

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE GENES QUE CODIFICAN PARA
TRANSPORTADORES DE BORO EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE
DURANTE EL DESARROLLO REPRODUCTIVO DE
Vitis vinifera L. cv. Carménère.**

**RAMÓN ANDRÉS PÉREZ CASTRO
DOCTOR EN CIENCIAS MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL**

RESUMEN

Vitis vinifera L. cv Carménère comúnmente presenta una anomalía durante el desarrollo reproductivo denominada “*millerandage*” que se traduce en la presencia de bayas semilladas y no semilladas (partenocárpicas) de tamaño diferencial en un mismo racimo. Tal evento ha sido asociado, entre otros factores, a la deficiencia de boro (B). Este micronutriente es esencial en vegetales ya que forma parte del complejo RG-II-B, entrecruzando dos cadenas ramnogalacturonano II, componente de las pectinas de la pared celular, siendo este complejo fundamental para el desarrollo de estructuras reproductivas tales como polen y tubo polínico. En condiciones deficientes de B, este micronutriente es captado desde la rizósfera mediante el canal NIP5;1 y posteriormente cargado al xilema mediante el transportador BOR1. Estudios preliminares tendientes a dilucidar genes que estuviesen relacionados con el “*millerandage*”, determinaron la expresión diferencial entre bayas semilladas y no semilladas de una secuencia parcial homóloga a BOR1 de *Arabidopsis thaliana*.

El objetivo de esta tesis fue aislar y caracterizar genes de vid codificantes para NIP5;1 y BOR1 y relacionar su expresión con la acumulación de B, el desarrollo reproductivo, y el fenotipo de las bayas. Ambos genes fueron aislados desde tejido floral, corroborándose su identidad por secuenciación. Mediante fusión a GFP y posterior expresión en *A. thaliana*, se determinó que VvBOR1 es una proteína de membrana localizada en el dominio proximal de la membrana plasmática en células de las raíces. A través de la expresión heteróloga de VvBOR1 en levaduras y *A. thaliana* mutantes para sus transportadores endógenos, se

determinó que *VvBOR1* es un transportador de eflujo de B con una tasa menor de transporte en comparación a su homóloga de *A. thaliana*.

Finalmente, mediante análisis de qRT-PCR en tiempo real se determinó que el gen *VvBOR1* presenta patrones de expresión similar en cv. Cabernet Sauvignon y Carménère, mientras que el gen *VvNIP5;1* exhibe patrones de expresión disímiles en esas mismas variedades. Sin embargo, ambos genes se expresan en menor medida en bayas partenocárpicas de Carménère, demostrándose una relación entre estado de desarrollo, fenotipo de la baya y expresión de estos genes. Adicionalmente, *VvBOR1* presentó una correlación entre su expresión y la acumulación de B en bayas. Estos resultados sugieren una relación entre la expresión de estos genes y el desarrollo reproductivo normal del cultivar Carménère.

ABSTRACT

Vitis vinifera L. cv Carménère usually express impairments during its reproductive development, commonly called “millerandage”. This failure triggers the formation of both normal size and small-size seedless grapes in the same bunch. Among other factors, boron deficiency has been associated to this phenomenon. This micronutrient is essential in plants because of its role in cross-linking two rhamnogalacturonan-II (RG-II) chains in the conformation of the RG-II-B complex, a key component of cell wall pectins. This polysaccharide is required for development of reproductive structures such as the pollen tube. Under B deficiency, channel NIP5;1 uptakes B from rhizosphere and then it is loaded to xylem by BOR1 transporter. Preliminary research to find millerandage-related genes, showed that a EST sequence, homologue to the AtBOR1 gene from *A. thaliana thaliana*, was differentially expressed between normal size and small-size seedless grapes.

The main aim of this study was to isolate and to characterize grapevine genes encoding for NIP5;1 y BOR1 transporters and to associate their expression to B content, reproductive development, and grape phenotype in the cultivar Carménère. Both genes were isolated from floral tissues and their sequence identity was confirmed. The expression in *A. thaliana* of the hybrid protein VvBOR1-GFP, shows that VvBOR1 is membrane protein with a polar localization to the proximal domain of plasma membrane of root cells. Heterologous expression of the VvBOR1 gene in a yeast mutant strain and a *A. thaliana* mutant line, both deficient for boron transport, showed that VvBOR1 is an efflux B transporter, with a low efficiency when compared to its homologue from *A. thaliana*, AtBOR1.

Finally, real time qRT-PCR analysis indicates that while VvBOR1 gene shows similar expression profiles in Cabernet Sauvignon and Carménère, VvNIP5;1 gene shows a cultivar-dependent expression pattern. Nevertheless, both genes appear to be repressed in parthenocarpic grapes. Furthermore, a correlation between VvBOR1 expression and boron content in grapes has been determined. All

together, these results suggest a correlation between gene expression and normal reproductive development in cv. Carménère.