, Y. & T. Takahashi. (2004a). Spermidine synthase genes are essential for survival of *Arabidopsis*. Plant Physiol. **135**: 1565-1573.
- Imai, A., Akiyama, T., Kato, T., Sato, S., Tabata, S., Yamamoto, K.T & T. Takahashi (2004b). Spermine is not essential for survival of *Arabidopsis*. FEBS Lett. **556**: 148-152.
- Jaillon, O., Aury, J., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., *et al.* (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. Nature. **449**: 463-467.
- Jiang, D., Yang, W., He, Y. & R.A. Amasino (2007). *Arabidopsis* relatives of the human lysine-specific demethylase1 repress the expression of FWA and Flowering Locus C and thus promote the floral transition. Plant Cell: **19**: 2975-2987.
- Jouve, L., Jacques, D., Douglas, G.C., Hoffmann, L. & J.F. Hausman (2007). Biochemical characterization of early and late bud flushing in common ash (*Fraxinus excelsior* L.). Plant Sci. **172**: 962-969.
- Kakkar, R.K., Naga, P.K., Ahuja, P.S. & V.K. Rai, (2000). Polyamines and plant morphogenesis. Biol. Plant. **43**: 1-11.
- Kakkar, R. & V. Sawhney (2002). Polyamine research in plants – a changing perspective. Physiol. Plantarum. **116**: 281-292.

- Kliewer, W.M. & A. Soleimani (1972). Effect of chilling on budbreak in Thompson seedless and Carignan grapevines. *Amer. J. Enol. Viticult.* **23**: 31-34.
- Kamada-Nobusada, T., Hayashi, M., Fukazawa, M., Sakakibara, H., & M. Nishimura (2008). A putative peroxisomal polyamine oxidase, *AtPAO4*, is involved in polyamine catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell. Physiol.* **49**: 1272-1282.
- Knott, J., Römer, P., & M. Sumper (2007). Putative spermine synthases from *Thalassiosira pseudonana* and *Arabidopsis thaliana* synthesize thermospermine rather than spermine. *FEBS Lett.* **581**: 3081-3086.
- Korolev, S., Ikeguchi, Y., Skarina, T., Beasley, S., Arrowsmith, Ch., Edwards, A., Joachimiak, A., Pegg, A. & A. Savchenko (2002). The crystal structure of spermidine synthase with a multisubstrate adduct inhibitor. *Nat. Struct. Biol.* **9**: 27-31.
- K-Sawhney, R. & P. B. Applewhite (1993). Endogenous protein-bound polyamines: correlation with regions of cell division in tobacco leaves, internodes and ovaries. *Plant Growth Regul.* **12**: 223-227.
- Kumar, A., Altabella, T., Taylor, M., & A. Tiburcio (1997). Recent advances in polyamine research. *Trends Plant Sci.* **2**: 124-130.
- Kumar, S., Tamura, K. & M. Nei (2004). MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* **5**: 150-163.
- Kühn N & Arce-Johnson P. (2012) Pollination: a key event controlling the expression of genes related to phytohormone biosynthesis during grapevine berry formation. *Plant Signal Behav.* **7**(1):7-11.
- Kusano, T., Yamaguchi, K., Berberich, T. & Y. Takahashi (2007). The polyamine spermine rescues *Arabidopsis* from salinity and drought stresses. *Plant Signal. Behav.* **2**: 250-251.
- Lang, G.A., Early, J.D., Martin, G.C. & R.L. Darnell (1987). Endo, Para, and Ecodormancy: Physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience.* **22**: 371-377.
- Lee, M.M., Lee, S.H. & K.Y. Park (1997). Characterization and expression of two members of the S-adenosylmethionine decarboxylase gene family in carnation flower. *Plant Mol. Biol.* **34**: 371-382.
- Liu, C., Zhou, J., Bracha-Drori, K., Yalovsky, S., Ito, T. & H. Yu (2007). Specification of *Arabidopsis* floral meristem identity by repression of flowering time genes. *Development.* **134**: 1901-1910.

- Liu, J.H., Ban, Y., Wen, X-P., Nakajima, I. & T. Moriguchi (2009). Molecular cloning and expression analysis of an arginine decarboxylase gene from peach (*Prunus persica*). *Gene*. **429**: 10-17.
- Malmberg, R., Watson, M., Galloway, G. & W. Yu (1998). Molecular genetics analyses of plant polyamines. *Crit. Rev. Plant Sci.* **17**: 199-224.
- Marcé, M., Brown, D., Capell, T., Figueras, X. & A. Tiburcio (1995). Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* **666**: 329-335.
- Márquez, J., Cano R. & A. Larqué (2002). Polyamines in relation to dormancy breaking in grape buds (*Vitis vinifera* L.) cv 'Perlette'. *Rev. Fitotec. Mex.* **25**: 427-433.
- Martínez de Toda, F. (1991). *Biología de la vid: Fundamentos biológicos de la viticultura*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Matto, A.K., Sobolev, A.P., Neelam, A., Goyal, R.K., Handa, A.K. & A.L. Segre (2006). Nuclear magnetic resonance spectroscopy-based metabolite profiling of transgenic tomato fruit engineered to accumulate spermidine and spermine reveals enhanced anabolic and nitrogen-carbon interactions. *Plant Physiol.* **142**: 1759-1770.
- Mehta, R.A., Cassol, T., Li, N., Ali, N., Handa, A.K. & A.K. Matto (2002). Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life. *Nat. Biotechnol.* **20**: 613-618.
- Michael, A.J., Furze, J.M., Rhodes, M.J. & D. Burtin (1996). Molecular cloning and functional identification of a plant ornithine decarboxylase cDNA. *Biochem. J.* **314**: 241-248.
- Mohamed, H., Vadel, A., Geuns, J. & H. Khemir (2010). Biochemical changes in dormant grapevine shoot tissues in response to chilling: Possible role in dormancy release. *Sci. Hortic-Amsterdam.* **124**: 440-447.
- Moore, R.C. & S.M. Boyle (1990). Nucleotide sequence and analysis of the *spea* gene encoding biosynthetic arginine decarboxylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 4631-4640.
- Moschou, P.N., Paschalidis, K.A. & K.A. Roubelakis-Angelakis (2008a). Plant polyamine catabolism: The state of the art. *Plant Signal. Behav.* **3**: 1061-1066.
- Moschou, P.N., Sanmartin, M., Andriopoulou, A.H., Rojo, E., Sanchez-Serrano, J.J. & K.A. Roubelakis-Angelakis (2008b). Bridging the gap between plant and mammalian

- polyamine catabolism: a novel peroxisomal polyamine oxidase responsible for a full back-conversion pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **147**: 1845-1857.
- Mullins, M., Bouquet, A., & L. Williams (1992). *Biology of the grapevine*. Cambridge University.
- Ollat, N., Diakou-Verdin, P., Carde, J.P., Barrieu, F., Gaudillère, J.P. & A. Moing (2002). grape berry development: a review. *J. Int. Vigne Vin.* **36**: 109-131.
- Ophir, R., Pang, X., Halaly, T., Venkateswari, J., Lavee, S., Galbraith, D. & E. Or (2009). Gene expression profiling of grape bud response to two alternative dormancy release stimuli expose possible links between impaired mitochondrial activity, hypoxia, ethylene-ABA interplay and cell enlargement. *Plant Mol. Biol.* **71**: 403-423.
- Panicot, M., Minguet, E.G., Ferrando, A., Alcázar, R., Blázquez, M.A., Carbonell, J., Altabella, T., Koncz, C., & A.F. Tiburcio (2002). A Polyamine Metabolon Involving Aminopropyl Transferase Complexes in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **14**: 2539-2555.
- Paschalidis, K.A., Moschou, P.N., Toumi, I. & K.A. Roubelakis-Angelakis (2009). Polyamine anabolic/catabolic regulation along the woody grapevine plant axis. *J. Plant Physiol.* **166**: 1508-1519.
- Pérez, F.J., Vergara, R. & E. Or (2009). On the mechanism of dormancy release in grapevine-buds: a comparative study between hydrogen cyanamide and sodium azide. *Plant Growth Regul.* **59**: 145-152.
- Pommerrenig, B., Feussner, K., Zierer, W., Rabinovych, V., Klebl, F., Feussner, I. & N. Sauer (2011). Phloem-Specific expression of Yang cycle genes and identification of novel Yang cycle enzymes in plantago and *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **23**: 1904-1919.
- Poulin, R., Lu, L., Ackermann, B., Bey, P. & A.E. Pegg (1992). Mechanism of the irreversible inactivation of mouse ornithine decarboxylase by alpha-difluoromethylornithine. Characterization of sequences at the inhibitor and coenzyme binding sites. *J. Biol. Chem.* **267**: 150-158.
- Paxson-Sowers, D.M., Dodrill, C.H., Owen, H.A. & C.A. Makaroff (2001). DEX1, a novel plant protein, is required for exine pattern formation during pollen development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **127**: 1739-1749.
- Peña-Cortés, H., Cuadros, A., Fichet, T., González, D., González, E., Hinrichsen, P., Jashes, M., Pinto, M., Prieto, H., Ramírez, I., Riquelme, A., Rosales, M., Ruiz, S. & J. Valdés (2005). Chilean effort for improving fruit quality in grapevine: a genomic

- approach to understand seed formation, fruit ripening and pathogen response. *Acta Hort.* **689**: 505-512.
- Perez-Amador, M.A., León, J., Green, P.J. & J. Carbonell (2002). Induction of the arginine decarboxylase *ADC2* gene provides evidence for the involvement of polyamines in the wound response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **130**:1454-1463.
- Pérez-Castro, R., Kasai, K., Gainza-Cortés, F., Ruiz-Lara, S., Casaretto, J.A., Peña-Cortés, H., Tapia, J., Fujiwara, T. & E. González (2012). *VvBOR1*, the grapevine ortholog of *AtBOR1*, encodes an efflux boron transporter that is differentially expressed throughout reproductive development of *Vitis vinifera* L. *Plant Cell Physiol.* **53**: 485-494.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**: 2002-2007.
- Polticelli, F., Basran, J., Faso, C., Cona, A., Minervini, G., Angelini, R., Federico, R., Scrutton, N.S. & P. Tavladoraki (2005). Lys300 plays a major role in the catalytic mechanism of maize polyamine oxidase. *Biochemistry-US.* **44**: 16108-16120.
- Primikiriou, N.I. & K.A. Roubelakis-Angelakis (1999). A cloning and expression of an arginine decarboxylase cDNA from *Vitis vinifera* L. cell-suspension cultures. *Planta.* **208**: 574-582.
- Pszczolkowski, P. (2004). La invención del cv. Carménère (*Vitis vinifera* L) en Chile, desde la mirada de uno de sus actores. *Universum.* **19**: 150-165.
- Rea, G., de Pinto, M.C., Tavazza, R., Biondi, S., Gobbi, V., Ferrante, P., De Gara, L., Federico, R., Angelini, R. & P. Tavladoraki (2004). Ectopic expression of maize polyamine oxidase and pea copper amine oxidase in the cell wall of tobacco plants. *Plant Physiol.* **134**: 1414-1426.
- Reid, K., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F. & S. Lund (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol.* **6**: 27.
- Reinier, A. (2002). Manual de Viticultura. Quinta edición. Ediciones Mundi-Prensa. 497 pp.
- Rey, M., Díaz-Sala, C. & R. Rodríguez (1994). Comparison of endogenous polyamine content in hazel leaves and buds between the dormancy and flowering annual phases of growth. *Physiol. Plant.* **91**: 45-50.

- Saitou, N. & M. Nei (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- SAG (2008). Servicio Agrícola Ganadero División de Protección Agrícola y Forestal Subdepartamento de Viñas y Vinos. Informe Ejecutivo Catastro Vitícola Nacional. Santiago, Chile 50 pp.
- SAS Institute Inc., SAS OnlineDoc®, Version 8, Cary, NC, SAS Institute Inc., 1999
- Scalaberilli, G. & G.A. Couvillon (1986). The effect of temperature and bud type on rest completion and the GDH °C requirement for bud break in ‘Redhaven’ peach. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **112**: 537-540.
- Schnabel, B.J. & R.L. Wample (1987). Dormancy and cold hardiness in *Vitis vinifera* L. cv. White Riesling as influenced by photoperiod and temperature. *Am. J. Enol. Vitic.* **38**: 265-272.
- Seeley, S.D. (1994). Dormancy: the black box. *HortScience.* **29**: 1248.
- Serafini-Fracassini, D. (1991). Cell cycle-dependent changes in plant polyamine metabolism. *In* Biochemistry and physiology of polyamines in plants. Edited by Slocum, R.D. and Flores, H.E. pp. 159-173. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., & Y. Shi (2004). Histone demethylase mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell.* **119**: 941-953.
- Shiozaki, S., Zhuo, X., Ogata, T. & S. Horiuchi (1998). Involvement of polyamines in gibberellin-induced development of seedless grape berries. *Plant Growth Regul.* **25**: 187-193.
- Shiozaki S., Ogata T., & S. Horiuchi (2000). Endogenous polyamines in the pericarp and the seed of the grape berry during development and ripening. *Sci. Hortic-Amsterdam.* **83**: 33-41.
- Slocum, R.D. & A.W. Galston (1985). Changes in polyamine biosynthesis associated with postfertilization growth and development in tobacco ovary. *Plant Physiol.* **79**: 336-343.
- Smith, T.A. (1985). Polyamines. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**: 117-143.
- Soyka, S. & A.G. Heyer (1999). *Arabidopsis* knockout mutation of *ADC2* gene reveals inducibility by osmotic stress. *FEBS Lett.* **458**: 219-223.
- Srinivasan, C. & M.G. Mullins (1981). Physiology of flowering in the grapevine- a review. *Am. J. Enol. Vitic.* **32**: 47-63.

- Sumitomo, K., Narumi, T., Satoh, S. & T. Hisamatsu (2008). Involvement of the ethylene response pathway in dormancy induction in chrysanthemum. *J. Exp. Bot.* **59**: 4075-4082.
- Takahashi, Y., Cong, R., Sagor, G.H, Niitsu, M., Berberich, T. & T. Kusano (2010). Characterization of five polyamine oxidase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell. Rep.* **29**: 955-965.
- Takahashi, T. & J. Kakehi (2010). Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Ann. Bot.* **105**: 1-6.
- Tassoni, A, Van Buuren, M., Franceschetti, M., Fornale, I.S. & N. Bagni (2000). Polyamine content and metabolism in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. *Plant Physiol. Biochem.* **38**: 383-393.
- Tassoni, A., Franceschetti, M., Tasco, G., Casadio, R. & N. Bagni (2007). Cloning, functional identification and structural modelling of *Vitis vinifera* S-adenosylmethionine decarboxylase. *J. Plant Physiol.* **164**: 1208-1219.
- Tarenghi, E, Martin-Tanguy J (1995) Polyamines, floral induction and floral development of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Plant Growth Reg.* **17**: 157-165.
- Taucher E. (2014) Bioestadística, Editorial Ocho Libros
- Tavladoraki, P., Schinina, M. E., Lecconi, F., Di Agostino, S., Manera, F., Rea, G., Mariottini, P., Federico, R., & R. Angelini (1998). *FEBS Lett.* **426**: 62-66.
- Tavladoraki, P., Rossi, M.N., Saccuti, G., Perez-Amador, M.A., Polticelli, F., Angelini, R., & R. Federico (2006). Heterologous expression and biochemical characterization of a polyamine oxidase from *Arabidopsis* involved in polyamine back conversion. *Plant Physiol.* **149**: 1519-1532.
- Tieman, D. & H. Klee (1999). Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family. *Plant Physiol.* **120**: 165-172.
- Todd, C.D. & D.J. Gifford (2002). The role of the megagametophyte in maintaining loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seedling arginase gene expression in vitro. *Planta.* **215**:110-118.
- Torrigiani, P., Serafini-Fracassini, D. & N. Bagni (1987). Polyamine biosynthesis and effect of dicyclohexylamine during the cell cycle of *Helianthus tuberosus* Tuber. *Plant Physiol.* **84**: 148-152.

- Trénor M., Perez-Amador M., Carbonell J. y M. Blázquez (2010). Expression of polyamine biosynthesis genes during parthenocarpic fruit development in *Citrus clementina*. *Planta* **231**:1401-1411.
- Urano, K., Yoshiba, Y., Nanjo, T., Igarashi, Y., Seki, M., Sekiguchi, F., Yamaguchi-Shinozaki, K. & K. Shinozaki (2003). Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant Cell Environ.* **26**: 1917-1926.
- Urano, K., Yoshiba, Y., Nanjo, T., Ito, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. & K. Shinozaki (2004). *Arabidopsis* stress-inducible gene for arginine decarboxylase *AtADC2* is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**: 369-375.
- Urano, K., Hobo, T. & K. Shinozaki (2005). *Arabidopsis* ADC genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. *FEBS Lett.* **579**: 1557-1564.
- Van der Straeten, D., Van Wiemeersch, L., Goodman, H.M. & M. Van Montagu (1990). Cloning and sequence of two different cDNAs encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 4859-4863.
- Vasconcelos, M.C., Greven, M., Winefield, C.S., Trought, M.T. & V. Raw (2009). The Flowering Process of *Vitis vinifera*: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* **60**: 411-434.
- Vergara, R., Parada, F., Rubio, S. & F.J. Pérez (2012). Hypoxia induces H₂O₂ production and activates antioxidant defence system in grapevine buds through mediation of H₂O₂ and ethylene. *J. Exp. Bot.* **63**: 4123-4131.
- Wake, M.F. & A. Fennell (2000). Morphological, physiological and dormancy responses of three *Vitis* genotypes to short photoperiod. *Physiol. Plantarum.* **109**: 203-210.
- Walden, R., Cordeiro, A. & A. F. Tiburcio (1997). Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and developments. *Plant Physiol.* **113**: 1009-1013.
- Wang, S.Y., Faust, M. & G.L. Steffens (1985). Metabolic changes in cherry flower buds associated with breaking of dormancy in early and late blooming cultivars. *Physiol. Plantarum.* **65**: 89-94.
- Wang S.Y., Steffens G.L. & M. Faust (1986). Breaking bud dormancy in apple with bioregulator thidiazuron. *Phytochemistry.* **25**: 311-317.
- Wang, S.Y. & M. Faust (1994). Changes in polyamine content during dormancy in flower buds of “Anna” apple. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **119**: 70-73.

- Weaver, R.J. & I.S. Singh (1978). Occurrence of endogenous ethylene and effect of plant regulators on ethylene production in the grapevine. *Am. J. Enol. Viticult.* **29**: 282-285.
- Wi, S.J., Kim, W.T. & K.Y. Park (2006). Overexpression of carnation S-adenosylmethionine decarboxylase gene generates a broad-spectrum tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Rep.* **25**: 1111-1121.
- Wilmowicz, E., Keszy, J. & J. Kopcewicz (2008). Ethylene and ABA interactions in the regulation of flower induction in *Pharbitis nil*. *J. Plant Physiol.* **165**: 1917-1928.
- Wolfinger, R., Gibson, G., Wolfinger, E., Bennett, L., Hamadeh, H., Bushel, P., Afshari, C. & R. Paules. (2001). Assessing gene significance from cDNA microarray expression data via mixed models. *J. Comput. Biol.* **8**: 625-637.
- Xiong, H., Stanley, B.A., Tekwani, B.L. & A.E. Pegg (1997). Processing of mammalian and plant S-adenosylmethionine decarboxylase proenzymes. *J. Biol. Chem.* **272**: 28342-28348.
- Yamaguchi, K., Takahashi, Y., Berberich, T., Imai, A., Takahashi, T., Michael, A. & T. Kusano (2007). A protective role for the polyamine spermine against drought stress in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**: 486-490.
- Yang, Z., Tian, L., Latoszek-Green, M., Brown, D. & K. Wu (2005). *Arabidopsis ERF4* is a transcriptional repressor capable of modulating ethylene and abscisic acid responses. *Plant Mol. Biol.* **58**: 585-596.
- Yao, B., Rakhade, S., Li, Q., Ahmed, S., Krauss, R., Draghici, S. & J. Loeb (2004). Accuracy of cDNA microarray methods to detect small gene expression changes induced by neuregulin on breast epithelial cells. *BMC Bioinformatics.* **5**: 99.
- Yoda, H., Yamaguchi, Y. & H. Sano (2003). Induction of hypersensitive cell death by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants. *Plant Physiol.* **132**: 1973-1981.
- Yoda, H., Hiroi, Y. & H. Sano (2006). Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant Physiol.* **142**: 193-206.
- Zhang, Z., Honda, C., Kita, M., Hu, C., Nakayama, M. & T. Moriguchi (2003). Structure and expression of spermidine synthase genes in apple: two cDNAs are spatially and developmentally regulated through alternative splicing. *Mol. Genet. Genomics.* **268**: 799-807.

Zhong, R., Morrison III, W.H., Negrel, J. & Z-H. Ye (1998). Dual methylation pathways in lignin biosynthesis. *Plant Cell*. **10**: 2033-2046.