



**UNIVERSIDAD DE TALCA**

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA VEGETAL Y BIOTECNOLOGÍA**

**DOCTORADO EN CIENCIAS MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL**

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE GENES QUE CODIFICAN  
PARA PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA RED REGULATORIA DEL DESARROLLO  
FLORAL Y FRUTAL EN *Vitis vinifera* Cv. CARMÉNÈRE.**

**SEBASTIÁN ALEJANDRO GONZÁLEZ DÍAZ**

**PROFESORES GUÍAS: ENRIQUE GONZÁLEZ VILLANUEVA**

**SIMON RUIZ LARA**

**2013**

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

*A mi esposa Carmen y mis hijos Vicente y Maximiliano.*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Universidad de Talca y en particular al Instituto de Ciencias Biológicas por la oportunidad que me brindaron de ingresar al programa de Doctorado en Ciencias mención Ingeniería Genética Vegetal.

El desarrollo de mi tesis en el mencionado programa habría sido imposible sin el apoyo de MECESUP y CONICYT con sus becas de mantención, mientras que el financiamiento para la realización del trabajo de tesis estuvo a cargo del proyecto Fondef G0711003.

Debo mencionar también a la FEBS (*Federation of European Biochemical Societies*), por el financiamiento para una pasantía en el laboratorio del Doctor Albert Boronat de la Universitat de Barcelona, quien tuvo la bondad de acogerme.

Especial mención a mis compañeros del programa de Doctorado, Marcela Salazar, Orlando Alva, Rosy Roa, Nuri Cabrera, Ramón Pérez, Javier Chilian, Rubén Almada, Felipe Gáinza, Ricardo Pérez, Analía Espinoza, Jorge Pérez y otros quienes me ayudaron o aclararon mis dudas. Por supuesto, fue valiosa la ayuda de Fernando Poblete, Isabel Verdugo y Mónica Yáñez.

Las muchas gracias a mis directores de tesis, Doctor Enrique González Villanueva y Doctor Simón Ruiz-Lara por todo lo que me enseñaron, por su guía, paciencia, gran apoyo y confianza.

Finalmente, agradezco también a mi madre, a mis hijos y, de forma especial, a mi esposa Carmen Carrasco, por todo su apoyo y paciencia.

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE GENES QUE CODIFICAN PARA  
PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA RED REGULATORIA DEL DESARROLLO FLORAL Y FRUTAL EN  
*Vitis vinifera* Cv. CARMÉNÈRE.**

**STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF GENES ENCODING PROTEINS ASSOCIATED  
WITH THE REGULATORY NETWORK OF THE FLORAL AND FRUIT DEVELOPMENT IN *Vitis vinifera* Cv.  
CARMÉNÈRE.**

**SEBASTIÁN ALEJANDRO GONZÁLEZ DÍAZ**

PROFESORES GUÍA:

Dr. Enrique González Villanueva.

Universidad de Talca, Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología.

2 norte 685, casilla 747, Talca.

egonzale@utalca.cl

Dr. Simon Ruiz Lara.

Universidad de Talca, Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología.

2 norte 685, casilla 747, Talca.

sruiz@utalca.cl

## ÍNDICE

	Página
RESUMEN	IX
ABSTRACT	XI
LISTA DE TABLAS	XIII
LISTA DE FIGURAS	XIV
1. INTRODUCCION	1
1.1. LA VID Y EL CULTIVAR CARMÉNÈRE	2
1.2. DESARROLLO REPRODUCTIVO DE LA VID	3
1.2.1. Inducción y desarrollo floral	3
1.2.2. Desarrollo de carpelos y óvulos	5
1.2.3. Desarrollo de la antera y el polen	6
1.2.4. Desarrollo frutal en la vid	9
1.3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	15
2. MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1. MATERIALES	17
2.1.1. Material vegetal	17

<b>2.2. MÉTODOS</b>	<b>19</b>
<b>2.2.1. Generación de plantas en maceta de <i>A. thaliana</i></b>	<b>20</b>
2.2.1.1. Evaluación de plantas de la línea de inserción CS841944	20
<b>2.2.2. Tratamiento de bayas y plantas con hormonas y moléculas inductoras de respuesta en plantas</b>	<b>20</b>
<b>2.2.3. Identificación y aislamiento de genes con función reguladora</b>	<b>21</b>
2.2.3.1. Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) de <i>V. vinifera</i> y <i>A. thaliana</i>	21
2.2.3.2. Extracción de ácido ribonucleico (ARN) total de <i>V. vinifera</i> y <i>A. thaliana</i> y síntesis de ADNc	21
2.2.3.3. Clonación de los genes de interés	22
<b>2.2.4. Análisis de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas</b>	<b>23</b>
2.2.4.1. Determinación de estructura y organización genómica	23
2.2.4.2. Análisis de secuencias aminoacídicas deducidas, predicción de topología y localización subcelular	23
2.2.4.3. Análisis filogenético	24
2.2.4.3.1. Análisis <i>in silico</i> de las regiones regulatorias en cis de los genes en estudio	24
<b>2.2.5. Localización subcelular de VvPSZ3 y ZAT4</b>	<b>25</b>
<b>2.2.6. PCR cuantitativa en tiempo real</b>	<b>25</b>
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>27</b>
<b>3.1. EL GEN REPRESENTADO POR EL EST VVCCGC3015D09.b CODIFICARÍA UN PUTATIVO FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN DEL TIPO “ZINC FINGER” C2/H2</b>	<b>28</b>
3.1.1. Aislamiento y secuenciación de los genes <i>VvPSZ3</i> y su homólogo <i>AtZAT4</i>	28
3.1.2. <i>VvPSZ3</i> sería una proteína “ <i>zinc finger</i> ” Cys2/His2	29
3.1.3. <i>VvPSZ3</i> de vid y <i>AtZAT4</i> de <i>A. thaliana</i> se localizarían en el núcleo	32

<b>3.2. ANÁLISIS DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES</b>	
<b><i>VvPSZ3</i> Y <i>ZAT4</i></b>	<b>35</b>
3.2.1. El gen <i>VvPSZ3</i> presenta un patrón de expresión diferencial en los distintos órganos de la vid	35
3.2.2. <i>VvPSZ3</i> es principalmente expresado en polen y en semillas	38
3.2.3. La expresión de <i>VvPSZ3</i> en bayas de vides es fuertemente inducida en respuesta a tratamiento exógeno con ABA y SA	38
3.2.4. El patrón de expresión de <i>AtZAT4</i> es similar al de <i>VvPSZ3</i>	39
3.2.5. El perfil de expresión de los genes <i>VvPSZ3</i> y <i>AtZAT4</i> es coherente con la presencia de putativos elementos regulatorios de sus respectivas regiones promotoras	44
<b>3.3. ZAT4 ES DE VITAL IMPORTANCIA PARA EL DESARROLLO DE <i>A. thaliana</i></b>	<b>49</b>
<b>3.4. EL GEN REPRESENTADO POR EL EST VVCCGS2117F10.b CODIFICARÍA UNA PROTEÍNA CON FUNCIÓN RECEPTOR QUINASA DEL TIPO LRR_RLK</b>	<b>55</b>
3.4.1. Aislamiento y secuenciación del gen representado por el EST VVCCGS2117F10.b	55
3.4.2. El análisis <i>in silico</i> de los genes <i>VvFSK</i> y <i>VvFTK</i> indica que ellos codifican para proteínas con dominios característicos de receptores quinasa, filogenéticamente relacionadas con el receptor quinasa ScORK17 ( <i>Solanum chacoense</i> <u>OVULE RECEPTOR KINASE 17</u> )	57
<b>3.5. ANÁLISIS DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES <i>VvFSK</i> y <i>VvFTK</i></b>	<b>62</b>
3.5.1. <i>VvFSK</i> y <i>VvFTK</i> se expresan diferencialmente en los distintos tejidos de la vid	62
3.5.2. La expresión de <i>VvFSK</i> y <i>VvFTK</i> en bayas de vides es fuertemente inducida en respuesta a tratamiento exógeno con sacarosa	65



3.5.3. El análisis <i>in silico</i> de la región promotora de los genes <i>VvFSK</i> y <i>VvFTK</i> establece la presencia de elementos regulatorios asociados a la expresión en tejidos reproductivos y en respuesta a azúcar	67
4. DISCUSIÓN	71
4.1. <i>VvPSZ3</i> CODIFICA PARA UN PUTATIVO FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN DEL TIPO “ZINC FINGER” C2H2 CON ACTIVIDAD DE REPRESOR	72
4.2. <i>VvPSZ3</i> POSEE SIMILITUD CON PROTEÍNAS DEL TIPO “ZINC FINGER” ASOCIADAS AL DESARROLLO REPRODUCTIVO EN OTRAS ESPECIES VEGETALES	74
4.3. EL PERFIL DE EXPRESIÓN DEL GEN <i>VvPSZ3</i> SUGIERE SU PARTICIPACIÓN EN EL DESARROLLO REPRODUCTIVO DE <i>Vitis vinifera</i> Y CORRELACIONA CON LA PRESENCIA DE ELEMENTOS REGULATORIOS EN SU REGIÓN PROMOTORA	76
4.4. <i>VvFSK</i> Y <i>VvFTK</i> DE <i>V. vinifera</i> CODIFICAN PARA PROTEÍNAS CON CARACTERÍSTICAS DE RECEPTOR QUINASA DEL TIPO LRR-RLK	80
4.5. LOS GENES <i>VvFSK</i> Y <i>VvFTK</i> CODIFICAN PARA PROTEÍNAS CON SIMILITUD A ScORK17 DE <i>Solanum chacoense</i> , PERO POSEEN DIFERENTES PATRONES DE EXPRESIÓN DURANTE EL DESARROLLO	83
4.6. <i>VvFSK</i> Y <i>VvFTK</i> SON INDUCIDOS POR SACAROSA	84
5. CONCLUSIONES	90
6. BIBLIOGRAFÍA	93

## RESUMEN

*Vitis vinifera* cv. Carmènère ha sido caracterizada como una variedad con alta tendencia al desarrollo de frutos partenocárpicos, lo que redundaría en la producción de bayas semilladas y bayas no semilladas dentro de un mismo racimo. Las causas de este fenómeno no están bien esclarecidas, aun cuando ha sido asociado a problemas en la capacidad germinativa del polen otorgando al proceso de desarrollo floral una relevancia particular en la manifestación de este problema.

Como primera aproximación a la caracterización de los eventos genético-moleculares involucrados en tal fenómeno, los perfiles de expresión de aproximadamente 4.800 genes fueron analizados tanto en bayas semilladas como no semilladas. El análisis comparativo de los perfiles de expresión entre ambos tipos de bayas, mostró que un número importante de genes diferencialmente expresados codifican para proteínas que no han sido caracterizadas previamente en vid. Entre estos genes, en el desarrollo de este trabajo se ha escogido a aquellos representados por los ESTs VVCCGC3015D09.b y VVCCGS2117F10.b tanto por su alta tasa de represión en bayas no semilladas como por el hecho que ellos codificarían proteínas involucradas en la regulación de la expresión génica. Los genes respectivos fueron aislados y caracterizados estructural y funcionalmente. Tal análisis ha permitido identificar a los genes denominados *VvPSZ3* (representado por el EST VVCCGC3015D09.b), *VvFSK* y *VvFTK*, (representados por el EST VVCCGS2117F10.b), los que codifican para proteínas con características estructurales propias de un factor de transcripción del tipo *zinc finger* (*VvPSZ3*) y dos putativos receptores con función quinasa (*VvFSK* y *VvFTK*). Por tanto, el objetivo de esta tesis fue caracterizar estructural y funcionalmente estos genes y evaluar su patrón de expresión durante el desarrollo floral/frutal de *V. vinifera*.

*VvPSZ3* es homólogo al gen *ZAT4* de *A. thaliana*, el cual codifica para una proteína esencial para el desarrollo en esta especie. Concordante con su putativa función como factor de transcripción, el producto de ambos genes se localiza en el núcleo celular. *VvPSZ3* se expresa principalmente en el polen en flores cerradas y en la semilla de bayas al estadio de

envero. El gen tiene una expresión mayor en el cultivar Cabernet Sauvignon que en Carménère, siendo el primero un cultivar que no tiene tendencia al millerandaje. Además, un análisis detallado de la expresión del gen en Caménère sugiere su participación en el desarrollo reproductivo de *Vitis vinifera*, estando esta expresión relacionada a la presencia en la región promotora del gen tanto de elementos regulatorios en *cis* para factores de transcripción que regulan el desarrollo floral como elementos asociados a la expresión en polen y semillas. Adicionalmente, la expresión de este gen parece ser inducida por ABA y ácido salicílico.

Si *VvPSZ3* y *ZAT4* corresponden a genes ortólogos debe aún ser determinado. Ello permitiría especular sobre el rol de *VvPSZ3* en el desarrollo de la vid, toda vez que líneas de *Arabidopsis*, homocigotas para una mutación por inserción en el gen *ZAT4* no son viables.

Por otra parte, los genes *VvFSK* y *VvFTK* poseen homología con *ScORK17*, gen que codifica para un receptor quinasa asociado al desarrollo de óvulos en *Solanum chacoense*, y al gen *At3g03770* de función desconocida en *A. thaliana*. Ambos genes se expresan en flores de vides, pero mientras *VvFSK* es expresado fuertemente en semillas de bayas al estadio de pre-envero, *VvFTK* se expresa en zarcillos. En ambos casos su actividad transcripcional es inducida por sacarosa y por ABA. El análisis *in silico* de la región promotora de ambos genes reveló la presencia de secuencias regulatorias asociadas tanto a la expresión en floema así como elementos de respuesta a azúcares.

La función de estos genes en el desarrollo de la vid aún no está establecida. Como primera aproximación para determinar su papel, una línea de *A. thaliana* homocigota para una inserción de T-DNA en el gen homólogo *At3g03770* no genera un fenotipo evidentemente distinto al de plantas tipo silvestre.

## ABSTRACT

*Vitis vinifera* cv. Carménère has been characterized as a variety with high tendency to develop parthenocarpic fruits yielding seeded and seedless berries in the same cluster. Even though this phenomenon has been associated to deficiencies in pollen germination capability, thus giving to flower development special relevance to the manifestation of this problem, the real origin of this condition has not been elucidated.

As a first approach to the study of the molecular/genetic events involved in this problem, expression profiles of approximately 4,800 genes were analyzed in both, seeded and seedless berries. Comparative transcriptomic analysis shows that several differentially expressed genes codes for non characterized protein in grapevine. Among these genes, ESTs VVCCGC3015D09.b and VVCCGS2117F10.b were selected for further analysis due to their high repression ratio in seedless berries and the fact that they codify for proteins putatively involved in gene expression regulation.

These genes were isolated and characterized at the structural level. Such analysis allowed the identification of the *VvPSZ3* (represented by the EST VVCCGC3015D09.b), *VvFSK* and *VvFTK* (represented by the EST VVCCGS211 7F10.b) genes, codifying for a protein structurally similar to a “zinc finger” transcription factor (*VvPSZ3*) and two putative receptor like-kinase proteins (*VvFTK* and *VvFSK*). The aim of this thesis was to characterize structurally and functionally these three genes and evaluate their expression pattern through the floral/fruit development of *V. vinifera*.

*VvPSZ3* gene is homologous to *ZAT4* from *A. thaliana*, which encodes for an essential protein for development in this specie. Agreeing with their expected role as transcription factor, the respective encoded proteins localizes to the cell nucleus.

*VvPSZ3* is mainly expressed in pollen at anthesis and seeds of berries at the pre-veraison stage. The expression of this gene is higher in Cabernet Sauvignon than in Carmenere, being the first a cultivar with low tendency to millerandaje. In addition, a more detailed analysis of gene expression in Caménère suggest a role for this gene in grapevine

reproductive development and correlates with the presence in its promoter region of *cis* regulatory elements recognized by transcription factors involved in regulation of flower development, as well as elements associated to expression in pollen and seeds. Additionally, *VvPSZ3* seems to be induced by ABA and salicylic acid.

If *VvPSZ3* and *ZAT4* are orthologous genes remain to be demonstrated. Since *Arabidopsis* lines homozygous for a T-DNA insertion in the *ZAT4* gene are not viable, a similar function for *VvPSZ3* gene in grapevine development could be expected.

On the other hand, *VvFSK* and *VvFTK* are homologous to *ScORK17*, a gene coding for a receptor kinase involved in the regulation of ovule development in *Solanum chacoense*, and to *At3g03770* a gene of unknown function in *A. thaliana*. Although both grapevine genes are expressed in flowers, *VvFSK* is strongly expressed in seeds of berries at pre-veraison stage, while *VvFTK* is actively transcribed in tendrils; nevertheless both genes are induced by sucrose and ABA. The *in silico* analysis of their promoter regions revealed the presence of *cis* regulatory sequences associated to response to sucrose induction as well as to phloem-specific expression.

The function of these genes in grapevine development needs to be established. As a first approach to asses such role, the phenotype of the *Arabidopsis thaliana* line homozygous for T-DNA insertion in the homologous gene *At3g03770* was analyzed. However, no evident differences were found between both lines when compared with *Arabidopsis* wild type.

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Tabla 1	ESTs provenientes de librería de expresión diferencial de bayas de vid cv. Carménère con o sin semilla	15
Tabla 2	Partidores cebadores para las reacciones de PCR utilizadas en el desarrollo del trabajo de tesis	19
Tabla 3	Comparación entre CS841944 y tipo silvestre de plantas de <i>A. thaliana</i> crecidas bajo condición de día largo	54
Tabla 4	Localización subcelular de acuerdo a predicciones <i>in silico</i> con SherLoc, CELLO y Wolf PSORT-II	58
Tabla 5	Elementos de respuesta a azúcar (SRE) reconocidos por PLACE	72
Tabla 6	Elementos de expresión específica en los tejidos de la semilla reconocidos por PLACE	73

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Figura 1	Gen <i>VvPSZ3</i> aislado desde <i>Vitis vinifera</i>	30
Figura 2	Representación esquemática de los dominios proteínicos con motivos y sitios funcionales de <i>VvPSZ3</i> y <i>ZAT4</i> y <i>ZAT9</i> de <i>A. thaliana</i>	31
Figura 3	Comparación de la secuencia aminoacídica de <i>VvPSZ3</i> con sus putativos homólogos de otras especies de plantas	32
Figura 4	Relaciones filogenéticas entre <i>VvPSZ3</i> y proteínas similares encontradas en otras especies de plantas	34
Figura 5	Localización celular de <i>VvPSZ3::sGFP</i> y <i>ZAT4::sGFP</i> en planta	35
Figura 6	Análisis de expresión de <i>VvPSZ3</i> en varios órganos de <i>Vitis vinifera</i> cv. Carménère por qPCR	37
Figura 7	Comparación de los patrones de expresión de <i>VvPSZ3</i> en dos cultivares tradicionales de <i>Vitis vinifera</i>	38
Figura 8	Comparación de los niveles de expresión de <i>VvPSZ3</i> entre bayas de Carménère normales y sin semilla	41
Figura 9	Expresión de <i>VvPSZ3</i> en bayas tratadas con distintas moléculas elicitoras	42
Figura 10	Expresiones de <i>AtZAT4</i> y <i>AtZAT9</i> predichas con la herramienta Arabidopsis eFP Browser con datos provenientes de microarreglos	43
Figura 11	Análisis mediante qPCR de la expresión de <i>AtZAT4</i> y <i>AtZAT9</i> en diversos órganos de <i>A. thaliana</i>	44
Figura 12	Elementos en cis en la región “río arriba” de <i>VvPSZ3</i> , <i>AtZAT4</i> y <i>PhZPT3-3</i>	47
Figura 13	Elementos específicos de expresión en polen de <i>VvPSZ3</i> , <i>AtZAT4</i> y <i>PhZPT3-3</i>	48

Figura 14	Alinamiento de la secuencia nucleotídica de la región promotora de <i>VvPSZ3</i> y sus homólogos en <i>P. hybrida</i> y <i>A. thaliana</i>	49
Figura 15	Representación esquemática proporcional de la inserción de ADN-T dentro del genoma de <i>A. thaliana</i> y dentro de la secuencia promotora de <i>ZAT4</i>	51
Figura 16	Productos de PCR para el promotor de <i>ZAT4</i> y el inserto del ADN-T dentro del promotor	52
Figura 17	Análisis por qPCR de la expresión de <i>AtZAT4</i> en diversos órganos de <i>A. thaliana</i> , tanto sobre el tipo silvestre como en plantas <i>zat4</i>	53
Figura 18	Genes <i>VvFSK</i> y <i>VvFTK</i> aislados desde <i>Vitis vinifera</i>	56
Figura 19	Representación esquemática de los dominios protéicos con motivos y sitios funcionales de <i>VvFSK</i> , <i>VvFTK</i> y <i>ScORK</i> de <i>Solanum chacoense</i>	59
Figura 20	Comparación de la secuencia aminoacídica de <i>VvFSK</i> con <i>VvFTK</i> , <i>ScORK17</i> y <i>At3g03770</i>	60
Figura 21	Relaciones filogenéticas entre <i>VvFSK</i> y proteínas similares encontradas en otras especies de plantas	61
Figura 22	Análisis de expresión de <i>VvFSK</i> y <i>VvFTK</i> en distintos órganos de <i>Vitis vinifera</i> cv. Carménère por qPCR	64
Figura 23	Comparación de los niveles de expresión de <i>VvFSK</i> y <i>VvFTK</i> en diversos tejidos reproductivos de <i>Vitis vinifera</i> cv. Carménère	65
Figura 24	Expresión de <i>VvFSK</i> y <i>VvFTK</i> en bayas tratadas con distintas moléculas elicitoras	66
Figura 25	Elementos en <i>Cis</i> de respuesta a azúcar y de especificidad de semilla en la región 2000 pb "río arriba" de <i>VvFSK</i> , <i>VvFTK</i> y <i>At3g03770</i>	67
Figura 26	Expresión de <i>VvFSK</i> (negro) y <i>VvFTK</i> (gris) en bayas tratadas con distintas moléculas elicitoras.	69



Figura 27 Elementos en Cis de respuesta a azúcar (A) y de especificidad de semilla (s) en la región 2000 pb “río arriba” de VvFSK, VvFTK y At3g03770. 71

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1. LA VID Y EL CULTIVAR CARMÉNÈRE

La vid (*Vitis vinifera* L.) corresponde a una especie dicotiledónea ampliamente cultivada en el mundo, con una gran cantidad de cultivares que han sido agrupados sobre la base de características morfológicas y relacionados a la vez a su origen geográfico. Tres grupos ecológicos son reconocidos: el grupo pontica, que incluye cultivares de países de los alrededores de los mares Egeo y Negro; el grupo occidentalis, que comprende cultivares del oeste de Europa; el grupo orientalis, que engloba a cultivares originados en oriente medio, Irán, Afganistán y áreas cercanas. El cultivar Carménère, modelo de este estudio, estaría incluido dentro del grupo occidentalis, conjunto de variedades que 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).

La identificación de una región vitivinícola con una o más variedades corresponde a una de las características más típicas en la viticultura mundial desarrollada y es un objetivo para los países del Nuevo Mundo (Pszczółkowski, 2004). En los viñedos chilenos las variedades predominantes corresponden a Chardonnay, Sauvignon Blanc, Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah, Pinot Noir y Carménère (Fredes Veliz, 2007). Sin embargo, hasta finales del siglo XX, Chile no poseía una variedad emblemática que lo identificara. En la década de los 90 fue redescubierta la cepa Carménère, lo que significó una oportunidad para convertirla en baluarte del patrimonio vitivinícola chileno. Esta variedad es originaria del viñedo de Medoc, el más prestigioso y renombrado viñedo francés, conociéndose la con las sinonimias de Gran Vidure, Carmenelle, Cabernelle, Gran Carmenet y, en China, Caberneet Gernischt (Pszczółkowski, 2004). La variedad Carménère habría sido importada a Chile alrededor de 1850, junto con otras variedades de la Región de Bordeaux (Cabernet Sauvignon y Merlot), antes de la plaga de la filoxera. Los viñedos más extensos de esta variedad hoy se encuentran en Chile, alcanzando una superficie plantada de 8.248 hectáreas (Catastro Vitícola Nacional, 2008). Desde el punto de vista de su cultivo, la cepa Carménère corresponde a una variedad

vigorosa, pero de brotación tardía. La maduración de sus frutos puede extenderse en el tiempo y posee una gran tolerancia a la sobre madurez. En suelos pobres o secos y en climas extremos, tiende presentar problemas de fertilidad tales como el “millerandage”, fenómeno caracterizado por la presencia de bayas sin semillas en el racimo, las que permanecen sin madurar hasta el tiempo de cosecha. (Callejas et al., 2004; Pszczółkowski, 2004).

## **1.2. DESARROLLO REPRODUCTIVO DE LA VID**

### **1.2.1. Inducción y desarrollo floral**

En diversas especies vegetales el desarrollo reproductivo ha sido extensivamente estudiado, identificándose una compleja red genética que regula este proceso, la que involucra numerosos factores de transcripción y otros moduladores de la expresión génica. En la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, la transición de meristema vegetativo a meristema reproductivo está determinada por los genes de inducción floral que responden a las señales de floración (fotoperíodo, intensidad de luz, temperatura, giberelinas, etc.) activando a un segundo grupo de genes denominados integradores florales. Los genes integradores activan un nuevo grupo de genes que determinan la identidad del meristema floral, los que a su vez, inducen a los genes de identidad de órganos florales que exhiben una alta especificidad en la espacialidad de su expresión. Como consecuencia de ello y acorde al modelo denominado ABCE, se activa el proceso de morfogénesis floral, que concluye con la formación de la flor y los órganos reproductores respectivos en los verticilos florales correspondientes (Komeda, 2004; Posé et al. 2012). El proceso anteriormente descrito, con pequeñas modificaciones está ampliamente conservado en una gran variedad de especies vegetales (Soltis et al. 2007; Causier et al., 2010; Vasconcelos et al., 2009; Irish, 2010).

En vides, el ciclo reproductivo posee características particulares. El desarrollo floral y frutal se inicia con la formación de yemas, proceso que tiene lugar en el brote de la temporada, generando una yema invernante que brotará al año siguiente y que ya contiene

los predecesores de hojas, flores y zarcillos. Uno de los eventos clave que tiene lugar en la formación de yemas, es el desarrollo de las inflorescencias y la posterior diferenciación de las estructuras florales que tras la fecundación darán origen a los frutos. Este proceso se realiza en dos etapas: I) la inducción floral, que tiene lugar en los meses de verano y que concluye con el desarrollo de inflorescencias previo a la entrada en dormancia de las yemas en otoño e invierno y, II) la diferenciación floral, que se activa tras la ruptura de las yemas en la primavera siguiente (Mullins, 1992; Carmona et al., 2008). Los mecanismos asociados a la regulación de este proceso han sido poco estudiados. Genes homólogos a aquellos ya descritos en *A. thaliana* han sido identificados y caracterizados (Carmona et al., 2008; Almada et al., 2009 y 2011), sin embargo, la forma como ellos interactúan para regular este evento de desarrollo aún debe ser dilucidada. La inducción floral que ocurre en la yema latente en formación durante el verano parece estar mediada por el fotoperíodo, toda vez que los genes pertenecientes a esta vía de inducción son activados coordinadamente en este tejido (Almada et al., 2009). Una vez desarrollado el primordio de inflorescencias, la yema que las contiene entra en fase de dormancia, fase controlada genéticamente y que es naturalmente inducida por el fotoperíodo y las bajas temperaturas (Carmona et al., 2008). El tránsito a la fase de dormancia está estrechamente coordinado con el desarrollo floral y los mecanismos que regulan ambos procesos poseen un alto grado de integración. Al comienzo del otoño las proteínas regulatorias codificadas por los genes *DAM* (*Dormancy-Associated MADS*) reprimen la expresión del gen integrador floral *FT*, evento esencial para interrumpir el proceso de desarrollo floral y que la yema entre en estado de dormancia (Horvath, 2009). Tras el receso invernal en primavera se produce la ruptura de las yemas y se induce el proceso de diferenciación floral en el que cada una de las inflorescencias generadas en predormancia se divide para originar los primordios florales. Genes integradores florales claves descritos previamente en *A. thaliana*, *SOC1*, *LEAFY* y *FT*, son inducidos a través de una vía aparentemente independiente del fotoperíodo, produciéndose la inducción de los genes de identidad de órganos que regulan la morfogénesis de las estructuras florales (Carmona et al., 2008; Almada et al., 2009 y 2011).

### 1.2.2. Desarrollo de carpelos y óvulos

De acuerdo a lo establecido principalmente en la especie modelo *A. thaliana* y el modelo ABCE, para el correcto desarrollo del carpelo, es necesaria la expresión de genes de las clases C y D. En el verticilo floral cuatro se inicia la morfogénesis de carpelos, proceso modulado por factores de transcripción (FTs) **MADS-box** como AGAMOUS (AG) y SEPALATA 1 (SEP1), SEP2 y SEP3 (Jack, 2004). Así como es necesaria la función de estos genes al comienzo de la morfogénesis carpelar, para la correcta formación de las subestructuras de este órgano, es necesaria la presencia de factores reguladores específicos en cada tejido. Un ejemplo de estos factores podrían ser PhZPT2-10 y PhZPT3-3, FTs del tipo “**zinc finger**” descritos en petunia (*Petunia hybrida*). Estos FTs posiblemente regularían genes con función estructural, estando la síntesis de estos finamente restringida al estigma en el caso de PhZPT2-10 y al estigma y el ovario en el caso de PhZPT3-3 (Kubo et al., 2000).

Simultáneamente con la organogénesis del carpelo, se inicia el desarrollo de óvulos, regulado por una serie de factores homeóticos codificados por los genes *BEL1*, *SHATTERPROOF 1 (SHP1)*, *SHP2* y *SEEDSTICK (STK)*, los que son denominados genes de identidad de óvulos. El rol de tales genes parece centrarse en el balance de la actividad de AG puesto que tanto mutantes *bel1* como el triple mutante *shp1 shp2 stk* desarrollan estructuras carpelares en lugar de los óvulos, indicando que en ausencia de estos genes predominaría la función AG. Los factores SEP1, SEP2 y SEP3, son también claves para establecer la identidad y el correcto desarrollo del óvulo. Estas proteínas son expresadas en los primordios de óvulo y, además, mutaciones simultáneas en los genes que las codifican entregan fenotipos similares a los del triple mutante *stk shp1 shp2*. En *A. thaliana*, petunia y arroz se ha demostrado interacción entre las proteínas SEP/STK y AG/SHP1/SHP2, sugiriendo una importante participación de grandes complejos MADS en el establecimiento de la identidad de óvulo (Skinner et al., 2004). Por otro lado, se ha descrito a ARABIDOPSIS CRINKLY 4 (ACR4) y STRUBBELIG (SUB) como proteínas requeridas para regular la organización celular en el desarrollo del integumento del óvulo. Ambas proteínas serían receptores de membrana con función quinasa (Gifford et al., 2003; Yadav et al., 2008).

Particularmente, en la vid el ovario se compone de dos lóculos, cada uno con dos óvulos. Cada óvulo tiene un saco embrionario con una célula huevo haploide y un núcleo polar diploide (Pratt, 1971; Vasconcelos et al., 2009). En esta especie, ha sido identificado *VvMADS1*, un gen necesario en la formación del ovario y el desarrollo floral con un patrón de expresión en flores similar al de *AG*. Sin embargo, al sobreexpresarlo en Chardonnay no aparecen las estructuras carpelares esperadas en lugar de los sépalos. Esto, sumado a una mayor homología con *SHP1/2*, impide determinar si se trata del ortólogo de *AG* o *SHP1/2*. También se ha identificado a *VvMADS2* y *VvMADS4*, homólogos de *SEP1* y *SEP3*. El modo de expresión establecido para ellos es consistente con el rol de moduladores del desarrollo de órganos florales en esta especie (Boss et al., 2002, 2003; Joly et al., 2004). *VvMADS5* está descrito como un posible ortólogo de *SEEDSTICK (STK)*, de la clase D, dada su homología con este gen y su expresión en carpelos y semillas en desarrollo (Boss et al., 2002). Finalmente, *VvTM6*, un gen identificado como clase B (clase corrientemente responsable del desarrollo de los verticilos segundo y tercero), aparece expresado también en carpelo y fruto, lo que sugiere distintos roles para las clases de genes en las diferentes especies (Poupin et al., 2007).

### **1.2.3. Desarrollo de la antera y el polen**

Experimentos de transcriptómica en *A. thaliana* han permitido identificar alrededor de 15.000 genes expresados en la antera y el gametofito masculino (Wilson y Zhang, 2009). Mecanismos regulatorios de la expresión génica aún no bien dilucidados y que involucran numerosos FTs modulan este proceso. En la iniciación del desarrollo de la antera, es necesario el mencionado gen de la clase C *AG*, junto a los factores de la clase B *PISTILATA (PI)* y *APETALA-3 (AP3)* (Causier et al., 2010). Así, una etapa clave es la inducción de *SPOROCYTELESS/NOZZLE (SPL/NZZ)* por *AG*. *SPL/NZZ* es un FT necesario para que comience la esporogénesis en el estambre y el carpelo, su disfuncionalidad en el mutante *spl/nzz* afecta la formación de las células madre del polen (PMCs) y de las capas celulares que la rodean

(Schiefthaler et al., 1999; Yang et al., 1999; Ito et al., 2004). Del mismo modo, en la especificación celular de la antera también son importantes algunas proteínas con función de receptor de membrana. Entre ellas, BARELY ANY MERISTEM 1 Y 2 (BAM1 y BAM2) actúan redundantemente en las primeras etapas que definen el endotecio y el tapetum incidiendo indirectamente en el correcto desarrollo del polen. En el doble mutante *bam1/bam2*, la pérdida de función de tales genes conduce a la degeneración de las PMCs. Se ha propuesto que *BAM1* y *BAM2* actúan en un circuito regulatorio con *NZZ/SPL* para balancear el número de células somáticas y esporogénicas en la antera (Hord et al., 2006; Sun et al., 2007). RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2 (RPK2) también participa en el desarrollo de la antera, con esterilidad masculina en el mutante *rpk2* a causa de un tapetum hipertrófico y la agregación del limitado número de granos de polen que se forman producto de alteraciones metabólicas y la formación de una pared celular defectuosa (Mizuno et al., 2007).

Una vez que la iniciación de las capas celulares de la antera ha ocurrido, *DYSFUNCTIONAL TAPETUM 1 (DYT1)* parece ser uno de los primeros actores en el desarrollo del tapetum. *DYT1* codifica un putativo FT del tipo “*basic helix-loop-helix*” (bHLH) que actuaría río abajo de *SPL/NZZ* (Zhang et al., 2006). En el mutante *dyt1* no hay expresión de *MALE STERILITY 1 (MS1)*. *MS1* codifica un FT del tipo “*plant homeodomain*” (PHD) que muestra una expresión estrictamente regulada en el tapetum durante la etapa tardía de la formación del polen. En el mutante *ms1* el tapetum muestra alteraciones en la secreción y en la muerte celular programada, por lo que no se produce una correcta formación de la pared del polen y este no es viable (Wilson et al., 2001; Ito y Shinozaki, 2002; Ariizumi et al., 2005; Yang et al., 2007). En petunia, *TAPETUM DEVELOPMENT ZINC FINGER PROTEIN 1 (TAZ1)* tiene una marcada expresión en el tapetum desde el momento en que ocurre la meiosis de las células madres del polen. Al silenciar el gen *TAZ1*, se provoca un desarrollo aberrante y una degeneración precoz de este tejido seguidos de un aborto extensivo de las microsporas, teniendo aquellos granos de polen que logran sobrevivir una baja tasa de germinación (Kapoor et al., 2002).



La pared del polen está constituida por dos capas, una externa o exina, formada por un polímero alifático llamado esporopolenina y una interna o intina, compuesta de pectina y celulosa y sintetizada por la microspora. En *A. thaliana*, *MYB103* ha sido descrito como de importancia en el desarrollo del polen ya que en el mutante *myb103* el tapetum degenera temprano sin la liberación de cuerpos oleosos, vesículas y plastidios, lo que resulta en una reducción en las enzimas disponibles para la formación de la exina (Higginson et al., 2003; Li et al., 2007). En el mutante *myb103*, se reduce fuertemente la expresión de *MS1*, no ocurriendo cambios en la expresión de *MYB103* en *ms1* (Zhang et al., 2007; Yang et al., 2007).

Particularmente, en el caso de la *Vitis vinifera*, el androceo está conformado por cinco estambres, constituidos a su vez por un largo filamento y una antera con cuatro sacos polínicos agrupados en dos lóculos. Dentro de estos sacos tiene lugar la meiosis de las células madres primarias, que dan origen a cuatro microsporas haploides cada una (Vasconcelos et al., 2009). La antera de la vid está formada básicamente por tres tejidos, una epidermis externa, un endotecio delgado y el tapetum, un tejido que se caracteriza por un número variable de núcleos por célula. Al interior de los sacos polínicos se encuentran las células madres del polen. La meiosis en estas células da origen a las microsporas haploides, cuatro por cada célula madre, que permanecen en el lóculo donde son sostenidas por un fluido nutritivo. Este fluido está formado por la degeneración del tapetum, que permanece hasta el momento de liberación del polen. El polen maduro tiene de 25 a 30  $\mu\text{m}$  de longitud y 12 a 15  $\mu\text{m}$  de ancho (Vasconcelos et al., 2009).

En la vid, además del ya mencionado posible ortólogo de *AG VvMADS1*, han sido caracterizados tres homólogos de genes de identidad floral de la clase B posiblemente necesarios en el desarrollo de la antera y el polen, *Vitis vinifera PISTILLATA (VvPI)*, *Vitis vinifera APETALA 3 (VvAP3)* y *Vitis vinifera TM6 (VvTM6)*, siendo aparentemente, los únicos miembros de esta clase en la especie. Como se espera para esta clase de genes, su expresión se detecta en los verticilos segundo y tercero estableciéndose que la expresión de *VvPI* se incrementa durante la maduración del polen y disminuye entre los eventos de polinización y

fertilización, después de la caída de la corola, mientras *VvTM6* se expresa en la última etapa del desarrollo de la antera (Poupin et al., 2007; Carmona et al., 2008).

#### **1.2.4. Desarrollo frutal en la vid**

Cuando la maduración de los tejidos florales se concreta correctamente, ocurre la polinización y la fertilización. En la vid puede ocurrir tanto polinización cruzada como autopolinización, variando de un cultivar a otro (Staudt, 1999; Heazlewood y Wilson, 2004). Tras el contacto del polen con el estigma comienza la fase de germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico que se elonga a través del tejido estilar de transmisión hacia los óvulos donde entra por la nucela y la pared del saco embrionario, liberando las células espermáticas que fertilizarán a la célula huevo y la célula central (Pratt, 1971; Ciampolini et al., 1996; Vasconcelos et al., 2009).

Una vez producida la fertilización, se induce la expresión de genes para proteínas asociadas al metabolismo de reguladores hormonales tales como giberelinas y auxinas, los que promoverían la división y expansión celular dando inicio al desarrollo del fruto (Coombe, 1992; Conde et al., 2007; Dauelsberg et al., 2011, Kuhn y Arce-Jhonson, 2012). La fertilización del óvulo promovería la remoción de un inhibidor de auxinas o aumentarían la sensibilidad a esta hormona para estimular el crecimiento del nuevo fruto. Una vez ocurrido esto, la auxina sería sintetizada en la semilla y transportada al pericarpio donde tendría un rol importante en la regulación de genes de la biosíntesis y el catabolismo de giberelinas (van Huizen et al., 1995; Ozga et al., 2003; Ozga y Reinecke, 2003; Symons et al., 2006; Martínez-Esteso et al., 2011). Otros reguladores como ácido salicílico y etileno parecen estar también involucrados en el desarrollo de la baya y la semilla, no estando clara aún su función (Ferreira y Kieber, 2005; Deluc et al., 2007; Chervin et al., 2008 y 2010; Sun et al., 2010). La hormona ácido abscísico (ABA) estaría relacionada con la entrada en dormancia de la semilla y, siendo emitida por esta, estimularía la maduración de la baya (Kondo y Kawai, 1998).

Tras el proceso de establecimiento del fruto ("*fruit set*"), comienza el desarrollo del embrión y endosperma, conjuntamente con la transformación de los integumentos del óvulo y el tejido carpelar u ovario, los que derivan en la cubierta de la semilla y en el pericarpio, respectivamente. El pericarpio se subdivide en un exocarpo o piel, el mesocarpo o pulpa y el endocarpo (Pratt, 1971; Öpik y Rolfe, 2005, cap. 11; Purves et al., 2003, cap. 39). La curva de crecimiento de la baya se divide en tres fases. La fase I consiste en una etapa de crecimiento debido fundamentalmente a división de las células del pericarpio. Este primer proceso está positivamente correlacionado con la tasa de crecimiento de las semillas. La fase II es una etapa de receso del crecimiento. En esta fase se alcanza la madurez de las semillas y tiene lugar un drástico cambio tanto fisiológico como bioquímico de la baya, evento denominado *envero*, el cual marca el inicio de la maduración del fruto (Mullins et al, 1992). En la fase III (post-*envero*), se inicia la acumulación de azúcar, la síntesis de antocianinas y el desarrollo del color y la condensación de taninos, eventos que conducen, en última instancia, a la maduración. El aumento del tamaño de la baya en esta etapa se genera por expansión celular debida a la importación de agua y azúcar al interior del mesocarpo (Coombe y Hale, 1973; Coombe y McCarthy 2000; Colin, 2002; Roby y Matthews, 2004).

Las semillas parecen ser de suma importancia en la determinación del tamaño final de la baya y su habilidad para madurar luego del *envero*, influenciando el desarrollo general de la baya mediante los reguladores del crecimiento producidos en su interior (Pratt, 1971; Staudt y Kassemeyer, 1984; Ristic e Iland, 2005; Friend et al., 2009; Conde et al., 2007). Durante su crecimiento, la semilla de la vid debe pasar por tres procesos fisiológicos: 1) crecimiento, 2) acumulación de reservas (aceites, proteínas y almidón) y 3) inicio de la dormancia (Pratt, 1971; Ristic e Iland, 2005). Cada semilla se desarrolla de acuerdo a un patrón definido que comienza con una rápida división y una alta tasa de crecimiento celular. En las dicotiledóneas, el desarrollo de la semilla implica una fase inicial de activa proliferación del endosperma seguida de una segunda fase en que el embrión crece hasta reemplazar casi todo el volumen del endosperma en la madurez. Como normalmente hay cuatro óvulos, dos

en cada carpelo, una baya puede tener potencialmente cuatro semillas (Weber et al., 2005; Gutiérrez et al., 2007).

La embriogénesis implica la morfogénesis y la maduración del embrión (Willemsen y Scheres, 2004; Dumas y Rogowsky, 2008). De acuerdo a la información recogida principalmente a partir de mutantes de *A. thaliana*, para el establecimiento del patrón morfológico y la polaridad son necesarios FTs como los del tipo WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN (WOX). *WUSCHEL* (*WUS*) codifica un FT con dominio “*homeobox*” que opera en la región apical del embrión siendo activado por señales de citoquinina. *WUS* es un FT maestro que mantiene indiferenciado el meristema apical mediante señales que emite desde el centro de organización, un grupo celular localizado bajo la zona central del meristema (Long y Barton, 1998; Leibfreid et al., 2005; Gordon et al., 2009; Lau et al., 2012). *MINISEED3* (*MNI3*/*WRKY10*) es un FT involucrado en la respuesta a GA y sintetizado tanto temprano en el embrión como en el endosperma. Otros FT como *MONOPTEROS* (*MP*), *BODENLOS* (*BDL*) y *TOPLESS* (*TPL*) controlan también el patrón básico embrionario (Szemenyei et al., 2008; De Smet et al., 2010). Por su parte, *LEAFY COTYLEDON 1* (*LEC1*) sería un activador transcripcional maestro de genes relacionados a la morfogénesis embrionaria y la diferenciación celular (Verdier y Thompson, 2008). En la vid, se ha identificado a *Vitis vinifera* *LEAFY COTYLEDON 1 LIKE* (*VvL1L*) como regulador del proceso de embriogénesis, siendo utilizado este gen como marcador de la presencia de embrión en las bayas (Maillot et al., 2009; Dualsberg et al., 2011).

Al terminar la fase I de crecimiento rápido de la baya, las semillas alcanzan casi su tamaño final, pero el embrión aún es pequeño. El endosperma comienza su desarrollo con divisiones nucleares tempranas y crecimiento celular que continúa hasta después de envero, guardando la regulación de su crecimiento estrecha relación con el tamaño final de la semilla. La semilla alcanza su aspecto maduro y máximo peso seco en plena fase III de crecimiento de la baya, momento en que el embrión alcanza su longitud mayor y la baya su peso máximo (Pratt, 1971; Mullins et al., 1992; Coombe y McCarthy 2000; Ristic e Iland, 2005; Berger y Chaudhury, 2009).

Dos tipos de alteraciones en el desarrollo normal de frutos en la vid han sido relacionados con anomalías en el desarrollo de la semilla. En el cultivar Thompson Seedless (Sultanina) ocurre un fenómeno denominado “estenoespermocarpia”, caracterizado por el desarrollo de un rudimento de semilla sin endosperma. En este caso, los frutos son de pequeño tamaño siendo necesaria la aplicación de reguladores del crecimiento (giberelina) para su crecimiento (Mullins et al., 1992; Kennedy et al., 2000). Un segundo tipo de anomalía en el desarrollo de las bayas de la vid corresponde al denominado “millerandage”, el cual se genera por un evento de polinización sin fertilización efectiva que conduce a la formación de racimos en los que coexisten bayas semilladas de tamaño normal y pequeñas bayas partenocárpicas (no semilladas) comúnmente denominadas “*shot berries*” (Christensen, et al. 2006; Keller 2005; Mullins, et al. 1992). La ocurrencia de este fenómeno ha sido relacionada con alteraciones en el metabolismo de poliaminas y con la disponibilidad, asimilación y transporte de micronutrientes esenciales tales como zinc, molibdeno y boro (Callejas et al., 2004; Colin et al., 2002; Martínez De Toda, 1991). Recientemente, se ha establecido que la formación de polen aberrante con anomalías estructurales parece inducir este fenómeno en la vid. Variedades como Syrah y Chardonnay, poseen un bajo porcentaje de ocurrencia de polen defectuoso y una baja incidencia de “millerandage”, en tanto que cepas como Carménère, Malbec y Merlot que exhiben la mayor tasa de partenocarpia presentan a su vez una alta tasa de polen estructuralmente aberrante. Las alteraciones estructurales del polen inciden sobre su capacidad germinativa, detectándose deficiencias en el normal desarrollo del tubo polínico (Alva, 2011).

La extensión del fenómeno de “millerandage” es variable de temporada en temporada y parece estar asociada a un evento de plasticidad fenotípica. Los frutos partenocárpicos no semillados realizan un proceso de desarrollo anormal, registrando severas anomalías fisiológicas y metabólicas que se traducen en una reducida acumulación de azúcares, baja producción de antocianinas, elevado contenido de poliaminas y metoxipirazinas, disminución en la polimerización de taninos, entre otros. Lo anterior indica que importantes modificaciones en el perfil de expresión de genes asociados a los procesos

metabólicos descritos han tenido lugar durante este fenómeno. La determinación de tales modificaciones provee de una interesante aproximación experimental para establecer la participación y el rol de los genes afectados en el desarrollo normal de bayas en la vid. En un trabajo previo, los perfiles transcripcionales registrados durante el desarrollo de bayas normales y partenocárpicas de la variedad Carménère, fueron comparados mediante hibridaciones de macroarreglos. Aproximadamente 4.800 ESTs aislados desde librerías de expresión de tejidos reproductivos del cultivar Carménère fueron incluidos en este análisis (Peña-Cortés et al., 2005). Los resultados obtenidos arrojaron una lista de aproximadamente 800 genes que presentaban una expresión diferencial en bayas partenocárpicas, en relación con bayas normales. Considerando el rol que la regulación de la expresión génica posee sobre eventos de plasticidad fenotípica como el referido, especial atención se confirió a genes que codifican para proteínas asociadas a eventos de regulación transcripcional, las que fueron seleccionadas tanto en base a su nivel de expresión como por su significancia estadística, generando un conjunto de genes candidatos descritos en la tabla 1.

En este trabajo se presenta la caracterización de tres genes aislados de *V. vinifera* cultivar Carménère, dos de los cuales aparecen en la tabla 1. El primero de ellos correspondiente al gen representado por el EST código VVCCGC3015D09.b. Este gen fue escogido por estar fuertemente reprimido en bayas sin semilla y por tener similitud a *PhZPT3-3* de petunia y *SIZPT3-1* de *Silene latifolia*, genes que codifican para un factor de transcripción del tipo C2/H2 "**zinc finger**" (Kubo et al., 2000; Jenkins et al., 2005), los que se expresan en forma específica en tejidos secretores del pistilo y que podrían representar elementos importantes para una correcta fecundación del óvulo. Los genes segundo y tercero, corresponden a los representados por el EST VVCCGS2117F10.b., los cuales codificarían para receptores quinasa putativos. Uno de estos genes corresponde al que presenta la mayor tasa de represión en bayas carentes de semillas. Los perfiles de expresión de los ESTs referidos en la hibridación de macroarreglos sugieren una asociación de los genes ellos representan con el desarrollo normal de fruto. Por tal razón, un análisis pormenorizado de su expresión en dos cultivares con diferente tendencia al desarrollo de bayas

partenocárpicas (Carménère y Cabernet Sauvignon), permitiría establecer diferencias en su nivel transcripcional que den cuenta de las distintas características de ambos cultivares.

**Tabla 1.** ESTs provenientes de librería de expresión diferencial de bayas de vid cv. Carménère con o sin semilla. Los ESTs de la tabla corresponden a aquellos con una posible función reguladora de la expresión de otros genes en bayas. Sombreados aparecen los ESTs seleccionados para ser caracterizados en el presente trabajo.

	ESTs	Valor P	Nivel de expresión
VVCCGC3052A12.b	Similar to MADS-box protein 2 [ <i>Vitis vinifera</i> ], partial (61.6%)	0,0056	5,80
VVCCGC3049H04.b	Similar to GHMYB10 [ <i>Gossypium hirsutum</i> ], partial (14.3%)	0,0066	3,40
VVCCGS2208C05.b	Weakly similar to GHMYB10 [ <i>G. hirsutum</i> ], partial (74.7%)	0,0032	6,07
VVCCGC3054B05.b	Weakly similar to KOW domain TF protein [ <i>A. thaliana</i> ], partial (13.9%)	0,0761	5,65
VVCCGC1045H03.g	Weakly similar to MADS box protein 26 [ <i>Cucumis sativus</i> ], partial (73.3%)	0,0147	5,18
VVCCGS1038B03.g	Weakly similar to putative CCAAT-binding TF [ <i>Oryza sativa</i> ], partial (79.2%)	0,0003	5,01
VVCCGC1072A10.g	Weakly similar to putative RING zinc finger protein [ <i>A. thaliana</i> ], partial (34.3%)	0,0342	5,00
VVCCGC2030B11.b	Weakly similar myb family TF [ <i>A. thaliana</i> ], partial (51.3%)	0,0277	3,42
VVCCGC1059G08.g	Weakly similar myb-like TF 6 [ <i>Gossypium raimondii</i> ], partial (50.2%)	0,0285	2,87
VVCCGC1004E09.g	Similar homeodomain protein ARBORKNOX1 [ <i>Populus</i> ], partial (57.3%)	0,0436	0,41
VVCCGS1049G01.g	Similar to MADS box protein 26 [ <i>C. sativus</i> ], partial (64.1%)	0,065	0,35
VVCCGS1007H03.g	Homologue to MADS-box protein 2 [ <i>V. vinifera</i> ], partial (68.7%)	0,0355	0,25
VVCCGC3081A10.b	Homologue to MADS-box protein 4 [ <i>Vitis vinifera</i> ], partial (48.7%)	0,0078	0,12
VVCCGC3073C10.b	Homologue to FUL-like protein; VFUL-L [ <i>V. vinifera</i> ], partial (76.1%)	0,0013	0,10
VVCCGS2111E05.b	Weakly similar to WRKY DNA-binding protein 44, partial (21.6%)	0,0034	0,24
VVCCGC3056H06.b	Weakly similar homeobox-leucine zipper protein [ <i>O. sativa</i> ], partial (55.2%)	0,0046	0,14
VVCCGC3015D09.b	Weakly similar to zinc finger protein ZPT3-3 [ <i>Petunia</i> ], partial (72.8%)	0,0694	0,11
VVCCGS2243G12.b	Weakly similar to SNF2/SWI2 family TF [ <i>A. thaliana</i> ], partial (11.9%)	0,0162	0,05
VVCCGS2117F10.b	Solanum chacoense receptor-like kinase 17 precursor (ORK17) mRNA, complete cds (65%)	0,0008	0,01



### 1.3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### Hipótesis

Los genes representados por los ESTs código VVCCGC3015D09.b y código VVCCGS2117F10.b en la base de datos DEGECHIVID, codifican para proteínas asociadas a la red regulatoria del desarrollo floral y frutal de *Vitis vinifera*, por lo que poseen un patrón de expresión tejido y estadio-específico durante el desarrollo reproductivo en vides. Por consiguiente cultivares con diferencias en su desarrollo reproductivo presentarán diferencias en tal patrón.

#### Objetivo general

Analizar estructural y funcionalmente los genes representados por los ESTs código VVCCGC3015D09.b y código VVCCGS2117F10.b y evaluar su patrón de expresión durante el desarrollo floral/frutal de *V. vinifera*.

#### Objetivos específicos

1. Aislar y caracterizar estructuralmente los genes representados en la base de datos DEGECHIVID por los ESTs código VVCCGC3015D09.b y código VVCCGS2117F10.b.
2. Evaluar el patrón de expresión relativa de dichos genes en tejidos vegetativos y reproductivos en distintos estadios de desarrollo en dos cultivares de vid con distinto fenotipo, Carménère y Cabernet Sauvignon.
3. Evaluar el rol de genes homólogos a los de *Vitis vinifera* sobre el fenotipo de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.
4. Aislar y caracterizar *in silico* las secuencias promotoras de los genes estudiados.
5. Analizar el efecto de hormonas vegetales y moléculas elicitoras sobre la expresión de los genes en estudio.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **2.1. MATERIALES**

### **2.1.1. Material vegetal**

#### ***Vitis vinifera***

Muestras de diversos órganos de la planta de vid vinífera de los cvs. Carménère y Cabernet Sauvignon fueron colectadas durante las temporadas 2007-2008 y 2008-2009 desde un viñedo comercial en el Valle del Maule en la zona central Chile. Las muestras fueron tomadas desde noviembre, cuando ocurre la formación de inflorescencias, hasta abril, cuando las bayas están maduras. El muestreo consistió en tomar los órganos a una misma altura dentro de las plantas y al azar desde plantas sometidas a iguales condiciones en la viña. Los tejidos analizados fueron definidos de acuerdo al sistema modificado de Eichhorn-Lorenz (Coombe, 1995). Los estadios florales colectados fueron: EL19 (inflorescencias o pequeños racimos), EL21 (flor cerrada) y EL23 (plena flor o flores con 50% de caída de caliptra), colectando también polen en este último estadio. En el caso de los estadios de desarrollo frutal, estos fueron: EL31 (bayas en pre-envero con 7 mm de diámetro), EL35 (bayas en envero), EL36 (bayas post-envero) y EL38 (bayas con madurez de cosecha). Los estadios fueron determinados para las bayas semilladas normales, de modo que los racimos fueron colectados y las bayas normales y partenocárpicas fueron separadas para los procesos posteriores. Las muestras de tejido vegetativo (raíz, hoja y zarcillo) fueron colectadas al momento de pre-envero

Para ensayo de elicitores se utilizó bayas cosechadas en el estadio de pre-envero el año 2009.

## ***Arabidopsis thaliana***

Semillas de *A. thaliana* variedad *Columbia* tipo silvestre (WT) y mutantes con inserción de DNA-T en la región promotora de *ZAT4* (línea CS841944) y la región codificante de *At3g03770* (línea CS804398) fueron obtenidas desde el *Arabidopsis Biological Resource Center* (Ohio State University, Columbus, OH) y utilizadas para multiplicación de plantas. Estas plantas fueron genotipadas para confirmar mutación y caracterizadas fenotípicamente.

## **2.2. MÉTODOS**

### **2.2.1. Oligonucleótidos partidores utilizados en esta tesis**

Tabla 2. Partidores cebadores para las reacciones de PCR utilizadas en el desarrollo del trabajo de tesis

<b>Gen o amplicón</b>	<b>Partidor</b>	<b>Temperatura de anelling (°C)</b>
<b><i>Partidores empleados en PCR de tiempo real</i></b>		
<i>VvPSZ3</i>	Fw: 5'- GGCTTCTTCATCCTCGTCATC -3' Rv: 5'- AGGCAGCATCAACAGCAAAG -3'	60 60
<i>VvFSK</i>	Fw: 5'- TGCACAATGAACCAAGTGAGAGGC 3' Rv: 5'- CTACAGGCTCCTAGGATTACAC -3'	58 58
<i>VvFTK</i>	Fw: 5'- ATCAGATGCCTGCATAAGGACCCA -3' Rv: 5'- TGTGGAAGCAGCAAACCTGA -3'	58 58
<i>Vv18S</i>	Fw: 5'- CGTCCTAGTCTCAACCATAA-3' Rv: 5'- GAGTATGGTCGCAAGGCTGA -3'	58 58
<i>VvGAPDH</i>	Fw: 5'-TTCCGTGTTCCCTACTGTTG-3' Rv: 5'-CCTCTGACTCCTCCTTGAT-3'	60 60
<i>VvUBI</i>	Fw: 5'-GTGGTATTATTGAGCCATCCTT-3' Rv: 5'-AACCTCCAATCCAGTCATCTAC-3'	60 60
<i>ZAT4</i>	Fw: 5'- ACGGAAGTAACATCGGAGCAGGAA-3' Rv: 5'- CCCGAATCACGCAAAGTCTGTTGT -3'	60 60
<i>ZAT9</i>	Fw: 5'- ACGTCGAGTTCATAGAAACGAG -3 Rv: 5'- AAAAAGATTCAAACCTTTACGAA -3'	60 60
<i>AtF-Box</i>	Fw: 5'- TTTCGGCTGAGAGGTTTCGAGT -3' Rv: 5'- GATTCCAAGACGTAAAGCAGATC -3'	60 60

<b>Partidores empleados para amplificar los marco de lectura abierto completos</b>		
VvPSZ3	Fw: 5'- AGGGATCCATGGAGAAGCACAAGTG -3' Rv: 5'- TTGAATCCCTTAGCCATTCATCGTCT -3'	60 60
VvFSK	Fw: 5'- ATGGGGACACAAATCCTTCCTT -3' Rv: 5'- ACTCATTGTGAAGACAAGTCAG-3'	63 63
VvFTK	Fw: 5'- ATCTCGAGATGGCAAAGGATTCTGC -3' Rv: 5'- CCCCAGTACCCATGAATGTTGAGACG -3'	65 65
ZAT4	Fw: 5'- GTGTTCTAGAATGGAGAGATACAAGT -3' Rv: 5'- CCTTGAGCTCTCACCATTCATCAAACA -3'	60 60
ZAT9	Fw: 5'- GTGTTCTAGAATGGAGAGATACAAGT -3' Rv: 5'- CCTTGAGCTCTCACCATTCATCAAACA -3'	60 60
<b>Partidores empleados para amplificar los promotores de los genes indicados</b>		
PromotorVvPSZ3	Fw: 5'- CCTAGAGCTCCATCCCCTCTTCTCT -3' Rv: 5'- AAACCTAGACTCACTTCTCTCTCTC -3'	58 58
PromotorZAT4	Fw: 5'- GAGATCTAGAGGTTTGGCACCACCAT -3' Rv: 5'- CGACGAGCTCGTACAGAACAGAGATA -3'	57 57
<b>Partidores empleados para subclonar en vector de expresión pGFPau</b>		
VvPSZ3	Fw: 5'- TTCCTTTAAAGCGATGGAGAAGCACAAGTGCA -3' Rv: 5'- TTGGCCATGGCTGCGGCTCGTCTGATGGGGTTCA -3'	57 57
ZAT4	Fw: 5'- GTGTCTCGAGATGGAGAGATACAAGTGTA -3' Rv: 5'- TGTTGCCATGGCTGCTGCCATTCATCAAATACAAA -3'	57 57
<b>Partidores empleados para detectar inserto de ADN-T en genoma de líneas de <u>A. thaliana</u></b>		
pCSA110	Fw: 5'- ATTGATGAAACTGCTGCTGT -3' Rv: 5'- GGTGATACATATCCAGCCAT -3'	58 58
pAC161	Fw: 5'- CCGTTGCTGTCGTAATGATA -3' Rv: 5'- CTGCTGTCGAAATGACAAT -3'	60 60

---

### 2.2.2. Generación de plantas en maceta de *A. thaliana*

Las semillas se esterilizaron superficialmente tratándolas con una solución de hipoclorito de sodio al 30% y Tween 20 al 0,01% por 5 minutos, seguido de un lavado con etanol al 70% y tres lavados con agua estéril. Luego fueron resuspendidas en agua estéril y sembradas en placas petri en medio conteniendo sales Murashige and Skoog pH 5,8, 10% D-

sacarosa y 15 g/L de agar. Para las semillas mutantes, se incluyó en el medio 100 mg/L del herbicida DL-fosfinotricina. Todos los insumos de Phytotechnology Laboratories, KS, USA, excepto agar (Phyto agar, Duchefa Biochemie, Harlem, The Netherlands). A los 18 días las plantas fueron trasplantadas a macetas con sustrato consistente en suelo, perlita y vermiculita. Las plantas fueron crecidas en cámara a 20° C y en condiciones de día corto (8 hrs. luz) y largo (16 hrs. luz).

#### 2.2.2.1. Evaluación de plantas de la línea de inserción CS841944

Se comparó el fenotipo de las mutantes de *A. thaliana* CS841944 contrastándolas al WT. La línea CS841944, posee una inserción de ADN-T entre los nucleótidos -360 y -361 de la región río arriba de *AtZAT4*, (Fig. 15). Semillas provenientes de plantas heterocigotas autopolinizadas (n=96) se sembraron en un medio suplementado con el herbicida fosfinotricina a fin de eliminar las plantas tipo silvestre generadas durante la autopolinización y seleccionar aquellas que contienen la inserción de ADN-T. Las plantas sobrevivientes fueron analizadas mediante PCR sobre ADN genómico, para determinar la presencia tanto del alelo tipo silvestre como del alelo que contiene la inserción de ADN-T. El total de plantas analizadas (n=24) registró la presencia de ambos alelos simultáneamente (Fig. 16), indicando que ellas corresponden a heterocigotos. La morfología de la roseta fue analizada en base al número de hojas de roseta en "**bolting**" (emisión de escapo floral) y al diámetro de la roseta en "**bolting**" y en madurez del eje principal. La arquitectura de la inflorescencia se determinó midiendo la altura del eje principal maduro, el número de silicuas que este produjo, el número de meristemas secundarios no elongados y el número de inflorescencias axilares elongadas en el eje principal. El desempeño reproductivo se evaluó en base a la cantidad de flores tempranas y el número de semillas por silicuas.

### **2.2.3. Tratamiento de bayas y plantas con hormonas y moléculas inductoras de respuesta en plantas**

Para el ensayo de expresión génica en respuesta a compuestos elicitores, los racimos frescos se sumergieron en agua destilada para separar las bayas manteniendo el pedicelo. Las bayas fueron puestas sobre bandejas perforadas (Anexo 1), dispuestas de modo que sólo el pedicelo tomara contacto con las soluciones detalladas a continuación: giberelina 500  $\mu$ M, Ethrel (etefón, Acido-2-cloroetil-fosfónico) 0,2%, ácido abscísico 200  $\mu$ M, ácido naftalenacético 500  $\mu$ M, metil jasmonato 20 mM, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 100 mg/L, ácido salicílico 150  $\mu$ M, sacarosa 0,1 M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM, ZnCl<sub>2</sub> 250 ppm y 6-benzilaminopurina (BAP) 2mg/L. Como control se usó bayas tratadas sólo con el coadyuvante surfactante (Tween 20 0.02%). Para los tratamientos se colectó en dos tiempos: 6 horas de exposición y 24 horas de exposición. Luego del tratamiento, las bayas se congelaron en N<sub>2</sub> líquido.

### **2.2.4. Identificación y aislamiento de genes con función reguladora**

#### **2.2.4.1. Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) de *V. vinifera* y *A. thaliana***

Para vides, la extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo descrito por Steenkamp et al (1994). Para *A. thaliana*, se extrajo DNA genómico de acuerdo al método rápido descrito por Giraudat (2003). La calidad del ADN obtenido fue determinada mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio para verificar su integridad y por la relación A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> mayor que 1,95 para determinar su contaminación con proteínas. La concentración de los ácidos nucleicos fue determinada mediante el uso de espectrofotómetro *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific).

#### 2.2.4.2. Extracción de ácido ribonucleico (ARN) total de *V. vinifera* y *A. thaliana* y síntesis de ADNc

El ARN de vides cvs. Carménère y Cabernet Sauvignon fue extraído desde los distintos órganos de acuerdo al método desarrollado por Reid (Reid et al., 2006). Para extraer ARN de los tejidos de *A. thaliana* se utilizó el kit comercial *SV Total RNA Isolation System* (Promega, WI, USA) siguiendo instrucciones del fabricante. La integridad del ARN total fue verificada mediante electroforesis de gel desnaturantes de agarosa/formaldehído teñido con bromuro de etidio y por una relación  $A_{260}/A_{280}$  mayor que 1,95. La concentración del ARN fue medida del mismo modo que la del ADN. Se sintetizó el ADNc utilizando kit *Stratagene Affinity Script Multiple Temperature Reverse Transcriptase* (Agilent Technologies, CA, USA) de acuerdo a instrucciones del fabricante, empleando 2  $\mu\text{g}$  totales de ARN por muestra y con oligonucleótidos partidores del tipo oligo(dT).

#### 2.2.4.3. Clonación de los genes de interés

En estudios previos relativos al desarrollo frutal de la vid, se generó una librería de expresión proveniente de bayas normales y sin semillas de *Vitis vinifera* cv. Carménère. Desde ésta se seleccionó genes candidatos con posible función reguladora. Para el diseño de los partidores utilizados en el aislamiento de los marcos de lectura abiertos (ORF) de largo completo y las secuencias de las putativas regiones promotoras, se obtuvo la secuencia completa de los genes comparando sus respectivos ESTs presentes en la base de datos DEGECHIVID (Peña-cortés et al., 2005) con las bases de datos TIGR Plant Transcript Assemblies (<http://plantta.jcvi.org/index.shtml>) y GENOSCOPE del cultivar Pinot Noir ([www.genoscope.cns.fr/](http://www.genoscope.cns.fr/)). En el caso de los genes de *A. thaliana*, la secuencia genómica para el diseño de partidores, se obtuvo desde el TAIR SeqViewer (versión TAIR 10.0 genome sequence, [arabidopsis.org](http://arabidopsis.org)). Una vez obtenidos los partidores, se realizó las reacciones de PCR en 25 o 50  $\mu\text{L}$  empleando 100 ng de ADN y ADNc, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1X PCR Buffer, 250 nM de cada partidor, 200 nM dNTPs y 0,25 U de Taq polimerasa (Invitrogen). Los parámetros de cada PCR fueron: un paso inicial de desnaturación a 95  $^{\circ}\text{C}$  por 7 min, 35 ciclos de 95  $^{\circ}\text{C}$  por 40



s, 45 s a la  $T_m$  del partidor y 72 °C por un minuto por kilobase amplificada y, finalmente, 72 °C por 5 min. Los productos de PCR fueron separados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X. Las bandas correspondientes fueron escindidas del gel y el ADN fue extraído mediante el sistema EZNA Elution gel Kit (Omega Bio-Tek). Los fragmentos de DNA fueron clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega, WI, USA). Los vectores recombinantes para la secuencias de interés se emplearon para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  por el método químico. Las colonias transformantes fueron seleccionadas en base a su capacidad de crecer en un medio selectivo con ampicilina (100  $\mu$ g/ml) y por su coloración. Posteriormente, colonias transformantes seleccionadas se crecieron con agitación por 12 horas en medio LB líquido suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/ml). Luego, las células fueron precipitadas mediante centrifugación (9000 rpm por 5 minutos) a temperatura ambiente. El pellet bacteriano fue empleado para la purificación del ADN plasmidial mediante el sistema EZNA Plamid Miniprep Kit I (Omega Bio-Tek) de acuerdo al protocolo propuesto por el fabricante.

La secuencia de los plásmidos recombinantes fue determinada a través del servicio de secuenciación de la empresa MACROGEN (<http://www.macrogen.com>), Korea. Cada clon fue secuenciado 5 veces y cada una de las secuencias obtenidas fue verificada en cuanto al número de ambigüedades y las bases leídas de acuerdo al tamaño de secuencia esperado, de modo de detectar anomalías generadas por el proceso de secuenciación. Luego, se eliminaron las secuencias del vector de clonamiento y posteriormente las secuencias limpias se analizaron mediante los algoritmos BLASTn y BLASTx para conocer el grado de homología que presentaban con las aquellas disponibles en la base de datos (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

## **2.2.5. Análisis de secuencias nucleotídicas y aminoácidas deducidas**

### **2.2.5.1. Determinación de estructura y organización genómica**

A partir de las secuencias obtenidas se realizaron alineamientos comparando las secuencias aisladas desde ADN y ADNc. Esta comparación se realizó empleando los programas CLC Main Workbench 6.0.2 (CLC bio, MA, USA) y la base de datos GENOSCOPE.

### **2.2.5.2. Análisis de secuencias aminoácidas deducidas, predicción de topología y localización subcelular.**

Las secuencias génicas confirmadas, fueron traducidas mediante la utilización del programa Translate del *ExPASy Bioinformatics Resource Portal* (Gasteiger et al., 2003) para obtener los ORF de secuencia completa. El análisis y búsqueda de dominios conservados en las secuencias aminoácidas obtenidas, fue llevado a cabo utilizando los algoritmos computacionales InterProScan (Hunter, et al. 2009), SMART (Schultz et al., 1998) y Scansite 2.0 (Obenauer et al., 2003). Los potenciales dominios transmembrana de las proteínas codificadas fueron identificados utilizando los algoritmos computacionales Phobius (Käll et al., 2004) y TMHMM (Krogh et al., 2001), mientras que la identificación de dominios LRR fue realizado con LRRFinder (Gong et al., 2010). Para identificar péptidos señales y señales de localización celular se utilizó SignalP 3.0 (Bendtsen et al., 2004) y NucPred (Brameier et al., 2007), respectivamente. Los posibles blancos de localización subcelular de las secuencias aminoácidas en estudio, fueron determinados mediante SherLoc (Shatkay et al., 2007), CELLO v.2.5: subCELLular LOcalization predictor (Yu et al., 2006) y Wolf PSORT-II (Horton et al., 2007). La expresión putativa de los genes de *A. thaliana* fue predicha en la herramienta online Arabidopsis eFP Browser (Winter et al., 2007).

### **2.2.5.3. Análisis filogenético**

Para identificar secuencias relacionadas a los genes en estudio, en la base de datos GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), se empleó el algoritmo BLASTp usando la

secuencia aminoacídica deducida de estos genes. El programa ClustalX fue utilizado para crear el alineamiento múltiple (Thompson et al., 1997). 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 4 del programa MEGA (Tamura et al., 2007).

#### **2.2.5.4. Análisis *in silico* de las regiones regulatorias en *cis* de los genes en estudio**

La búsqueda de elementos en *cis* en los promotores de los genes se realizó *online* con los programas PLACE ([www.dna.affrc. go.jp/htdocs/PLACE/](http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/); Higo et al., 1999) y CONSITE (<http://asp.ii.uib.no:8090/cgi-bin/CONSITE/consite>; Sandelin et al., 2004).

#### **2.2.6. Localización subcelular de VvPSZ3 y ZAT4**

Los genes analizados fueron clonados en vector pGEM-T Easy (Promega, WI, USA) eliminando el codón de término y añadiendo la secuencia de corte para NcoI en su extremo 3'. El plasmidio resultante fue tratado con enzima NcoI y el fragmento liberado fue ligado en vector pGFPau linealizado con la misma enzima, quedando entre el promotor CaMV35S y la secuencia codificante de la proteína fluorescente verde sintética sGFP(S65T) (Chiu et al., 1996; Leivar et al., 2005). Las construcciones fueron chequeadas por secuenciación. El bombardeo de micropartículas se realizó con el sistema Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery (Bio-Rad) utilizando partículas de tungsteno (M17 de 1,1  $\mu$ ) como microcarrier, una presión de descarga de 1200 p.s.i. con discos de ruptura de 1100 p.s.i y una distancia de 6 cm respecto del tejido. El microcarrier fue disparado sobre células epiteliales de cebolla, las cuales fueron luego incubadas en oscuridad por 24 hrs. a 22° C y 100% de humedad. La expresión transitoria de las proteínas de fusión fue observada bajo microscopio confocal de fluorescencia Leica SP11.

### 2.2.7. PCR cuantitativa en tiempo real

Las amplificaciones de ADN por PCR en tiempo real se llevaron a cabo en un termociclador DNA Engine Opticon 2 Cyclor System (MJ Research) y equipo Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies). En todas las reacciones se empleó el sistema Brilliant SYBR Green Master Mix (Stratagene) de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Se analizaron tres replicas biológicas por cada estadio y para cada replica biológica las reacciones PCR en tiempo real se realizaron en triplicado (réplicas técnicas) para cada estadio y órgano estudiado, empleando 2  $\mu$ l Master Mix, 250 nM de cada partidor, 1  $\mu$ l de ADNc a una concentración de 25 ng/ $\mu$ L y agua libre de nucleasas hasta un volumen de reacción final de 20  $\mu$ l. ARN total libre de ADN de cada órgano y estadio del desarrollo analizado y agua, fueron incluidos en cada corrida como controles negativos. La fluorescencia fue medida al final de cada paso de amplificación. La amplificación fue seguida de una curva de desnaturalización generada mediante la lectura continua de fluorescencia durante un incremento de temperatura desde 65 °C a 95 °C.

Los datos obtenidos fueron manualmente analizados y la expresión fue normalizada a los genes *Vv18S*, *GADPH* (*VvGADPH*, NCBI/GenBank Database accession number CN938023) y *UBIQUITINA* (*VvUBQ*, TIGR Database accession number TC32075) para minimizar las posibles variaciones en las cantidades de templado empleadas. El doble de expresión versus un calibrador fue considerado significativo. Los genes *Vv18S* (número de accesoión GQ849399.1 en la base de datos NCBI/GenBank), *VvGADPH* (número de accesoión CN938023 en la base de datos NCBI/GenBank) y *VvUBQ* (número de accesoión TC32075 en la base de datos TIGR) fueron seleccionados para la normalización de los datos debido a su consistencia en los niveles de transcriptos en todos los órganos estudiados. 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 bajo análisis.

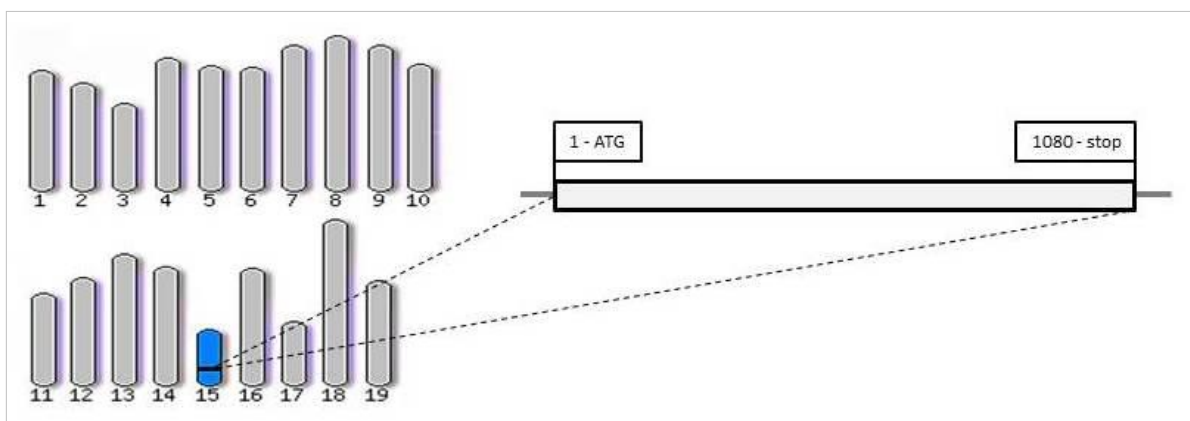
### **3. RESULTADOS**

### 3.1. EL GEN REPRESENTADO POR EL EST VVCCGC3015D09.b CODIFICARÍA UN PUTATIVO FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN DEL TIPO “ZINC FINGER” C2/H2

En el marco del estudio del desarrollo frutal de la vid (Desarrollo de una plataforma científico-tecnológica para el desarrollo de la genómica vegetal en Chile. Etapa I: Genómica funcional en vid) se generó una librería de expresión en tejidos reproductivos de la vid. A partir de esta, un análisis de hibridación de macroarreglos permitió identificar una serie de posibles genes reguladores de importancia para el desarrollo reproductivo normal en la vid (Tabla 1). El gen representado por el EST código VVCCGC3015D09.b (de aquí en adelante **VvPSZ3** (*Vitis vinifera* **POLLEN AND SEED ZINC FINGER PROTEIN**, donde el número 3 indica la cantidad de “zinc fingers”) fue seleccionado para ser analizado por su nivel de expresión en las bayas sin semillas y por su similitud con *PhZPT3*, un gen clave en la fecundación floral de petunia (Kubo et al., 2000). De forma paralela y a modo de comparación se caracterizó al gen *AtZAT4*, homólogo de *VvPSZ3* en *Arabidopsis thaliana*.

#### 3.1.1. Aislamiento y secuenciación de los genes **VvPSZ3** y su homólogo **AtZAT4**

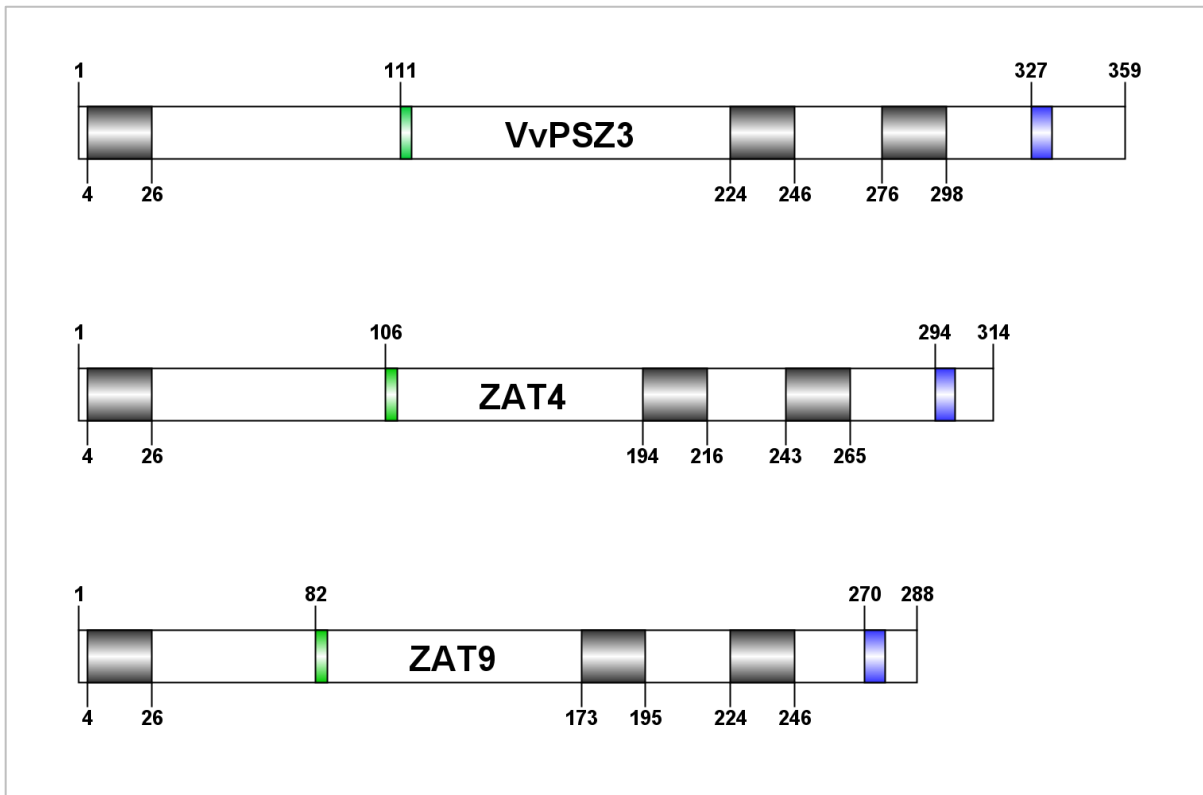
Utilizando partidores para largo completo de los genes (tabla 2) se realizó reacción de PCR sobre ADNg de *Vitis vinifera* Cv. Carménère y plantas enteras con flor de *A. thaliana* ecotipo Columbia y sobre ADNc sintetizado a partir de ARN de bayas en envero en el caso de la vid y ARN de plantas enteras en el caso de *A. thaliana*. Para las reacciones tanto sobre ADNg y ADNc, el producto amplificado correspondió a un amplicón de igual tamaño en ambas especies, confirmándose que las secuencias eran iguales en ambos casos con secuenciación nucleotídica. Esto sugiere que *VvPSZ3* de vid y *ZAT4* de *Arabidopsis thaliana* son genes sin intrones (Fig. 1; <http://arabidopsis.org/servlets/sv?action=seq&start=18603218&length=10000&band=0&option2=0>). Por otro lado, en el genoma de la vid, *VvPSZ3* corresponde a un gen de copia única que, utilizando la herramienta Grape Genome Browser de Genoscope, fue localizado en el cromosoma 15 de *Vitis vinifera* (<http://www.genoscope.cns.fr/spip/>).



**Figura 1. Gen VvPSZ3 aislado desde *Vitis vinifera*.** Cariotipo de la especie señalando ubicación del gen, y el marco abierto de lectura de 1080 pb (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>).

### 3.1.2. VvPSZ3 sería una proteína “zinc finger” Cys2/His2

La traducción *in silico* de VvPSZ3 indica que este gen codificaría una proteína de 359 aminoácidos con una masa molecular calculada de 40,298 kDa y un *pI* teórico de 5,65. El análisis de la secuencia aminoacídica deducida de VvPSZ3 permite establecer tres motivos conservados “zinc finger” tipo Cys2/His2, una caja B (RRRSKRXR) que actuaría como señal de localización nuclear, una caja L (región rica en leucina, EEXXAXCLXXL) entre los dos primeros “zinc finger” y una caja EAR (DLNL) en el extremo C terminal, la que se ha descrito como un dominio represor en otras proteínas (Ohta et al., 2001; Fig. 2). Cada uno de los motivos “zinc finger” contiene la secuencia conservada QALGGH. Para el primero el motivo, QALGGH corresponde al tipo K2-1, en el segundo es tipo Q2-2 y en el tercero tipo Q2-3 (Englbrecht et al., 2004). ZAT4 (At2g45120) y ZAT9 (At3g60580) son las proteínas hipotéticas con las que tiene mayor identidad en *A. thaliana*, con un 45,8% y un 43% respectivamente (Fig. 3). Cabe destacar que un análisis detallado profundiza la diferencia con la segunda: ZAT9 es más pequeña (288 aminoácidos contra 314 de ZAT4) y en su primer “zinc finger” (también del tipo K2-1) reemplaza el aminoácido Q por K y no por R en la secuencia QALGGH. Además, VvPSZ3 comparte identidad con proteínas “zinc finger” tipo Cys2/His2 que ya han sido reportadas, como PhZPT3-3 de *Petunia hybrida* (47%) y SIZPT3-2 de *Silene latifolia* (45%), con posibles roles en el desarrollo reproductivo.



**Figura 2. Representación esquemática de los dominios proteínicos con motivos y sitios funcionales de VvPSZ3 de vid y ZAT4 y ZAT9 de *A. thaliana*.** En negro, los dominios “zinc finger”, en verde la caja B o señal de localización celular y en azul la caja EAR. Los números indican las posiciones de los aminoácidos.



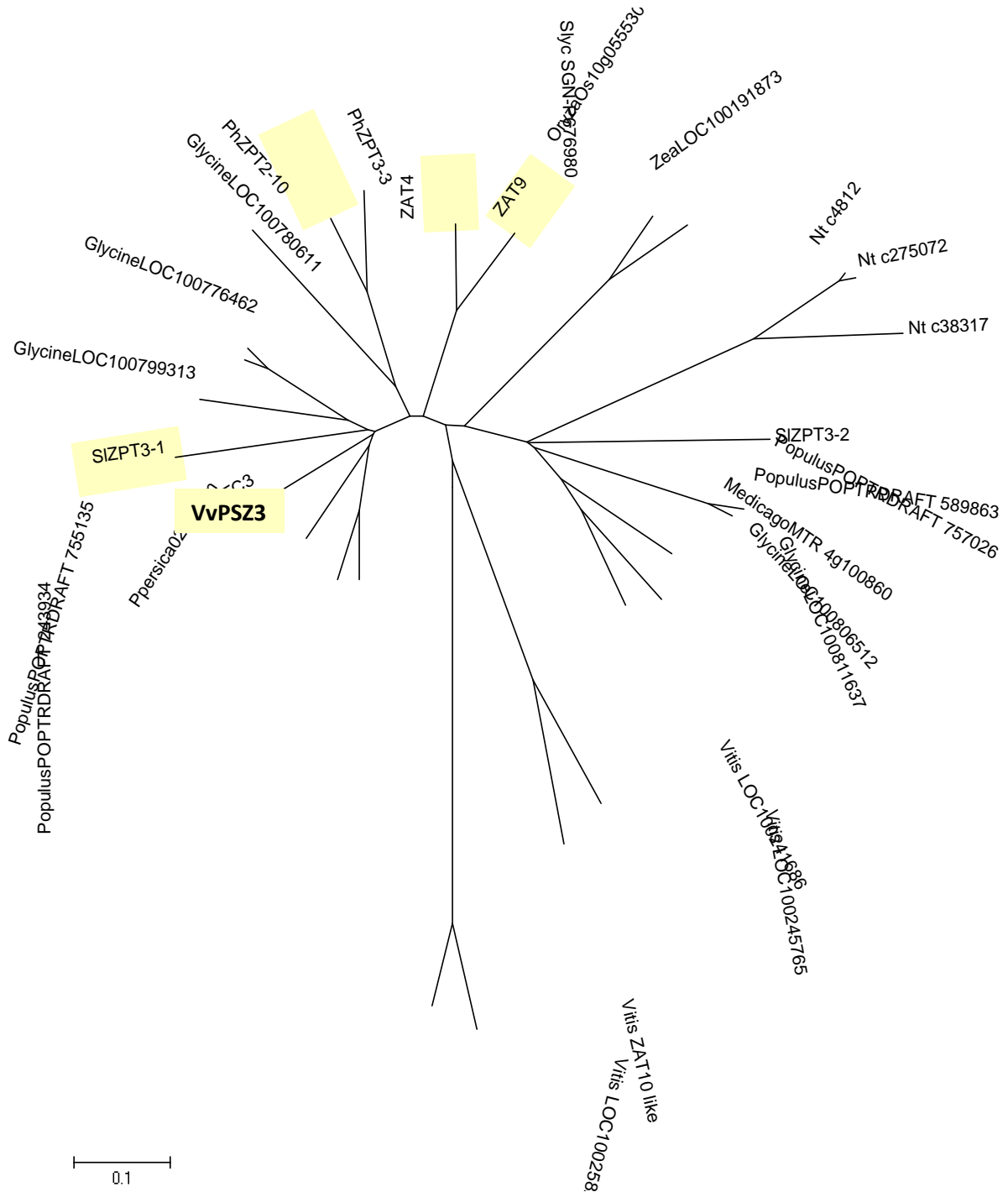


Figura 3. Comparación de la secuencia aminoacídica de VvPSZ3 con sus putativos homólogos de otras especies de plantas. El alineamiento fue realizado con las secuencias con mayor identidad presentes en plantas (al año 2011). Los residuos aminoacídicos idénticos se muestran ennegrecidos. Los tres dominios “zinc finger” y la caja L encontrados usando InterProScan y SMART se encuentran encerrados en cuadros. La señal de localización nuclear (identificada con NucPred; Brameier et al., 2007) se encuentra señalada como NLS. La caja EAR del extremo carboxilo terminal fue identificada por inspección visual, de acuerdo a lo descrito en la literatura.

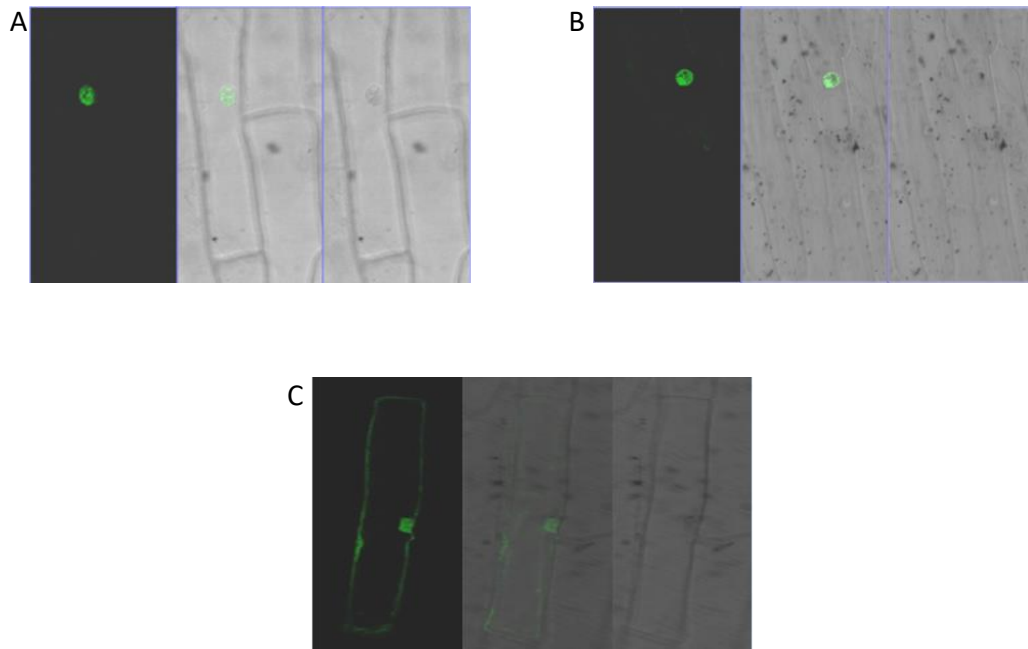
El alineamiento múltiple de VvPSZ3 con sus putativas homólogas de angiospermas leñosas y herbáceas muestra un alto grado de conservación en las secuencias aminoacídicas de los dominios “*zinc finger*”. Por otro lado, hay divergencia en la región inmediatamente posterior a la primera de dichas estructuras. Para determinar la distancia genética entre VvPSZ3 y otros genes que codifican proteínas similares de angiospermas, se construyó un árbol filogenético usando las secuencias proteicas deducidas disponibles en las bases de datos Genbank y SOL Genomics (Fig. 4). El árbol filogenético generado muestra que VvPSZ3 se agrupa con algunas proteínas no descritas de *Glycine*, *Prunus*, *Populus* y *Silene*, y con ZAT4 y ZAT9 de *A thaliana*. En un grupo aparte pero no distante están otras C2H2-ZFPs de vid, pero que cuentan con cuatro de estos dominios (las más cercanas) o con dos (las más distantes).

### **3.1.3. VvPSZ3 DE VID Y ZAT4 DE *A. thaliana* SE LOCALIZARÍAN EN EL NÚCLEO**

Los programas Wolf PSORT-II (Horton et al., 2007) y NucPred (Brameier et al., 2007) permitieron predecir, como primera aproximación, la localización subcelular nuclear de VvPSZ3 y ZAT4. Para comprobar esto experimentalmente, se fusionó las proteínas VvZFC3 y ZAT4 a sGFP. Estas proteínas así dispuestas fueron expresadas de manera transitoria bajo el control del promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 35S en células epidermales de cebolla. La fluorescencia de las proteínas de fusión VvPSZ3:sGFP y ZAT4:sGFP fue observada en el núcleo (Fig. 5), mientras que la fluorescencia del control, correspondiente a sGFP, fue localizada tanto en el citoplasma como en el núcleo de la célula (Fig. 5c), sugiriendo una función nuclear para VvPSZ3 y ZAT4.



**Figura 4. Relaciones filogenéticas entre VvPSZ3 y proteínas similares encontradas en otras especies de plantas.** El análisis filogenético se realizó utilizando MEGA 4.0 en base a alineamiento múltiple generado con ClustalX. Se asume que el largo de las ramas es proporcional a las distancias filogenéticas. El nombre de la secuencia indica el nombre del género o la especie. Nt, corresponde a *Nicotiana tabacum*; Sl, a *Silene latifolia*; Slyc, a *Solanum lycopersicum*; Ppersica, *Prunus persica* y Ph, *Petunia hybrida*.



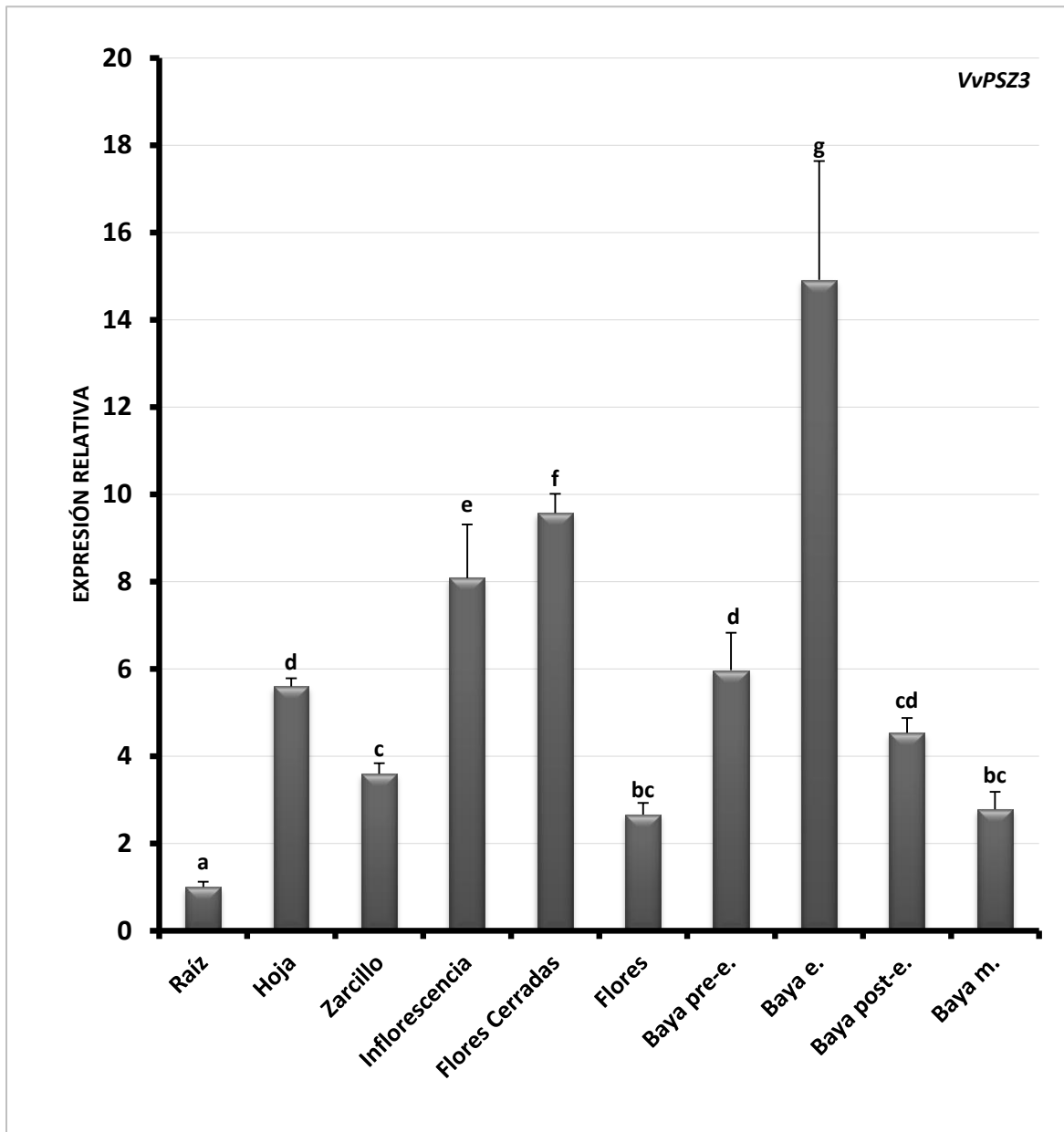
**Figura 5. Localización celular de VvPSZ3:sGFP y ZAT4:sGFP en planta.** Expresión transitoria de las construcciones (A) VvPSZ3:sGFP, (B) ZAT4:sGFPy (C) sGFP en células epidermales de cebolla. Las construcciones genéticas en el vector pGFPau fueron incorporadas mediante bombardeo de partículas de tungsteno. Las capas de células epidermales transformadas fueron incubadas por 24hrs a 22°C en oscuridad, posteriormente la fluorescencia fue visualizada mediante microscopia confocal.

### **3.2. ANÁLISIS DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES *VvPSZ3* Y *ZAT4***

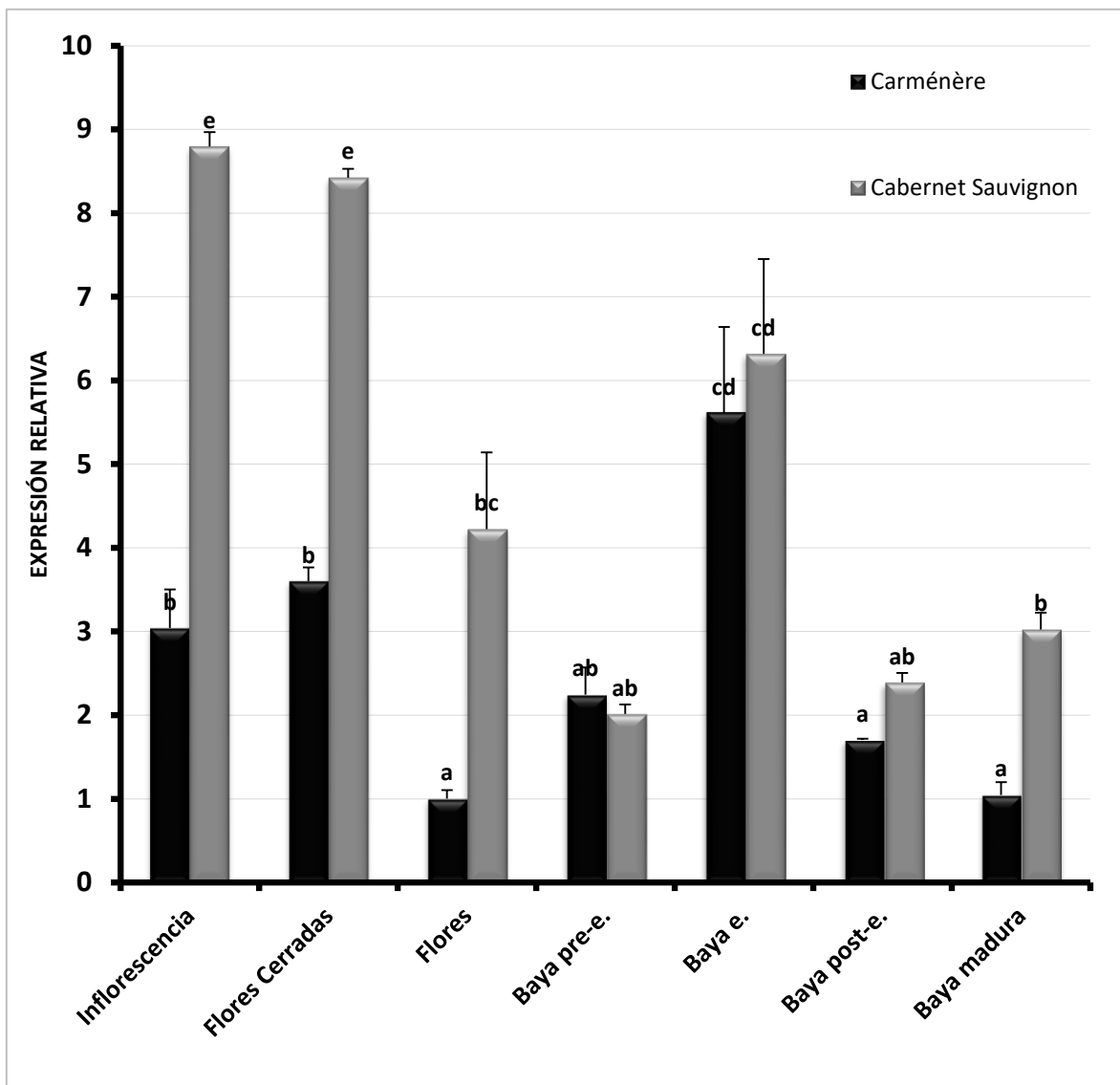
Con el objetivo de conocer los perfiles de expresión del gen *VvPSZ3* durante el desarrollo reproductivo en la vid, se analizó su actividad transcripcional mediante qRT-PCR en diferentes estadios del desarrollo floral/frutal de distintos cultivares de vid. A modo de comparación se realizó el análisis de expresión del gen *AtZAT4*, el homólogo más cercano a *VvPSZ3*, en diferentes tejidos de *A. thaliana*.

#### **3.2.1. El gen *VvPSZ3* presenta un patrón de expresión diferencial en los distintos órganos de la vid.**

La expresión relativa de *VvPSZ3* fue determinada mediante qRT-PCR en muestras obtenidas de diferentes órganos de plantas de vides del cultivar Carménère. La expresión en los tejidos provenientes de los diferentes órganos analizados fue comparada con el nivel de expresión registrada en raíces, al que se le asignó valor de expresión = 1. En tejidos vegetativos (hojas y zarcillos), se detectó una inducción en la expresión de este gen respecto de tejido radicular (5,6 y 3,6 veces, respectivamente; Fig. 6). Un aumento en el nivel de expresión fue observado al realizar similar análisis en tejidos florales. En relación con el valor de referencia en raíces, en inflorescencias y flores cerradas se registró una inducción de 8,1 y 9,6 veces, respectivamente, decayendo posteriormente en flores abiertas (Fig. 6). Una nueva inducción de la actividad transcripcional se observó durante el desarrollo de bayas, alcanzando su nivel máximo (14,9 veces) en bayas al estado de envero para disminuir en estadios posteriores del desarrollo frutal (Fig.6). El mismo patrón de expresión fue observado al analizar la actividad transcripcional de *VvPSZ3* en diferentes órganos del cultivar Cabernet Sauvignon. Sin embargo, los niveles de expresión relativa registrados en esta variedad son significativamente mayores a aquellos establecidos para el cultivar Carménère en tejidos florales (Fig. 7).



**Figura 6. Análisis de expresión de *VvPSZ3* en varios órganos de *Vitis vinifera* cv. Carménère por qPCR.** Hoja, estadio EL31; Inflorescencias, EL19 o flores inmaduras compactas; Flores cerradas, EL21; Flores, EL23 o flores con 50% de caída de pétalos; Baya pre-e., EL31 o estadio pre-verano; Baya e., EL35 o estadio de verano; Baya post e., EL36 o estadio post-verano; Baya m., EL38 o bayas con madurez de cosecha. La expresión en raíces fue ajustada a 1 como valor relativo. Los niveles de expresión de *VvPSZ3* fueron normalizados contra el de *VvUBQ*. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SD (n = 3). Letras distintas corresponden a diferencias significativas (prueba de Tukey p < 0,05).



**Figura 7. Comparación de los patrones de expresión de *VvPSZ3* en dos cultivares tradicionales de *Vitis vinifera*.** Inflorescencias, estadio EL19 o flores inmaduras compactas; Flores cerradas, EL21; Flores, EL23 o flores con 50% de caída de pétalos; Baya pre-e., EL31 o estadio pre-enero; Baya e., EL35 o estadio de enero; Baya post e., EL36 o estadio post-enero; Baya m., EL38 o bayas con madurez de cosecha. Las muestras de flores de Carménère fueron usadas como calibrador de valor 1 y la expresión fue normalizada contra el nivel de expresión de *VvUBQ*. e.: enero. Los datos representan el promedio  $\pm$  SD (n = 3). Letras distintas corresponden a diferencias significativas (prueba de Tukey  $p < 0,05$ ).

### **3.2.2. *VvPSZ3* es principalmente expresado en polen y en semillas**

La expresión de *VvPSZ3* fue analizada en mayor detalle en flores y frutos al estadio de pre-verano. El nivel transcripcional de este gen fue determinado tanto en flores completas y en polen aislado como en bayas completas y, separadamente, en piel pericarpio y semillas. Para efectos comparativos se asignó a la expresión detectada en flores completas un valor = 1. Los resultados obtenidos de este análisis indican que en flores, el gen *VvPSZ3*, posee una mayor expresión en polen aislado que en flores completas (4.1 veces). Del mismo modo en bayas en pre-verano la expresión del gen referido se localiza en semillas, alcanzando un nivel transcripcional 10,1 veces mayor que aquel detectado en flores completas, observándose un bajo nivel de expresión en pieles y pericarpio. Coherente con este resultado, las bayas semilladas poseen un nivel de expresión mayor que bayas partenocárpicas carentes de semillas (Fig.8).

### **3.2.3. La expresión de *VvPSZ3* en bayas de vides es fuertemente inducida en respuesta a tratamiento exógeno con ABA y SA**

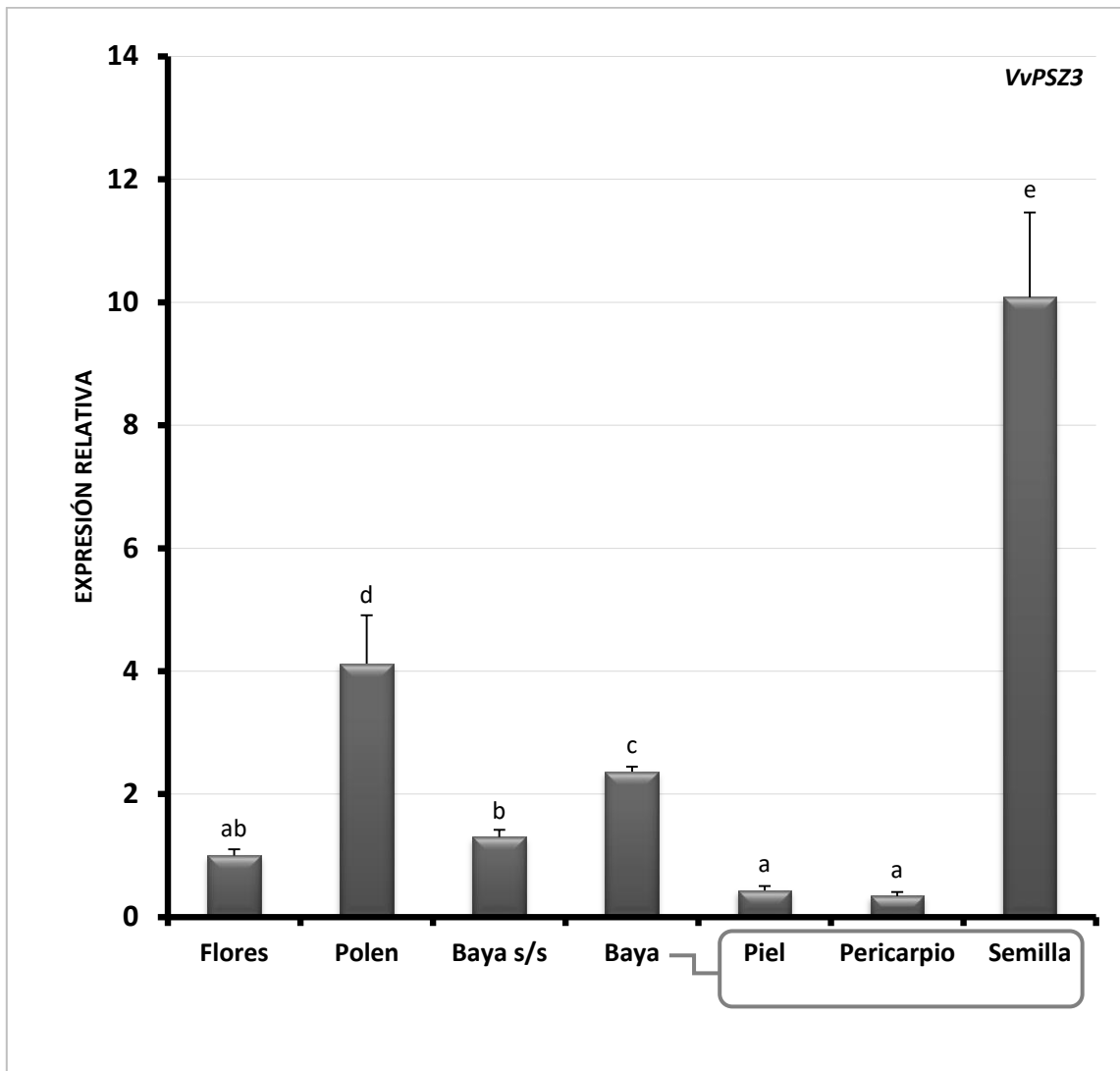
A fin de explorar los mecanismos y las vías de transducción de señales involucradas en la inducción de la expresión de *VvPSZ3* en frutos, se cuantificó la actividad transcripcional de este gen en bayas al estado de verano sometidas a tratamiento exógeno con diferentes hormonas y moléculas elicitoras. Al nivel de expresión detectada en las muestras control tratadas con H<sub>2</sub>O destilada se asignó valor de expresión = 1. De los compuestos ensayados, se estableció una fuerte inducción de la actividad transcripcional del gen en estudio en respuesta a ABA tanto a las 6 h (9,5 veces) como a las 24 h (19,4 veces) de tratamiento. Una fuerte inducción fue también observada en respuesta a SA tanto a las 6 h como a las 24 h de exposición (9,1 y 8,6 veces, respectivamente). Inducciones altas pero de menor magnitud a las referidas anteriormente se observaron en respuesta a tratamiento con sacarosa y NAA (4,5 -6 veces), en tanto que inducciones moderadas (2-3 veces) fueron registradas para BAP y



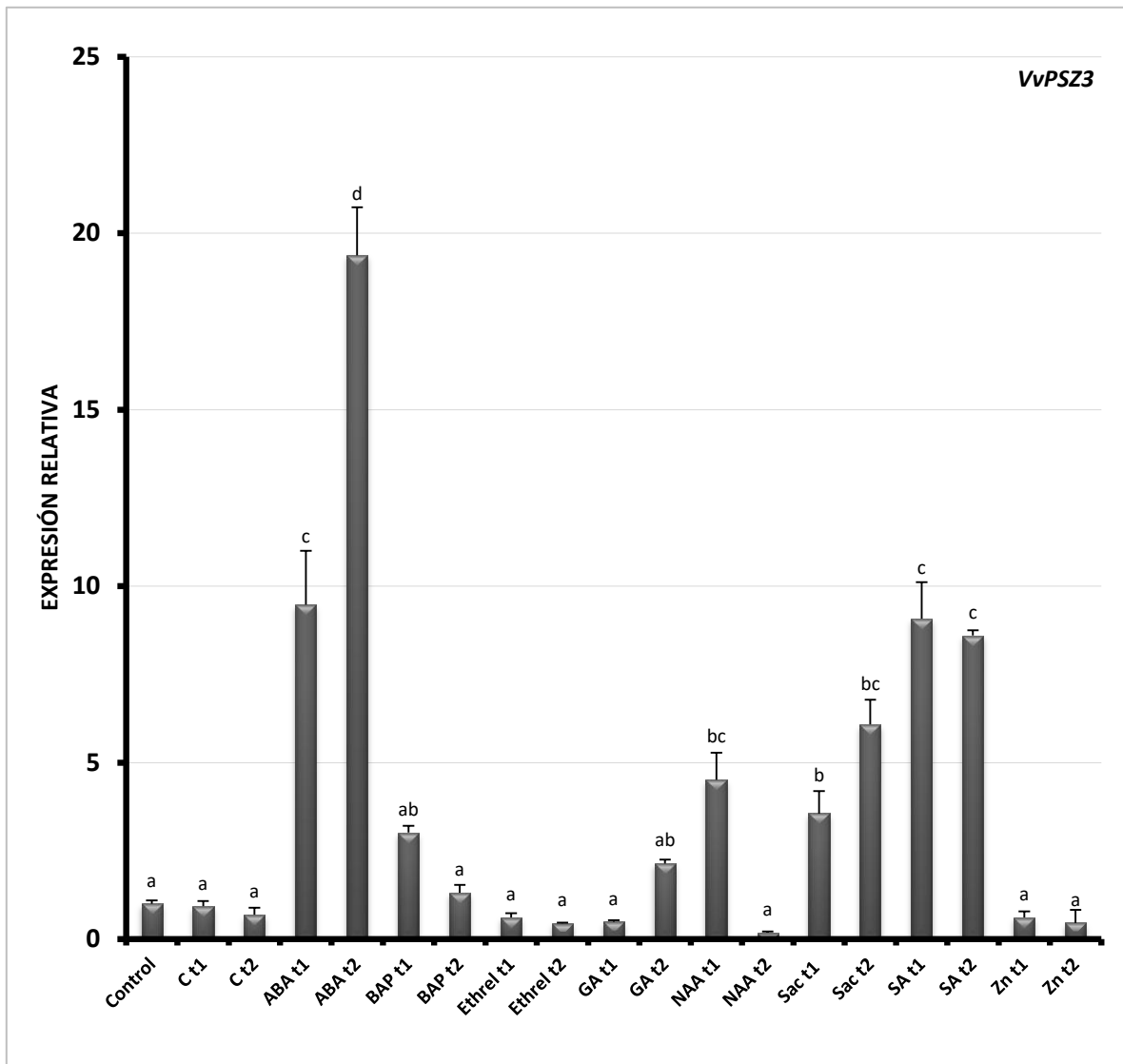
GA. Finalmente, tratamiento con Ethrel (producto que libera etileno en solución acuosa) y  $ZnCl_2$  no mostraron efecto sobre la expresión del gen *VvPSZ3* (Fig. 9).

#### **3.2.4. El patrón de expresión de *ZAT4* es similar al de *VvPSZ3***

La expresión de los genes homólogos más cercanos a *VvPSZ3*, *ZAT4* y *ZAT9* de *Arabidopsis thaliana* fue evaluada *in silico* mediante el software Arabidopsis eFP Browser (Winter et al., 2007) sobre datos obtenidos por hibridación de microarreglos contenidos en la base de datos “*The Bio-Array Resource for Plant Biology*” (<http://bar.utoronto.ca/>). De acuerdo a este análisis, tales genes son predominantemente expresados en tallos, flores, polen maduro y semillas de *Arabidopsis* (Fig. 10), patrón similar al detectado para *VvPSZ3*. Para validar tales resultados, las expresiones de *ZAT4* y *ZAT9* fueron evaluadas mediante qRT-PCR en diferentes tejidos de *A. thaliana*, incluyendo plántulas de cinco y diez días hasta tejidos vegetativos (raíz, hoja y tallo) y reproductivos (flores y silicuas). Los resultados obtenidos de este análisis indican que *ZAT4* muestra un nivel de expresión significativamente mayor que *ZAT9* en los tejidos analizados, registrando su mayor actividad transcripcional en tallos, flores y silicuas (Fig. 11).



**Figura 8. Comparación de los niveles de expresión de *VvPSZ3* en flores y polen y entre bayas de Carménère normales y sin semilla.** Pericarpio, piel y semillas fueron tomados de bayas normales. Las muestras de flores fueron usadas como calibrador de valor 1 y la expresión fue normalizada contra el nivel de expresión de *VvUBQ*. Los datos representan el promedio  $\pm$  SD (n = 3). Letras distintas corresponden a diferencias significativas (prueba de Tukey  $p < 0,05$ ).



**Figura 9. Expresión de VvPSZ3 en bayas tratadas con distintas moléculas elicitoras.** Control: bayas sin tratamiento (valor relativo 1); C: control H<sub>2</sub>O Tween 20; ABA: ácido abscísico; BAP: 6-bencilaminopurina; Ethrel, etefón 0,2%; GA: ácido giberélico; NAA: ácido naftalenacético; Sac: sacarosa; SA: ácido salicílico y Zn: ZnCl<sub>2</sub>. t1 y t2 corresponden a 6 y 24 horas de exposición, respectivamente. Los niveles de expresión de VvPSZ3 fueron normalizados contra los de VvRNA18S. Los datos representan el promedio ± SD (n = 3). Letras distintas corresponden a diferencias significativas (prueba de Tukey p < 0,05).

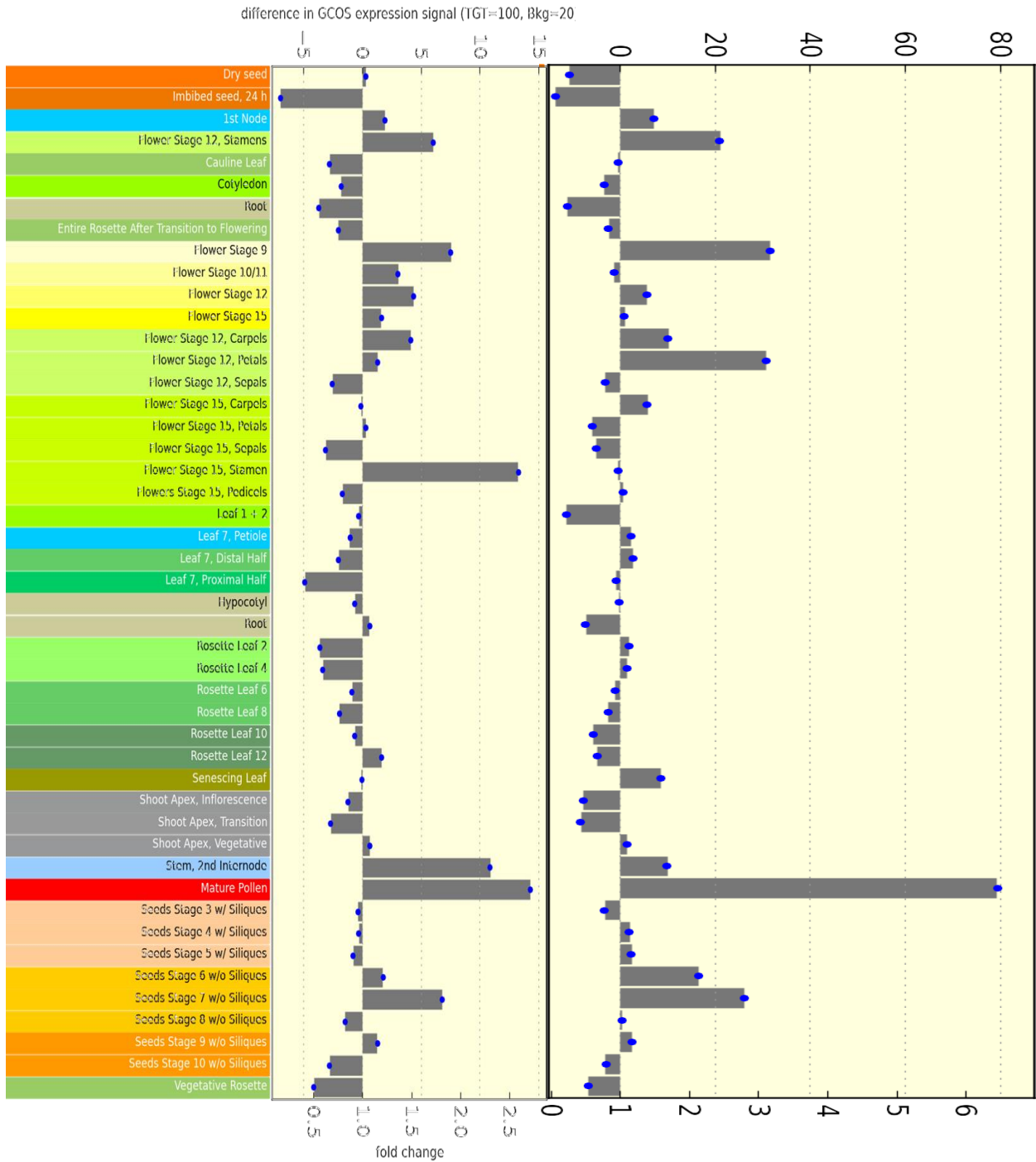
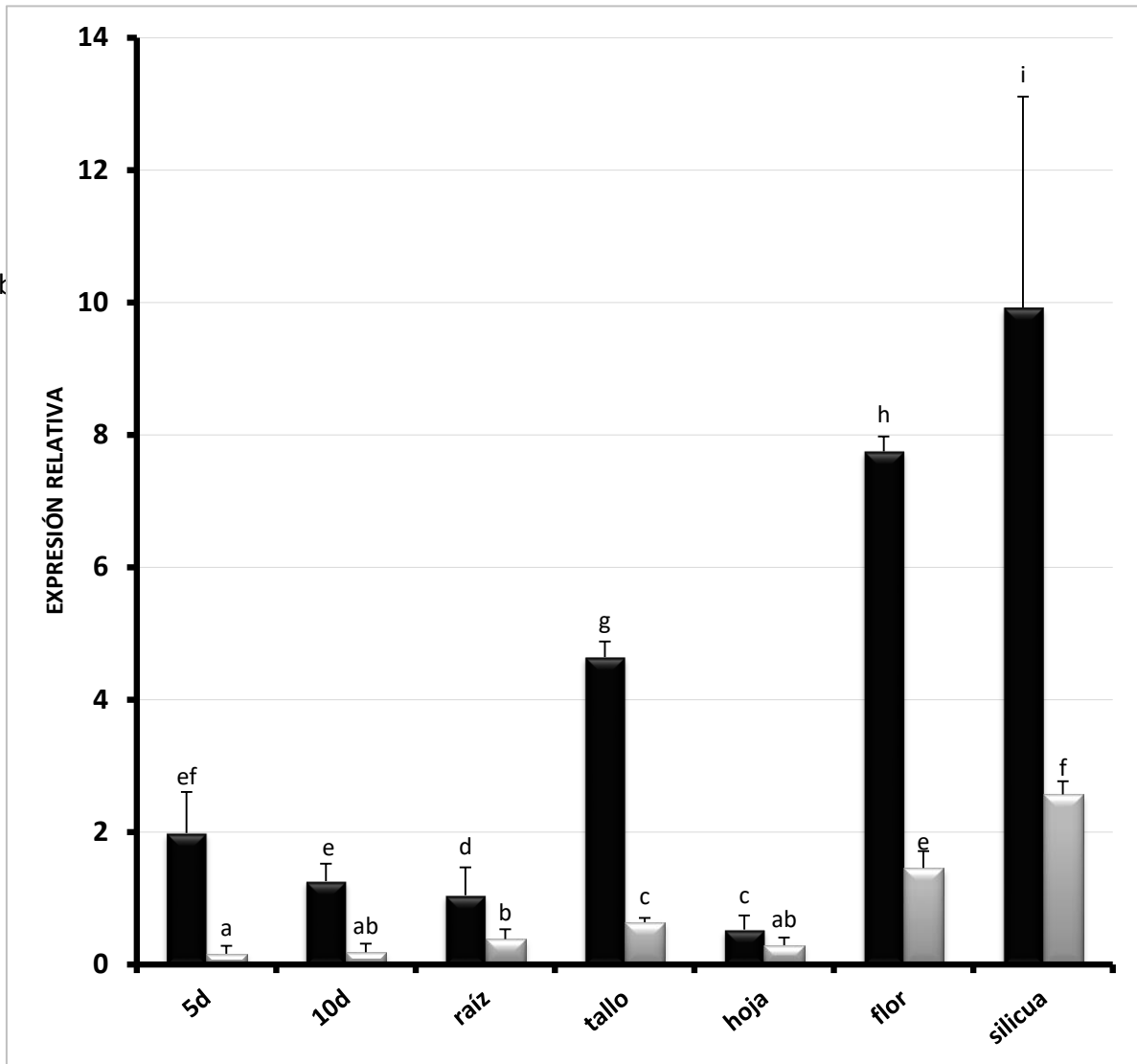


Figura 10. Expresiones de *AtZAT4* (izq.) y *AtZAT9* (der.) predichas con la herramienta Arabidopsis eFP Browser con datos provenientes de microarreglos.



**Figura 11. Análisis mediante qPCR de la expresión de *AtZAT4* (negro) y *AtZAT9* (gris) en diversos órganos de *A. thaliana*.** La expresión de *AtZAT4* en raíces fue ajustada a 1 como unidad relativa. La expresión de los genes de interés fue normalizada contra la expresión del gen F-box. 5d y 10d, plántulas de 5 y 10 días, respectivamente. El resto de las muestras fueron tomadas de plantas adultas. Los datos representan el promedio  $\pm$  SD (n = 3). Letras distintas corresponden a diferencias significativas (prueba de Tukey  $p < 0,05$ ).

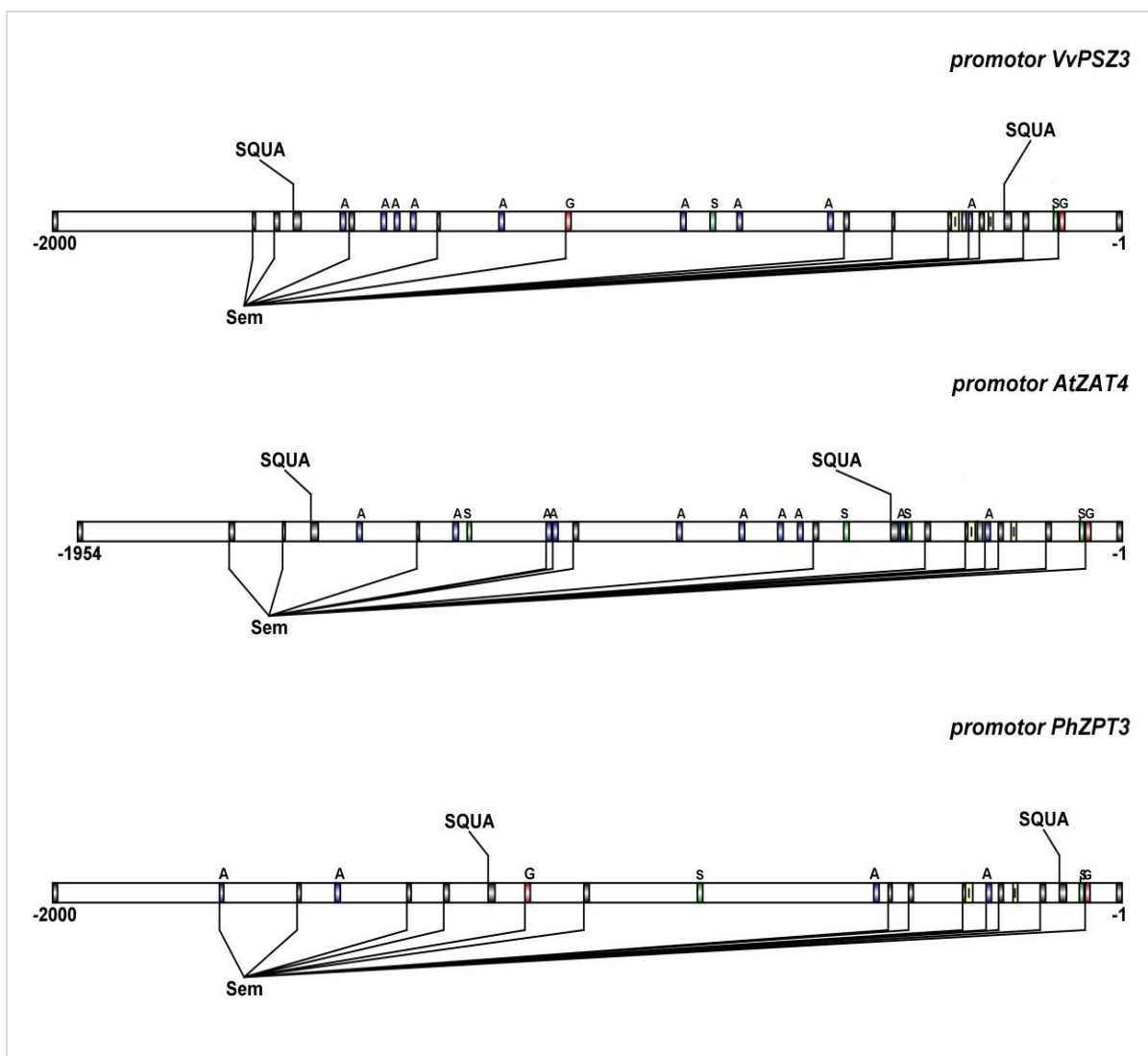
### **3.2.5 El perfil de expresión de los genes *VvPSZ3* y *ZAT4* es coherente con la presencia de putativos elementos regulatorios de sus respectivas regiones promotoras**

Para establecer si los perfiles transcripcionales establecidos para los genes *VvPSZ3* y *ZAT4* se correlacionan con la presencia de elementos regulatorios en la región promotora de tales genes, la región río arriba de ambos genes fue aislada, clonada y secuenciada. Tanto las secuencias nucleotídicas determinadas para ambos promotores como aquella descrita para el promotor del gen *PhZPT3-3* de petunia fueron analizadas *in silico* mediante los softwares CONSITE, que identifica sitios de unión para diferentes FTs, y PLACE que permite identificar elementos de respuesta a diferentes moléculas elicitoras. Los resultados de este análisis se muestran en las figuras 12 y 13. En los tres promotores analizados se identificó 2 putativos sitios de unión para FTs similares a SQUAMOSA/APETALA1, los que han sido asociados a la regulación del desarrollo floral en otras especies vegetales (Kaufmann et al., 2010; Fig. 12). Sitios de unión para otros FTs tales como HMG-I/Y (Klosterman et al., 2003), ATHB1 y ATHB5 (Aoyama et al., 1995; Johannesson et al., 2003), fueron también identificados. Del mismo modo, en la región promotora de los tres genes referidos se determinó la presencia de elementos de respuesta para diferentes compuestos elicitors entre los que se incluye a secuencias del tipo ABRE (ACGTG) y MYCRS (CANNTG), ambos de respuesta a ABA, así como elementos de respuesta a sacarosa (TGACTC) y ácido salicílico (GRWAAW). Este análisis permitió también la identificación de elementos específicos para expresión en semillas (AACA y ACGT; De Pater et al., 1994; Yoshihara et al., 1996), los que se encuentran repetidos múltiples veces en los tres promotores analizados (Fig. 12). La presencia de los elementos regulatorios descritos en el promotor de *VvPSZ3* es coherente con los perfiles de expresión establecidos para este gen tanto en lo que se refiere a diferentes órganos de la planta como en respuesta al tratamiento exógeno con moléculas elicitoras.

Una situación diferente se observó al analizar la presencia de diferentes elementos regulatorios asociados a la expresión polen-específica (G/AGAAA, CAAT, GTGG/A y TTTCT; Bate y Twell, 1998; Zhou et al., 2010). Secuencias de este tipo fueron identificados en los tres promotores analizados. Sin embargo, la organización de tales elementos no es similar en

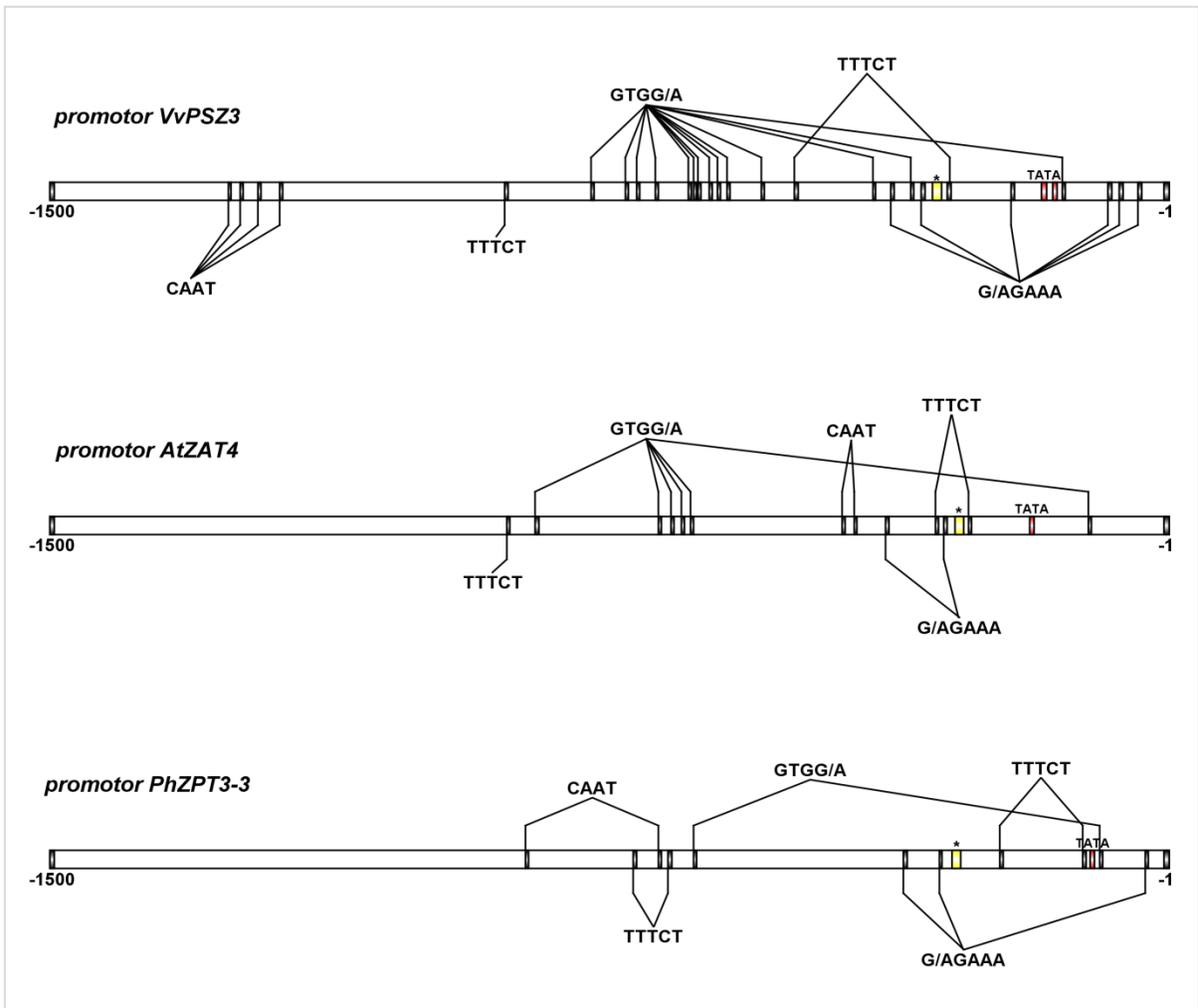
todos ellos (Fig. 13). Mientras que en los promotores de los genes *VvPSZ3* y *ZAT4* se observa un “cluster” que contiene varias repeticiones del elemento GTGG/A, el promotor de *PhZPT3-3* posee sólo dos elementos de respuesta de este tipo separados. Tal diferencia en la disposición de este elemento en particular podría explicar la diferencia de expresión entre los genes *VvPSZ3* y *ZAT4*, los cuales son fuertemente transcritos en polen, con su homólogo *PhZPT3-3*, el cual es expresado principalmente en tejidos reproductivos femeninos (Kubo et al, 2000).

Por otro lado, los alineamientos de las secuencias promotoras disponibles de los genes homólogos a *VvPSZ3* revelan, además, la presencia de una región conservada de 16 nucleótidos correspondiente a TCGCATGTTACATGTC, que para *VvPSZ3* se localiza 318 nucleótidos antes del sitio de inicio de la transcripción (Figs. 13 y 14). Dentro de esta secuencia solo es posible identificar a ATGTTACA, secuencia que posiblemente corresponda a un elemento en *cis* denominado “**TEIL binding site**” relacionado a desarrollo floral o patogénesis (tebs; Hibi et al. 2007; Wawrzynska et al., 2010).



**Figura 12.** Elementos en *cis* en la región “río arriba” de *VvPSZ3*, *AtZAT4* y *PhZPT3-3*. SQUA, posibles sitios de unión de SQUAMOSOSA/APETALA 1; Sem, elementos específicos de expresión en semilla, agrupados claramente en dos áreas; A, G y S, elementos de respuesta a ABA, GA y SA, respectivamente.





**Figura 13.** Elementos específicos de expresión en polen de *VvPSZ3*, *AtZAT4* y *PhZPT3-3*. Con \* en amarillo se destaca la zona conservada de 16 nucleótidos no identificada completamente. La caja TATA se señala en rojo.



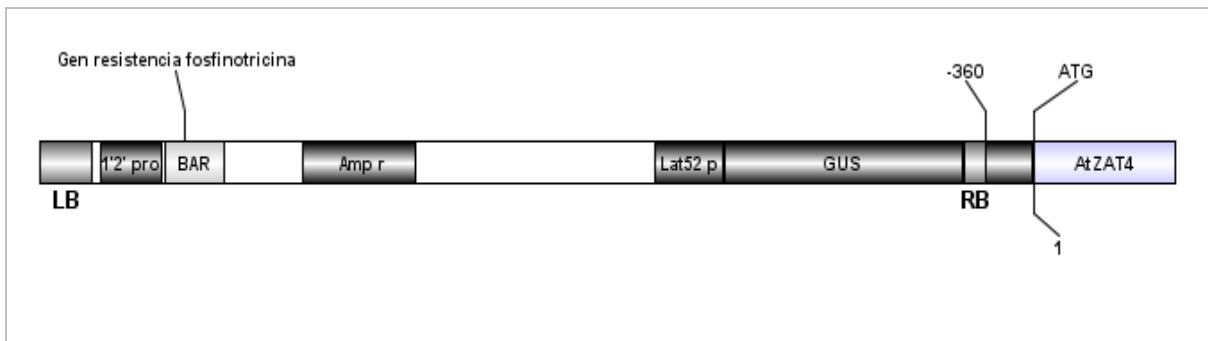
Figura 14. Alinamiento de la secuencia nucleotídica de la región promotora de *VvPSZ3* y sus homólogos en *P. hybrida* y *A. thaliana*. La figura muestra la zona entre -64 y -323 del promotor de *VvPSZ3*. En el recuadro el elemento “tebs”. Los bloques conservados corresponden a elementos relacionados a la respuesta a ABA y a un FT del tipo MADS (-126) señalados en las figuras 12 y 13. Se incluye la secuencia promotora de *PhZPT2-10* (Kubo et al., 2000).

### 3.3. ZAT4 ES DE VITAL IMPORTANCIA PARA EL DESARROLLO DE *A. thaliana*

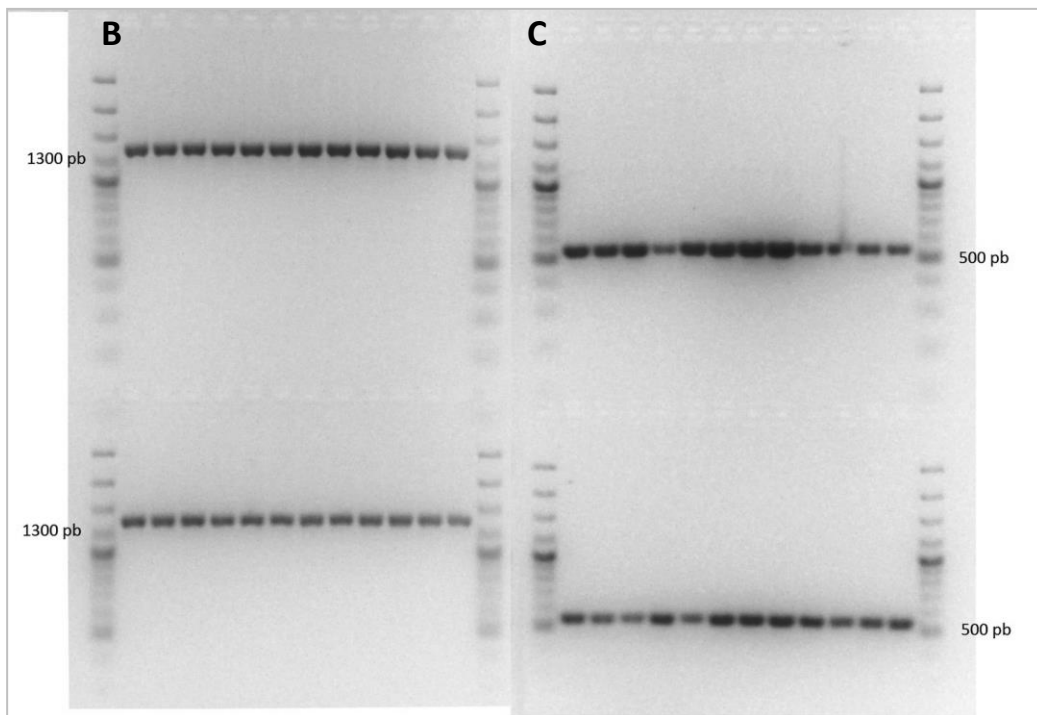
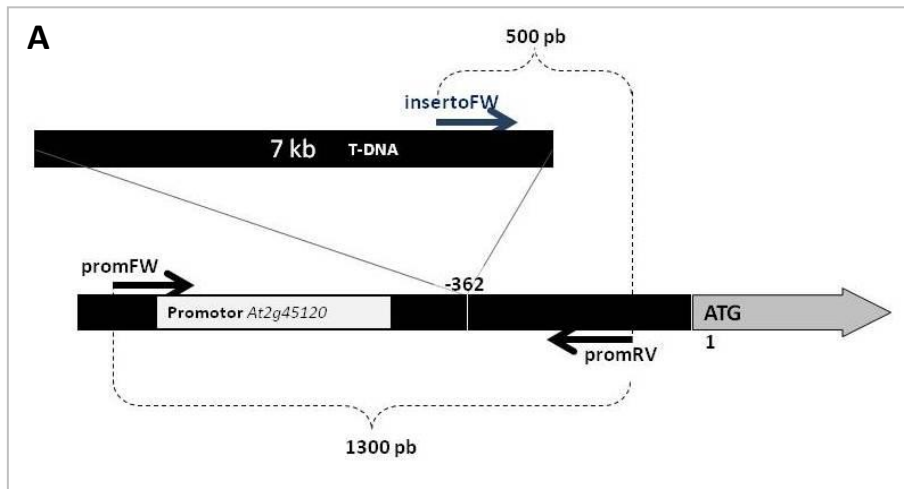
Para establecer el rol funcional que el gen *VvPSZ3* posee durante el desarrollo de *Vitis vinifera*, la estrategia más adecuada involucra la generación de plantas de vid transgénicas mediante transformación con una construcción genética que permita silenciar la expresión del gen referido y posteriormente evaluar el impacto de este silenciamiento sobre el fenotipo de tales plantas. Ello no es fácilmente realizable en la especie *Vitis vinifera* debido tanto a la baja eficiencia de las técnicas de transformación para esta especie desarrolladas a la fecha como a la larga duración de la fase juvenil en la vid que no permitiría obtener tejidos reproductivos requeridos para la evaluación fenotípica en menos de 4-5 años. En consecuencia, como una alternativa para abordar este análisis, se decidió emplear la especie modelo *A. thaliana*, sobre la base que, tomados en su conjunto, los resultados descritos en 3.2, sugieren que *VvPSZ3* y *ZAT4* son putativos ortólogos y podrían cumplir roles similares durante el desarrollo reproductivo en sus respectivas especies de origen. Se utilizó la línea de *A. thaliana* CS841944, mutante por inserción de ADN-T en la región promotora de *ZAT4* (Fig. 15). Una tasa de supervivencia de 48,9% fue observada en medio de selección y las plántulas sobrevivientes fueron genotipadas para determinar la presencia tanto del alelo tipo silvestre como del alelo que contiene la inserción de ADN-T. El total de plantas analizadas (n=24) registró la presencia de ambos alelos simultáneamente (Fig. 16), indicando que ellas corresponden a heterocigotos. La ausencia de plantas homocigotas para el alelo que contiene la inserción, sugiere que tal genotipo no es viable.

La expresión del gen *AtZAT4* en diferentes estadios de desarrollo de plantas heterocigotas de la línea CS841944 fue determinada y comparada con la establecida para plantas de *A. thaliana* Col-3 (tipo silvestre). Si bien ambas líneas expresan el gen referido, diferencias en nivel de expresión fueron registradas en flores y silicuas de plantas adultas donde la actividad transcripcional de *ZAT4* fue significativamente mayor en Col-3 que en CS841944 (Fig. 17). Del mismo modo fueron evaluados diferentes parámetros fenotípicos que permiten estimar el desarrollo vegetativo y reproductivo de la planta. Cuando las plantas crecieron bajo condiciones de día largo, no se detectó diferencias significativas entre la línea

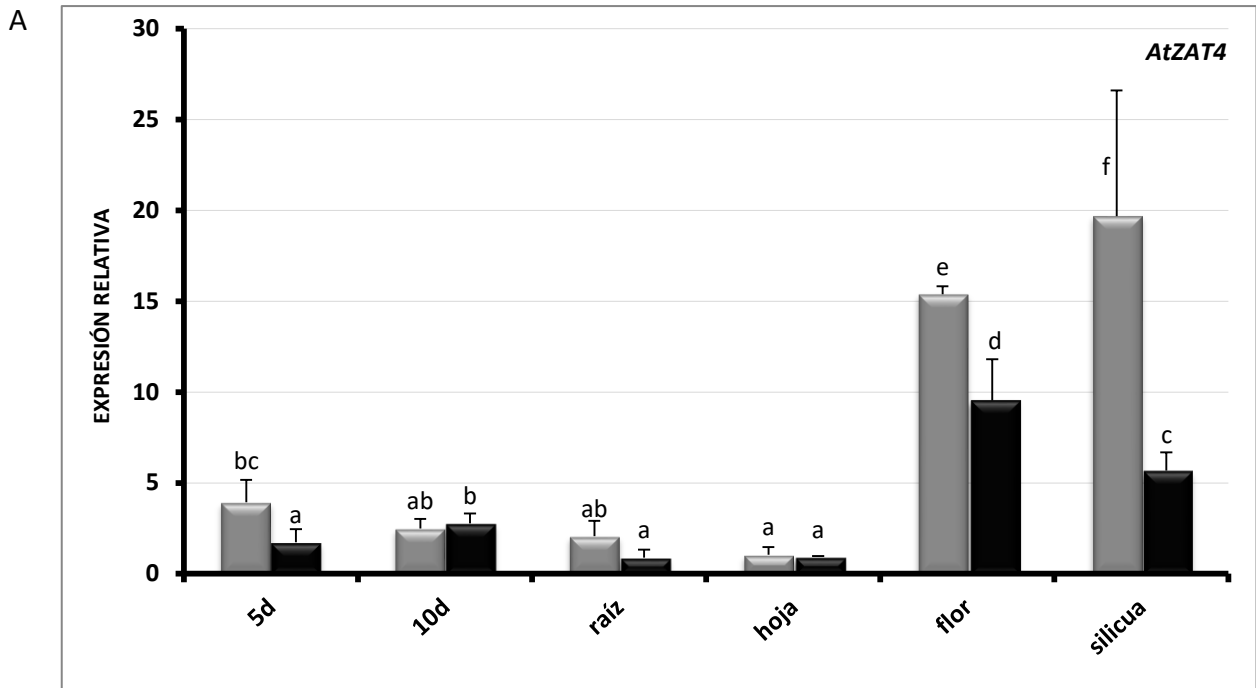
mutante y Col-3 en los parámetros medidos, con la excepción del desarrollo de semillas, registrando la línea CS841944 un menor número de semillas por silicua (Tabla 3).



**Figura 15. Representación esquemática proporcional de la inserción de ADN-T dentro del genoma de *A. thaliana* y dentro de la secuencia promotora de *ZAT4*.** El ADN-T corresponde al vector pCSA110, que lleva gen de resistencia a fosfotricina (BASTA; comandado por promotor 1'2'), gen de resistencia a ampicilina y gen marcador GUS (comandado por promotor Lat52). RB y LB, borde derecho e izquierdo del ADN-T, respectivamente. Base 1 marca el inicio de la región codificante.



**Figura 16. Productos de PCR para el promotor de ZAT4 y el inserto del ADN-T dentro del promotor.** La figura señala el lugar de inserción del ADN-T y los sitios de unión para los partidores usados para verificar la inserción. Los geles muestran los productos obtenidos en las reacciones de PCR sobre cada una de las 24 muestras de ADN de plantas de *A. thaliana*, amplificando en todos los casos el producto del promotor sin interrumpir (cerca de 1300 pb) y el producto que permitía detectar la presencia del inserto de ADN-T (alrededor de 500 pb).



**Figura 17. Análisis por qPCR de la expresión de *AtZAT4* en diversos órganos de *A. thaliana*, tanto sobre el tipo silvestre (gris) como en plantas *zat4* (negro).** La expresión en hojas tipo silvestre fue ajustada a 1 como unidad relativa. La expresión de los genes fue normalizada contra la expresión del gen F-box. 5d y 10d, plántulas de 5 y 10 días, respectivamente. El resto de las muestras fueron tomadas de plantas adultas. Los datos representan el promedio  $\pm$  SD (n = 3). Letras distintas corresponden a diferencias significativas (prueba de Tukey  $p < 0,05$ ).

**Tabla 3. Comparación entre CS841944 y tipo silvestre de plantas de *A. thaliana* crecidas bajo condición de día largo.** Los promedios de la línea mutante y del tipo silvestre no tienen diferencias significativas de acuerdo a prueba T ( $p < 0.05$ ) a excepción del número de semillas por silicua.

Comparación de características fenotípicas del WT y CS841944				
	WT		<i>AtZAT4 (+/-)</i>	
	Prom	Desv	Prom	Desv
<b>1 RITMO DEL DESARROLLO:</b>				
Emisión de escapo (días)	>19		>20	
Madurez del eje principal	>53		>53	
<b>2 MORFOLOGÍA DE LA ROSETA</b>				
Hojas de roseta a madurez sexual	36	6,8	34	6,7
Diámetro de roseta a madurez sexual (cm)	8,6	0,6	7,8	0,6
Diám. roseta a madurez del eje principal (cm)	9,1	1	8,8	0,8
<b>3 ARQUITECTURA DE LA INFLORESCENCIA</b>				
Altura del eje principal (cm)	44	3	44	3,2
Frutos de la inflorescencia principal	104	22	115	12
Meristema secundario no elongado	0,2	0,3	0	0
Ejes elongados	7,6	1,4	6,9	1,8
<b>4 APTITUD REPRODUCTIVA</b>				
Flores precoces(7 días de emitido el escapo)	6,8	1,5	6	0,9
Número de semillas por fruto	50	4,6	39	8,3

### 3.4. EL GEN REPRESENTADO POR EL EST VVCCGS2117F10.b CODIFICARÍA UNA PROTEÍNA CON FUNCIÓN RECEPTOR QUINASA DEL TIPO LRR\_RLK

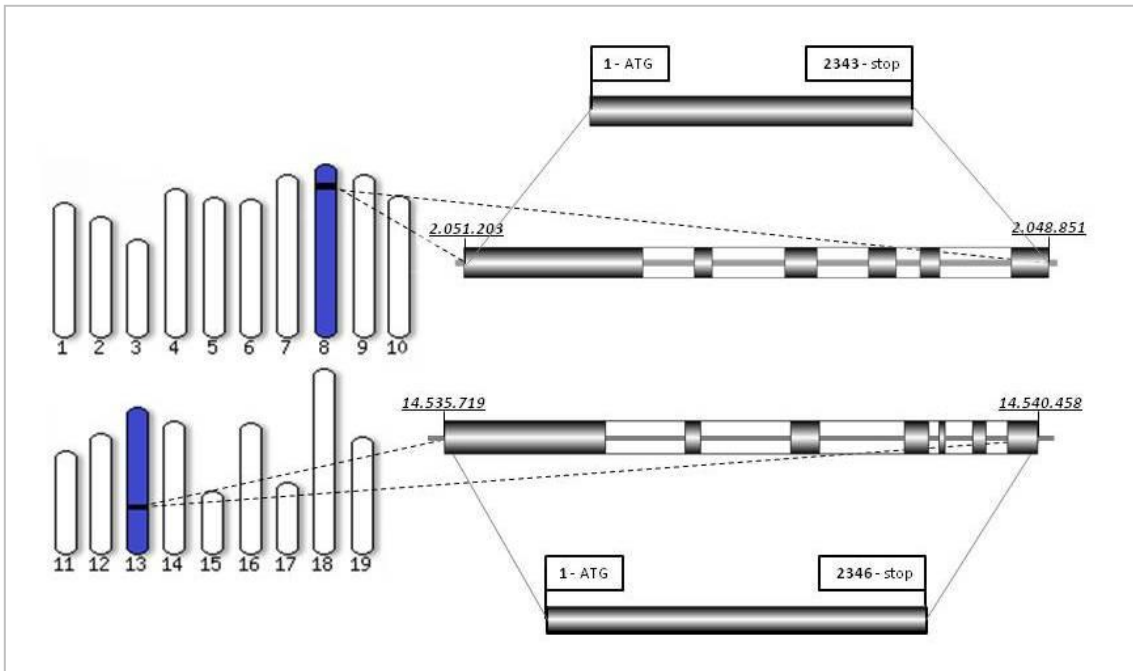
#### 3.4.1. Aislamiento y secuenciación del gen representado por el EST VVCCGS2117F10.b

Como se ha indicado anteriormente en la sección 3.1, el análisis transcriptómico comparativo entre bayas no semilladas y semilladas permitió identificar genes diferencialmente expresados en ambos tipos de frutos. Entre ellos, se estableció que el gen representado por el EST VVCCGS2117F10.b presentó la mayor tasa de represión en bayas no semilladas (91.1 veces). Un primer análisis a través del algoritmo BLAST señaló que este gen posee homología con el gen *At3g03770* de *A. thaliana*, el cual codifica para una proteína hipotética en esta especie (Tabla 1). Dado que VVCCGS2117F10.b corresponde a un fragmento del gen que representa, su secuencia nucleotídica fue utilizada para detectar el gen completo en la base de datos que contiene la secuencia del genoma de la vid ([www.genoscope.cns.fr](http://www.genoscope.cns.fr)) mediante el algoritmo BLAST. Dos genes putativos fueron identificados mediante este análisis, los que se localizan sobre los cromosomas 13 y 8.

A partir de las secuencias nucleotídicas obtenidas de la base de datos, se diseñaron partidores para aislar los genes de largo completo (tabla 2) mediante PCR sobre ADNc sintetizado a partir de ARNm de flores de *Vitis vinifera* Cv. Carménère. Al utilizar los partidores diseñados para el gen localizado en el cromosoma 13, el producto obtenido de esta reacción correspondió a un amplicón de 2346 pb, el cual fue clonado en el vector pGEM-T y posteriormente secuenciado por cuadruplicado. La secuencia nucleotídica del ADNc fue comparada con la secuencia genómica disponible en la base de datos GENOSCOPE, estableciéndose que el gen respectivo posee un tamaño de 5008 pb y está constituido por siete exones (Fig. 18). En base a los resultados obtenidos al analizar el perfil transcripcional de este gen (descritos posteriormente en la sección 3.5) el gen referido se denominó **VvFSK** (*Vitis vinifera* **F**LOWER **A**ND **S**EED **R**ECEPTOR **K**INASE). Similar procedimiento fue realizado utilizando los partidores diseñados para amplificar y aislar el gen localizado en el cromosoma 8, obteniéndose un amplicón de 2343 pb en tanto que la secuencia genómica posee un



tamaño de 4365 pb y consta de 6 exones (Fig.18). En base a los resultados obtenidos al analizar el perfil transcripcional de este gen (descritos posteriormente en la sección 3.5) este gen se denominó *VvFTK* (*Vitis vinifera* FLOWER AND TENDRIL RECEPTOR KINASE).



**Figura 18. Genes *VvFSK* (abajo) y *VvFTK* (arriba) aislados desde *Vitis vinifera*.** Cariotipo de la especie señalando ubicación de los genes en los cromosomas 8 y 13, respectivamente. Se señala la estructura genómica y longitud de la secuencia codificante.

### 3.4.2. El análisis *in silico* de los genes *VvFSK* y *VvFTK* indica que codifican para receptores quinzasas, filogenéticamente relacionadas con *ScORK17 (Solanum chacoense OVULE RECEPTOR KINASE 17)*

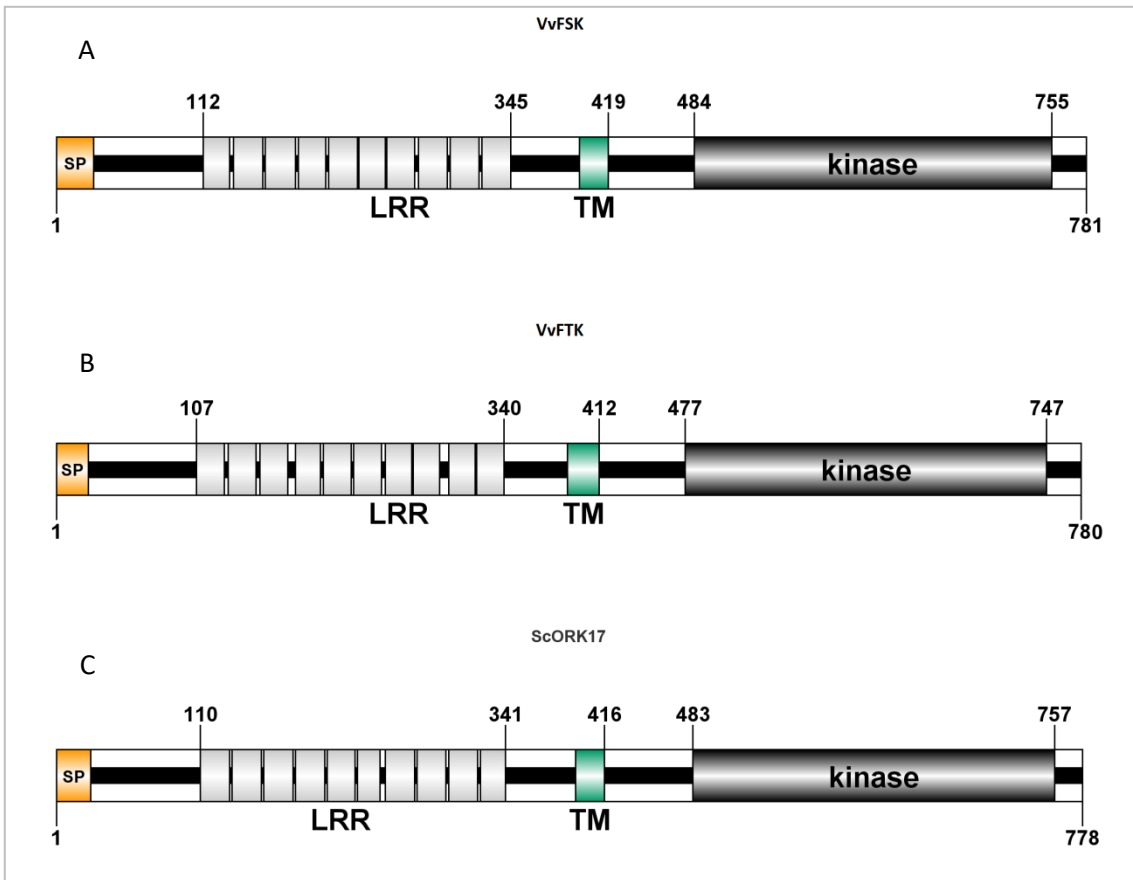
La traducción *in silico* de la secuencia nucleotídica del gen *VvFSK* indica que este codificaría una proteína de 781 aa con una masa molecular calculada de 86,22 kDa. Del mismo modo el gen *VvFTK* codifica para una proteína de 780 aa y 86,41 kDa. Ambas secuencias aminoácidas fueron analizadas mediante el software **LRR Finder** detectándose la presencia de un motivo estructural de 10 repeticiones ricas en leucina (LRR) hacia su extremo amino terminal (residuos 112 al 345 en *VvFSK*; residuos 107 a 340 en *VvFTK*). Del mismo modo, un dominio transmembrana fue identificado en ambas proteínas mediante los software **Phobius** y **TMHMM** (residuos 397 al 419 en *VvFSK*; residuos 390 a 416 en *VvFTK*). Un análisis con **InterProScan**, **SMART** y **Scansite 2.0** permite reconocer un motivo conservado serina/treonina/tirosina quinasa (residuos 483 a 757 en *VvFSK* y 477 a 747 en *VvFTK*) mientras que **SignalP 3.0** arrojó la presencia de un putativo péptido señal entre los residuos 1 a 29 en *VvFSK* y 1 a 25 en *VvFTK* (Fig. 19). Un análisis posterior realizado con los softwares **SherLoc**, **CELLO** y **Wolf PSORT II** sugiere que tales proteínas, al igual que sus homologas *ScORK17 At3g03770s* también incluidas en este análisis, se localizan en la membrana plasmática (Tabla 4). Tomados en su conjunto, el análisis *in silico* sugiere que las proteínas codificadas por los genes *VvFSK* y *VvFTK* poseen una estructura y dominios característicos de receptores quinzasas (Fig. 19).

Se construyó un árbol filogenético usando las secuencias proteicas para diferentes putativos receptores quinzasas disponibles en las bases de datos Genbank, Genoscope y SOL Genomics identificados mediante BLAST (Fig. 20). Tal análisis muestra que las proteínas de vid en estudio agrupan en diferentes clados. *VvFSK* está más relacionada con el receptor quinasa *ScORK17* de *Solanum chacoense*, en tanto que *VvFTK* muestra mayor cercanía con la proteína codificada por el gen *At3g03770* de *A. thaliana* (Fig. 21). Un análisis mediante alineamiento múltiple de las secuencias aminoácidas de los putativos receptores quinzasas

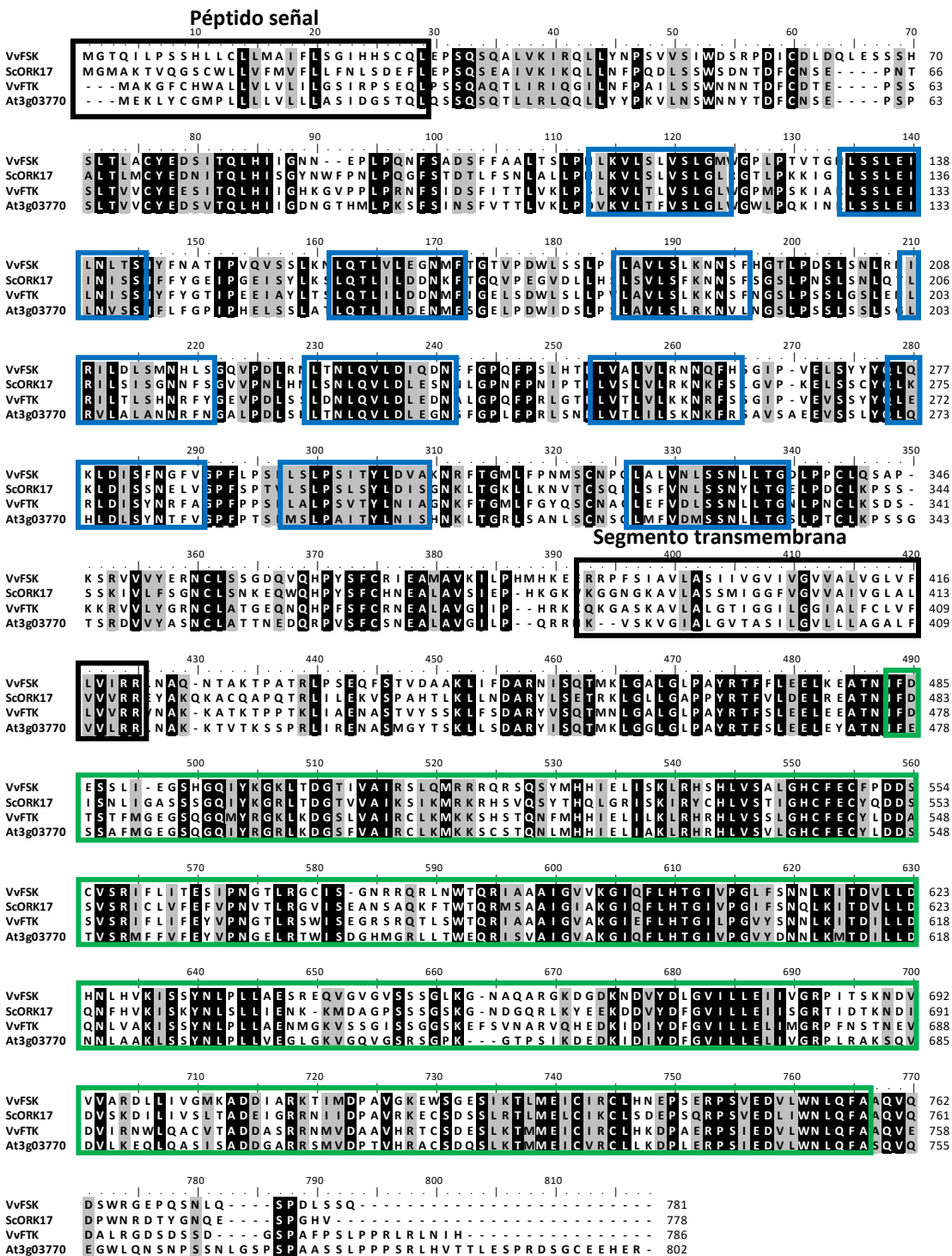
de vid y su más cercanos homólogos, reveló que VvFSK posee un 57% de identidad con ScORK17 y un 55% con la proteína codificada por el gen *At3g03770* de *A. thaliana*. Por su parte, VvFTK posee un 55,8% y un 65,1% de identidad con ScORK17 y con *At3g03770*, respectivamente. Los dominios característicos de este tipo de receptores (LRR y dominio quinasa) se encuentran conservados en las proteínas mencionada (Fig20).

**Tabla 4. Localización subcelular de acuerdo a predicciones *in silico* con SherLoc, CELLO y Wolf PSORT-II.** MP, membrana plasmática; E, extracelular; MV, membrana vacuolar; RE, retículo endoplasmático; G, aparato de Golgi; N, núcleo; C, citoplasma. Los números indican puntaje otorgado por el software, siendo mayor el que corresponde a la mayor probabilidad de ocurrencia.

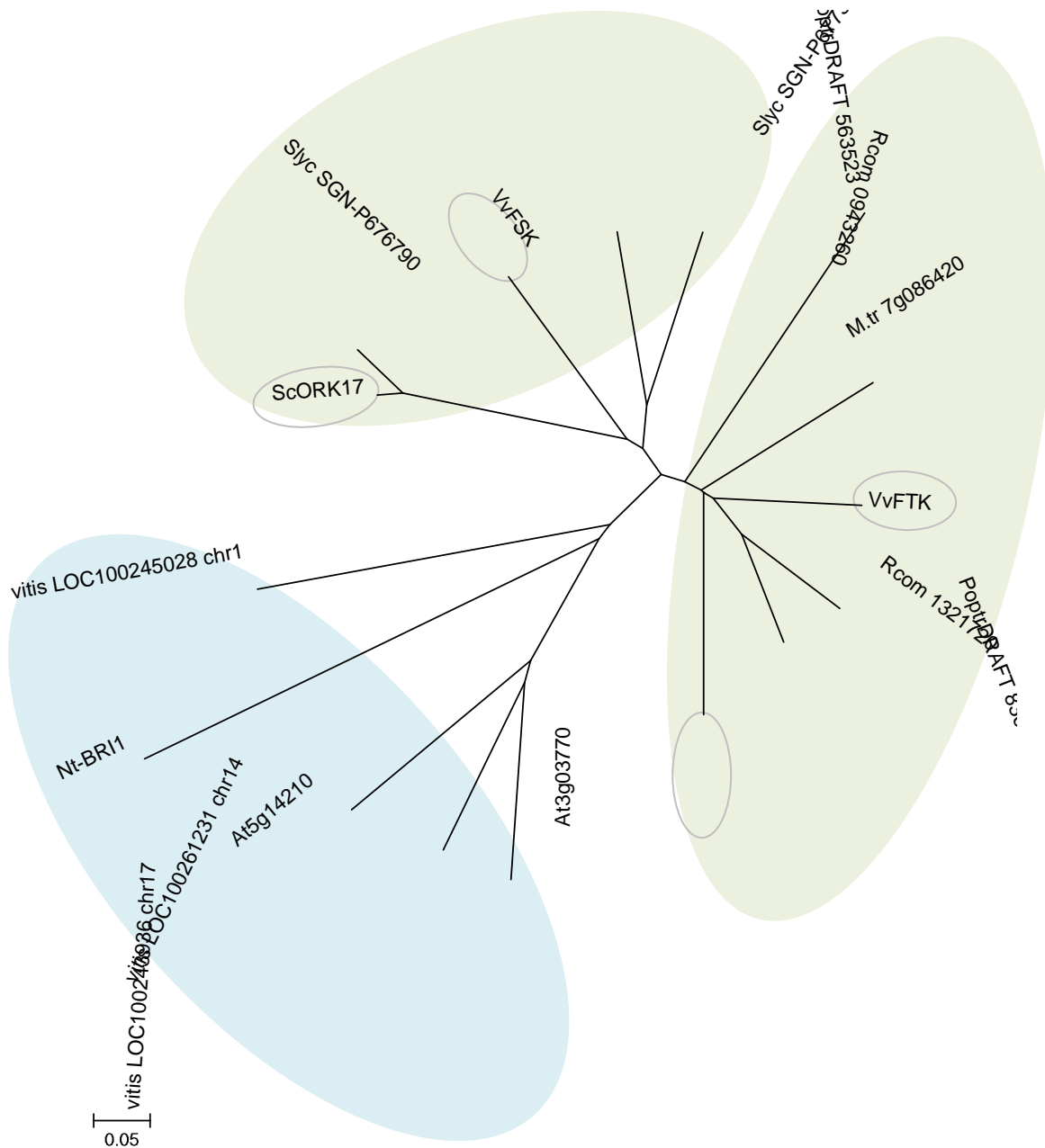
	VvSLK1		VvSLK2		ScORK17		At3g03770	
SherLoc	MP	0,64	MP	0,88	MP	0,72	E	0,45
	E	0,27	E	0,09	E	0,16	MP	0,42
	G	0,03	G	0,01	MV	0,05	MV	0,05
CELLO	MP	3,13	MP	3,82	N	1,75	MP	2,32
	E	0,67	E	0,36	MP	1,24	N	0,91
	N	0,48	N	0,23	C	0,69	C	0,18
Wolf PSORT-II	MV	4	MV	6	MP	4	MP	9
	RE	3	MP	3	N	3	G	6
	MP	2	N	2	E	2	MV	2



**Figura 19.** Representación esquemática de los dominios protéicos con motivos y sitios funcionales de VvFSK (A), VvFTK (B) y ScORK de *Solanum chacoense* (C). Los números indican las posiciones de los aminoácidos. Los esquemas se construyeron con el software DOG 2.0 (Ren et al., 2009) en base a la información obtenida con LRRfinder, TopPred, TMHMM, SMART, Scansite 2.0 y Phobius.



**Figura 20. Comparación de la secuencia aminoacídica de VvFSK con VvFTK, ScORK17 y At3g03770.** En azul, repeticiones ricas en leucina. En verde, dominio quinasa. El alineamiento fue realizado con algunas de las secuencias con mayor identidad presentes en plantas. Los residuos aminoacídicos idénticos se muestran ennegrecidos.



**Figura 21. Relaciones filogenéticas entre VvFSK y proteínas similares encontradas en otras especies de plantas.** El análisis filogenético se realizó en utilizando MEGA 4.0 en base a alineamiento múltiple generado con programa ClustalW. Se asume que el largo de las ramas proporcional a las distancias filogenéticas. Las secuencias aminoacídicas distintas a VvFSK fueron obtenidas desde las bases de datos Genebank, Genoscope y SOL Genomics. El nombre de la secuencia indica el nombre del género o la especie. Syc, corresponde a *Solanum lycopersicum*, At a *A. thaliana* y Sc a *Solanum chacoense*.

### 3.5. ANÁLISIS DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES *VvFSK* y *VvFTK*

#### 3.5.1. *VvFSK* y *VvFTK* se expresan diferencialmente en los distintos tejidos de la vid

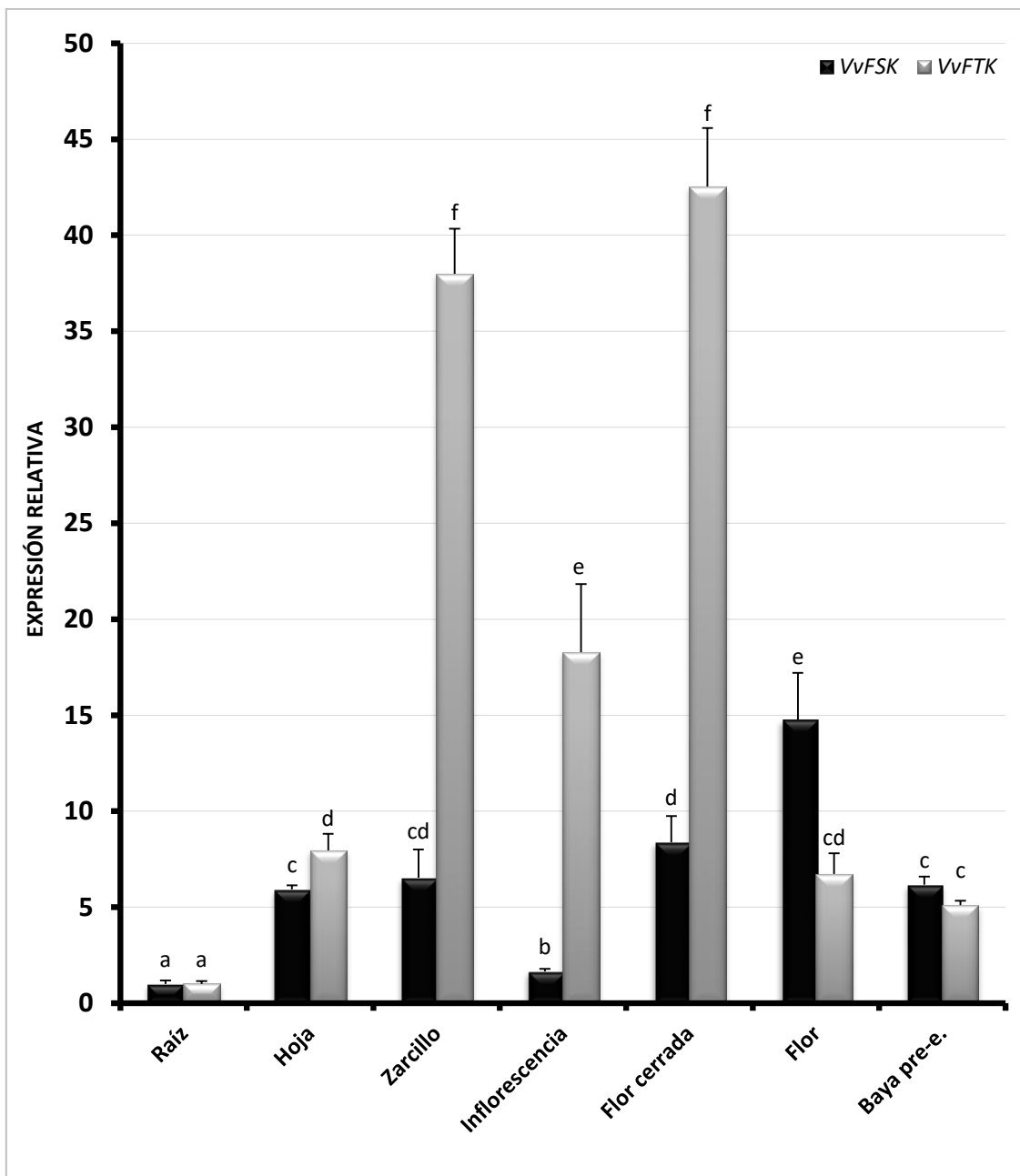
Para tener un acercamiento a la función de *VvFSK* y *VvFTK*, se determinó sus respectivos patrones de expresión en tejidos vegetativos y reproductivos de vid mediante qPCR. La expresión de dichos genes en los tejidos de los órganos analizados fue comparada con el nivel de expresión registrada en raíces, al que se le asignó valor de expresión = 1 (Fig. 22). La actividad transcripcional de *VvFSK* registró una inducción similar en hojas y zarcillos respecto de tejido radicular (5,9 y 6,5 veces, respectivamente). Al realizar similar análisis en tejido reproductivo floral, se observó un aumento en la expresión de este gen en paralelo con el avance del proceso de desarrollo floral. Así, en relación con el valor de referencia en raíces, en inflorescencias la expresión registra un incremento de 3,2 veces, seguido de una fuerte inducción de 8,3 veces en flores cerradas y una inducción aún mayor en flores en anthesis (14,7 veces). Durante el desarrollo de bayas, se registró 6,1 veces más expresión en bayas al estado de pre-envero que en raíces. Por su parte para *VvFTK*, se detectó un aumento significativo en su expresión en hojas respecto de tejido radicular (7,9 veces). Sin embargo, a diferencia de *VvFSK*, se registró una fuerte inducción en zarcillos (un tejido de soporte de origen floral) y en inflorescencias (39 y 18.3 veces, respectivamente). También se estableció diferencias en el perfil de expresión del gen en flores cerradas y flores en anthesis, alcanzando *VvFTK* su mayor nivel de inducción en flores cerradas (42,5 veces). Un patrón de expresión distinto fue observado al analizar la actividad transcripcional de *VvFSK* en diferentes órganos del cultivar Cabernet Sauvignon, teniendo este último cultivar una fuerte inducción del gen en tejido frutal. Además, es notable la mayor la expresión relativa del gen en esta última variedad a través del desarrollo floral y frutal (Fig. 23). Por su parte, el gen *VvFTK* también presenta diferencias entre los patrones de expresión del gen en ambos cultivares, sin embargo, la ausencia de datos de tejido frutal no permite una visualización completa de dichos patrones (Fig. 24).

La expresión tejido específica de ambos genes fue analizada en mayor detalle, tanto en flores completas en antesis y en polen aislado como en bayas completas y, separadamente, en piel pericarpio y semillas (Fig. 25). Para efectos comparativos, en este caso se asignó a la expresión detectada en bayas al estado de pre-verano un valor = 1. Los resultados obtenidos de este análisis indican que en flores, el gen *VvFSK*, posee una mayor expresión en flores completas que en polen aislado (3,5 veces). Del mismo modo en bayas en pre-verano la expresión del gen referido se localiza en semillas, alcanzando un nivel transcripcional 8,4 veces mayor que aquel detectado en bayas completas, sin expresión detectable en pieles y pericarpio. Acorde con esto, en las bayas semilladas *VvFSK* poseen un nivel de expresión mayor que en bayas partenocárpicas carentes de semillas.

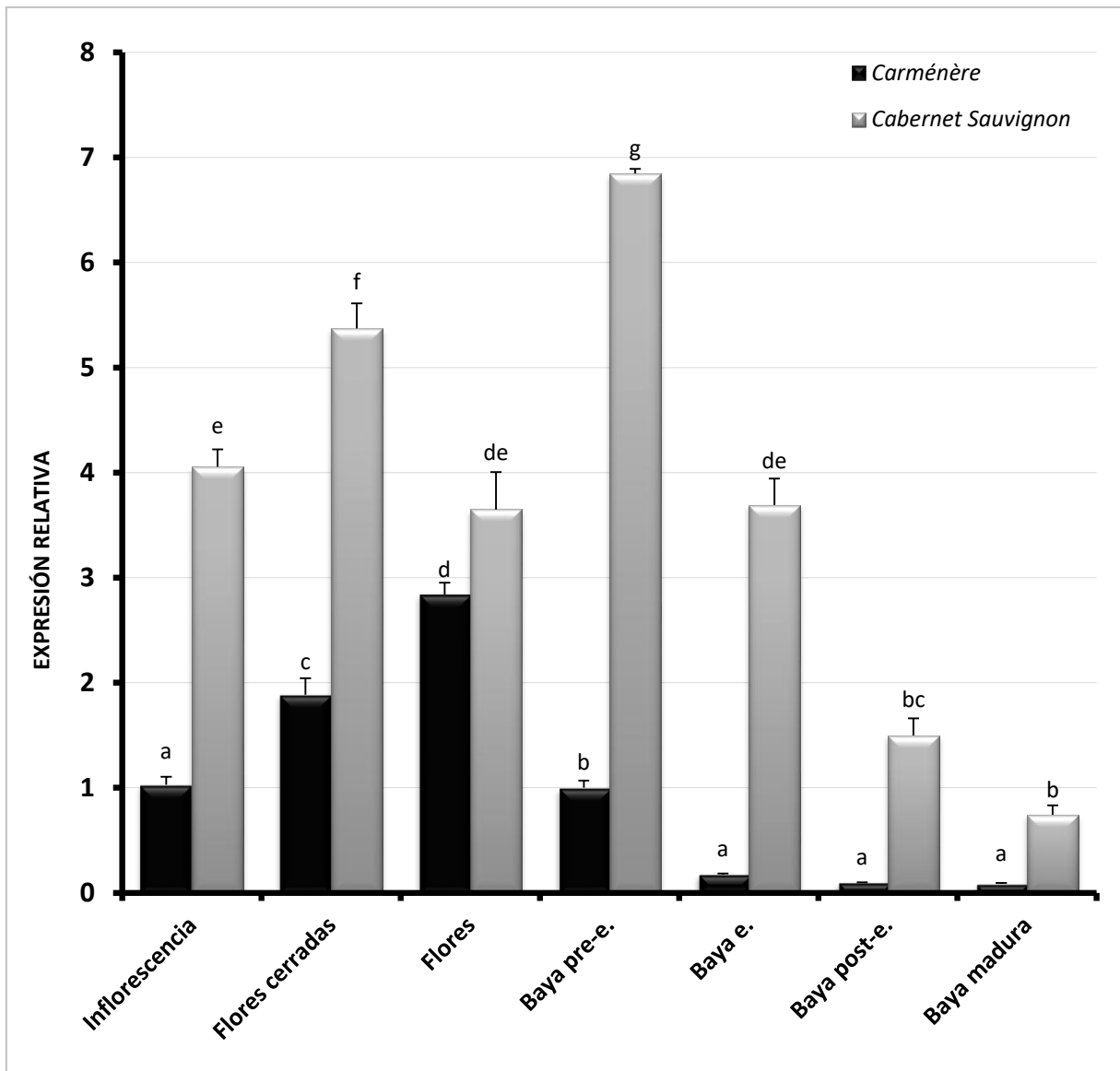
Similar análisis arrojó resultados diferentes para *VvFTK* (Figs. 22 y 25). En este caso, el nivel de expresión registrado en flores completas fue 32 veces mayor que en polen aislado, en tanto que la expresión en piel, pericarpio y semillas no registra diferencias significativas respecto de aquella detectada en bayas completas. En coherencia con este resultado, en las bayas completas no semilladas se estableció que *VvFTK* posee un nivel transcripcional similar al detectado en el pericarpio de bayas normales.

Tomados en su conjunto, tales resultados indican que ambos genes poseen diferente especificidad de tejido en su expresión, siendo *VvFSK* predominante en flores en antesis y semillas de bayas en desarrollo en tanto que *VvFTK* en flores cerradas y zarcillos.

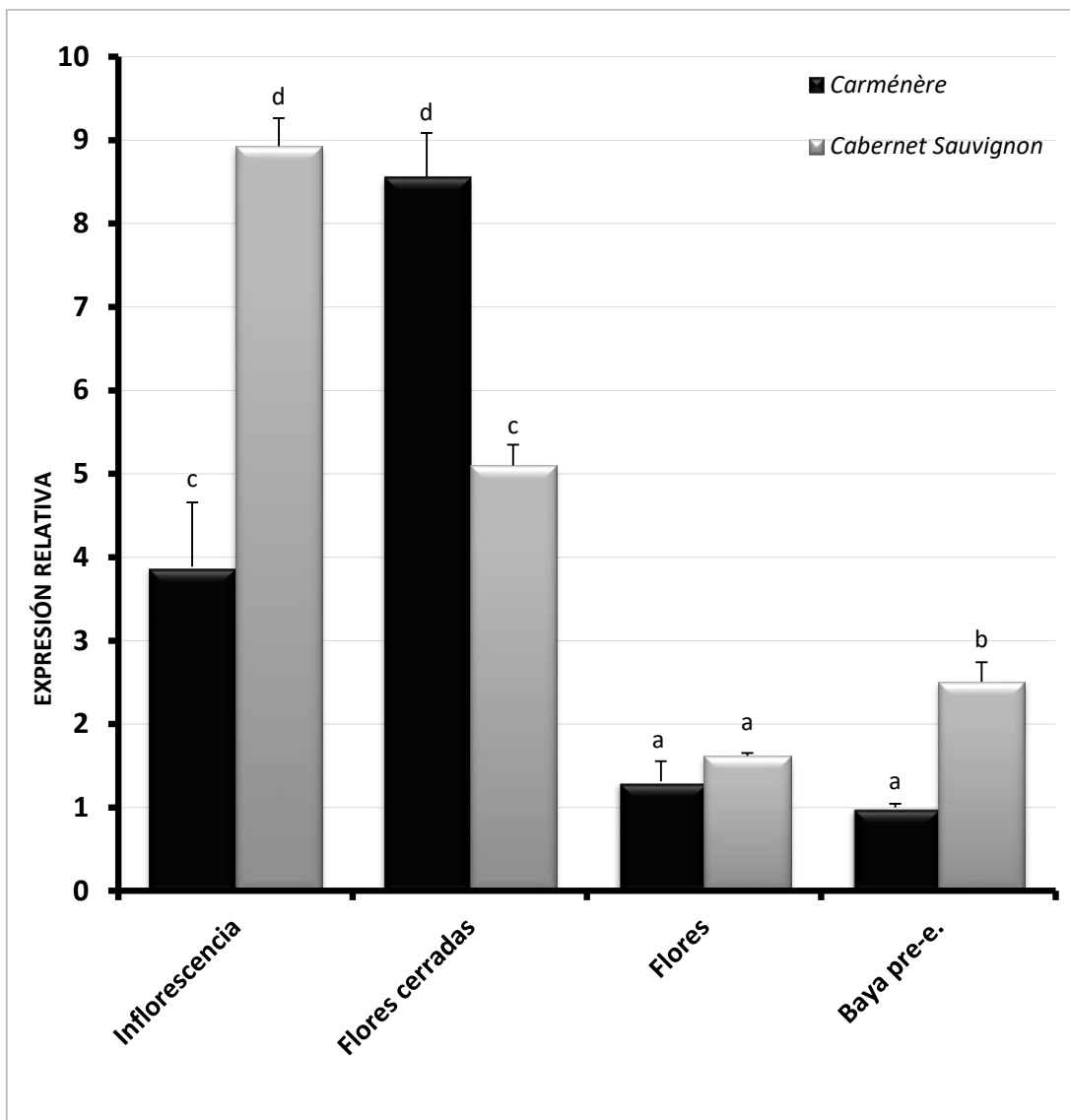




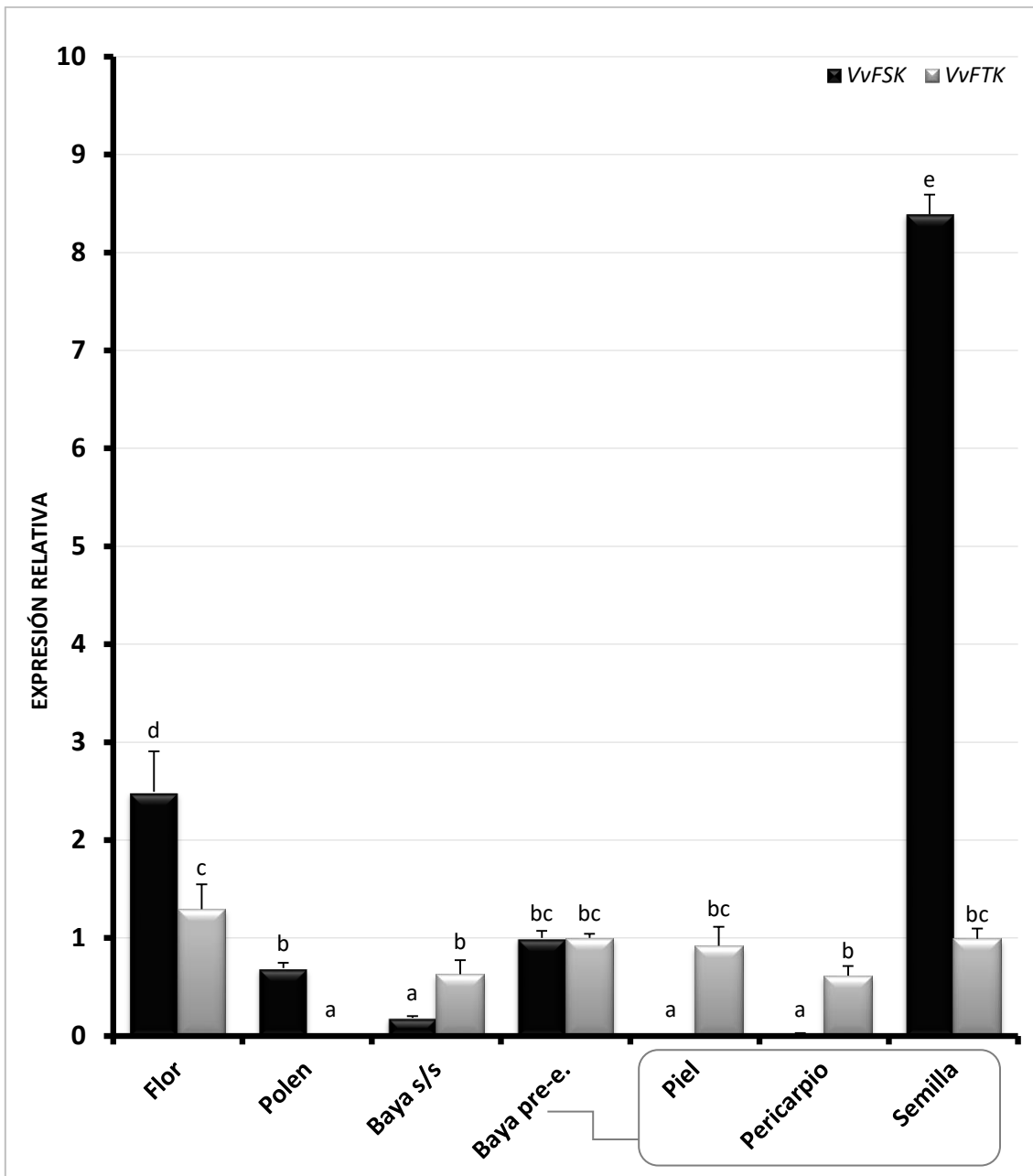
**Figura 22. Análisis de expresión de VvFSK y VvFTK en distintos órganos de *Vitis vinifera* cv. Carménère por qPCR.** Flor cerr., flor cerrada, Baya p.e., baya pre-enero. La expresión en raíces fue ajustada a 1 como valor relativo para cada gen. Los niveles de expresión de los genes fueron normalizados contra el de *VvUBQ*. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SD (n = 3). Letras distintas corresponden a diferencias significativas (prueba de Tukey p < 0,05).



**Figura 23. Comparación de los patrones de expresión de *VvFSK* en dos cultivares tradicionales de *Vitis vinifera*.** Inflorescencias, estadio EL19 o flores inmaduras compactas; Flores cerradas, EL21; Flores, EL23 o flores con 50% de caída de pétalos; Baya pre-e., EL31 o estadio pre-enero; Baya e., EL35 o estadio de enero; Baya post e., EL36 o estadio post-enero; Baya m., EL38 o bayas con madurez de cosecha. Las muestras de bayas normales de pre-enero de Carménère fueron usadas como calibrador de valor 1 y la expresión fue normalizada contra el nivel de expresión de *VvUBQ*. e.: enero. Los datos representan el promedio  $\pm$  SD (n = 3). Letras distintas corresponden a diferencias significativas (prueba de Tukey  $p < 0,05$ ).



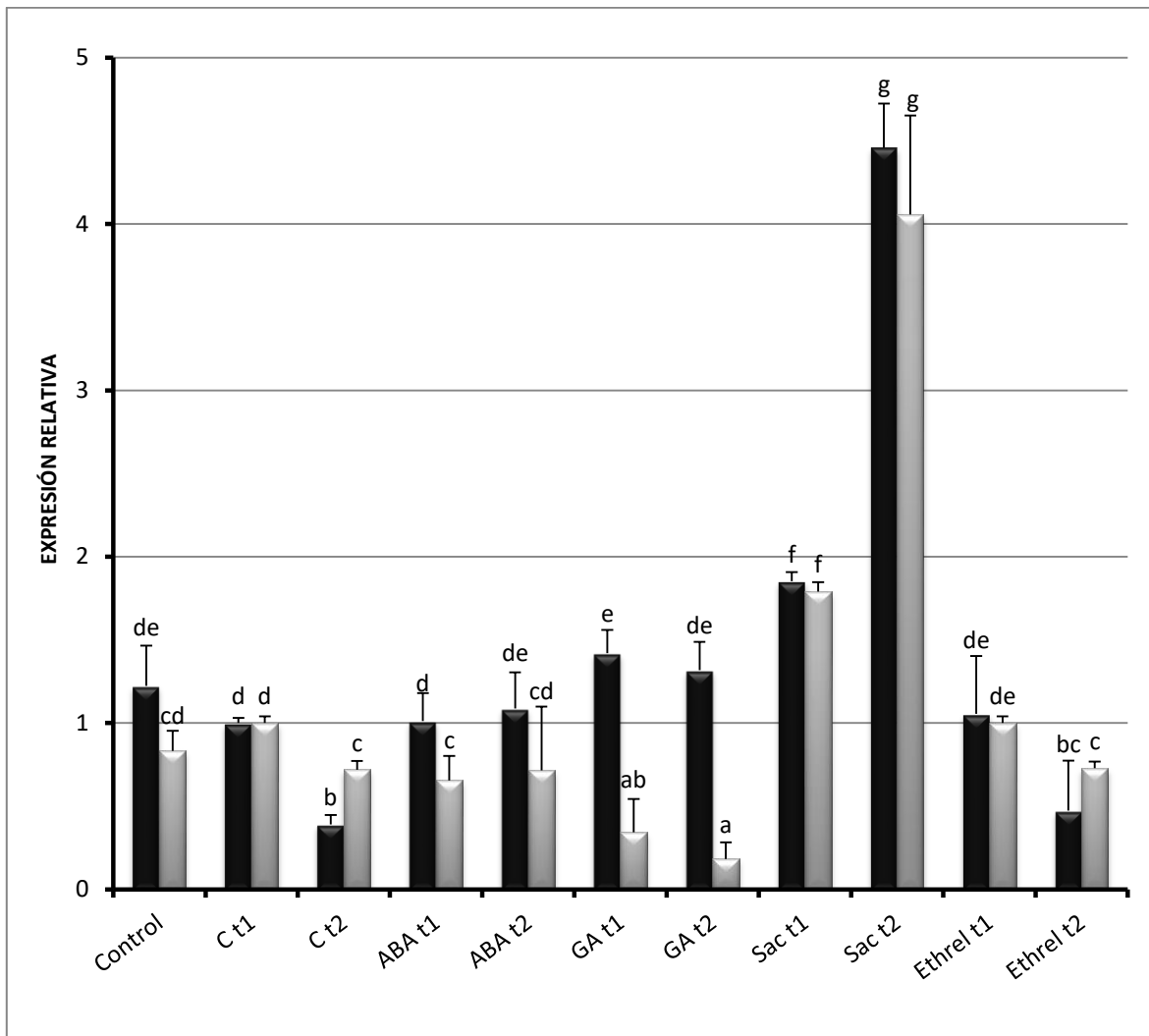
**Figura 24. Comparación de los patrones de expresión de *VvFTK* en dos cultivares tradicionales de *Vitis vinifera*.** Inflorescencias, estadio EL19 o flores inmaduras compactas; Flores cerradas, EL21; Flores, EL23 o flores con 50% de caída de pétalos; Baya pre-e., EL31 o estadio pre-envero; Baya e., EL35 o estadio de envero; Baya post e., EL36 o estadio post-envero; Baya m., EL38 o bayas con madurez de cosecha. Las muestras de bayas normales de pre-envero de Carménère fueron usadas como calibrador de valor 1 y la expresión fue normalizada contra el nivel de expresión de *VvUBQ*. e.: envero. Los datos representan el promedio  $\pm$  SD (n = 3). Letras distintas corresponden a diferencias significativas (prueba de Tukey  $p < 0,05$ ).



**Figura 25. Comparación de los niveles de expresión de VvFSK Y VvFTK en diversos tejidos reproductivos de *Vitis vinifera* cv. Carménère.** Los tejidos florales se separan entre flor completa y polen. Las bayas normales fueron separadas en piel, pericarpio y semillas. Además, se incluye la comparación de la expresión en bayas sin semillas. Las expresiones de ambos genes en muestras de bayas normales de pre-enero fueron usadas como calibrador. Se usó como normalizador el nivel de expresión de *VvUBQ*. Los datos representan el promedio  $\pm$  SD (n = 3). Letras distintas corresponden a diferencias significativas (prueba de Tukey p < 0,05).

### **3.5.2. La expresión de *VvFSK* y *VvFTK* en bayas de vides es fuertemente inducida en respuesta a tratamiento exógeno con sacarosa**

Para completar la caracterización del perfil transcripcional de *VvFSK* y *VvFTK*, se cuantificó la actividad transcripcional de estos genes en bayas al estado de envero sometidas a tratamiento exógeno con diferentes hormonas y moléculas elicitoras. Al nivel de expresión detectada en las muestras control tratadas con H<sub>2</sub>O y coadyuvante durante 6 horas se asignó valor de expresión = 1. De los compuestos ensayados, solo se estableció una fuerte inducción de la actividad transcripcional de *VvFSK* y *VvFTK* en respuesta a sacarosa a las 24 h de tratamiento (4,4 y 4 veces, respectivamente). Por otro lado, una fuerte represión de *VvFSK* fue observada con ácido metiljasmónico a las 24 horas de exposición (0,2 veces) así como una represión de *VvFTK* con giberelina también a las 24 horas de exposición (Fig. 26).



**Figura 26. Expresión de *VvFSK* (negro) y *VvFTK* (gris) en bayas tratadas con distintas moléculas elicitoras.** Control: bayas sin tratamiento; C: control H<sub>2</sub>O más Tween 20; ABA: ácido abscísico; GA: ácido giberélico; Sac: sacarosa; Ethrel, etefón 0,2%. t1 y t2 corresponden a 6 y 24 horas de exposición, respectivamente. Ct1 es el valor relativo 1. Los niveles de expresión de los genes fueron normalizados contra los de *VvUBQ*. Los datos representan el promedio  $\pm$  SD (n = 3).

### **3.5.3. El análisis *in silico* de la región promotora de los genes *VvFSK* y *VvFTK* establece la presencia de elementos regulatorios asociados a la expresión en tejidos reproductivos y en respuesta a azúcar**

Para determinar si los perfiles transcripcionales establecidos para *VvFSK* y *VvFTK*, se correlacionan con la presencia de elementos regulatorios en sus respectivas regiones promotoras, las secuencias nucleotídicas disponibles para ambos promotores fueron analizadas *in silico* mediante los softwares CONSITE y PLACE. El análisis realizado mediante el software CONSITE, permitió identificar en el promotor tanto de *VvFSK* y *VvFTK* la presencia de putativos sitios de unión para TFs de la familia MADS (AG, SQUAMOSA y AGL3), asociados a la inducción y morfogénesis floral (Fig. 27). Del mismo modo, el análisis efectuado con el software PLACE, identificó diversos elementos *cis* asociados a la regulación de la expresión génica por azúcares y a la expresión específica en los tejidos de la semilla, los que se encuentran presentes en distinta frecuencia entre ambos promotores (Fig. 27; Tablas 5 y 6). Tales resultados fueron comparados con el promotor del gen homólogo *At3g03770*, el cual se expresa en flores, semillas, en tejido floemático y en respuesta a sacarosa ([http://arabidopsis.org/servlets/Search?action=new\\_search&type=gene](http://arabidopsis.org/servlets/Search?action=new_search&type=gene)). Sitios de unión para TFs del tipo MADS y elementos regulatorios de respuesta a azúcares, se encuentran también presentes en este promotor (Fig. 27; Tabla 5). La presencia de elementos regulatorios responsables de tal patrón de expresión fue investigada en los promotores de *VvFSK* y *VvFTK*. En ambos casos se identificó secuencias similares a las establecidas para tal efecto por Ruiz-Medrano et al. (2011), (Fig. 27).

En consecuencia, la estructura de las regiones promotoras de *VvFSK* y *VvFTK*, deducida mediante el análisis *in silico*, es concordante con los resultados obtenidos del análisis del perfil transcripcional de ambos genes y es similar a la del gen homólogo *At3g03770* de *Arabidopsis thaliana*.

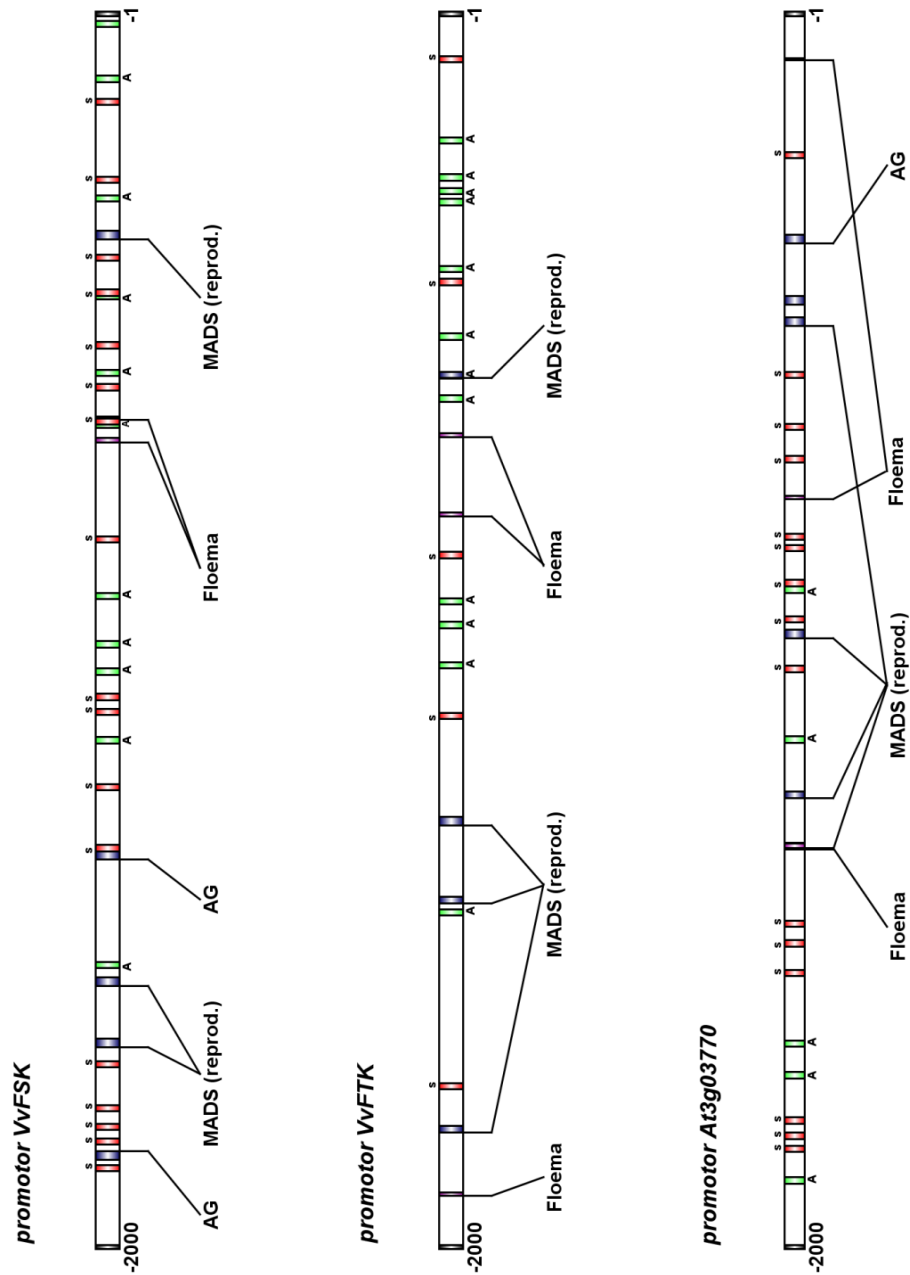


Figura 27. Elementos en Cis de respuesta a azúcar (A) y de especificidad de semilla (s) en la región 2000 pb “río arriba” de VvFSK, VvFTK y At3g03770.



**Tabla 5. Elementos de respuesta a azúcar (SRE) reconocidos por PLACE.**

SRE	secuencia	Frecuencia en promotores		
		VvFSK	VvFTK	At3g03770
Amylase box 1	TAACARA	1	2	2
Amylase box 2	TATCCAT	2	0	0
CMSRE-1	TGGACGG	1	0	0
Pyrimidine box	CCTTTT	3	7	2
SRE ATMSD	TTATCC	3	1	0
S-box	CACCTCCA	1	0	0
SP8 B	TACTATT	2	1	0
SURE 1	AATAGAAAA	1	2	0
TATCCAC box	TATCCAC	1	1	0
WB box	TTTGACY	1	1	0
W box	TGAC	10	7	2

**Tabla 6. Elementos de expresión específica en los tejidos de la semilla reconocidos por PLACE.**

<b>elemento</b>	<b>secuencia</b>	<b>Frecuencia en promotor</b>		
		<b>VvFSK</b>	<b>VvFTK</b>	<b>At3g03770</b>
AACA motif	AACAAAC	2	2	4
ACGT motif	GTACGTG	3	0	1
DPBF	ACACNNG	2	0	1
RY repeat	CATGCA	5	1	2
SEF1 motif	ATATTTAWW	0	1	1
SEF3 motif	AACCCA	2	1	1
SEF4 motif	RTTTTTR	4	1	6

## **4. DISCUSIÓN**

#### 4.1. **VVPSZ3 CODIFICA PARA UN PUTATIVO FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN DEL TIPO “ZINC FINGER” C2H2 CON ACTIVIDAD DE REPRESOR**

Durante el proceso de desarrollo de las plantas, los genes son activados o reprimidos mediante mecanismos que involucran la participación de diversos factores de transcripción (FTs) de acuerdo a un programa genético preestablecido que genera la especificidad celular y por lo tanto, la definición de los tejidos (Bartley e Ishida, 2003; Carretero-Paulet, 2010). Durante el desarrollo reproductivo, genes que codifican para tales proteínas regulatorias son activados de modo secuencial, de forma que los genes de inducción floral, gatillan la expresión de los genes de identidad de meristema floral, los que a su vez activan la expresión de los genes de identidad de órganos que inducen la organogénesis floral y el desarrollo de las diferentes estructuras de este órgano (revisado por Michaels, 2009; Posé et al., 2012). La mayoría de tales genes codifican para factores de transcripción del tipo MADS, los que actúan como activadores o represores de la expresión génica (Becker y Theissen, 2003; Kramer y Hall, 2005). La activación de los programas morfogénicos responsables de la generación de las estructuras reproductivas masculinas de la planta tales como anteras y polen, involucra la participación de un nuevo grupo de factores de transcripción que actúan río abajo de los factores homeóticos del tipo MADS. Tales factores han sido caracterizados en la especie *Petunia hybrida*, correspondiendo a proteínas del tipo denominado “**zinc finger**” (Takatsuji, 1999). El término “**zinc finger**” se refiere a dominios estructurales de una proteína en los cuales residuos de cisteína y/o histidina coordinan un átomo de zinc para estabilizar su estructura tridimensional consistente en una hoja  $\beta$  antiparalela de dos hebras y una hélice  $\alpha$ . Un grupo de proteínas “**zinc finger**” corresponde aquellas del tipo C2H2 o cys2/his2 (C2H2-ZFPs). Son aquellas donde dos cisteínas (cys) y dos histidinas (his) contenidas en la secuencia conservada CX2–4CX3FX5LX2HX3–5H, coordinan al átomo de zinc (Takatsuji, 1998; 1999; Wolfe et al., 2000). Las proteínas C2H2-ZFPs pueden ser sub-divididas en tres clases (A, B y C) de acuerdo al número, tipo y arreglo de los “**zinc fingers**”. Las clases A y B se componen de aquellas que llevan estos motivos en tándem, mientras que la clase C agrupa a aquellas que

llevan entre uno y cinco motivos “*zinc finger*” dispersos. La mayoría de las proteínas C2H2-ZFPs de animales y levadura se pueden clasificar en las clases A y B, mientras que en plantas estas están en su mayoría en la clase C. La clase C puede a su vez dividirse en tres subclases de acuerdo al número de residuos de aminoácidos separando las dos histidinas invariables de los “*zinc fingers*”: C1 con tres, C2 con cuatro y C3 con cinco (Englbrecht et al., 2004; Ciftci-Yilmaz y Mittler, 2008). En plantas las C2H2-ZFPs poseen de uno a cinco “*zinc fingers*”, y se distinguen de las de otros eucariotes principalmente por la presencia de la secuencia conservada QALGGH dentro de aquel dominio. Este motivo jugaría un rol clave en la capacidad de unión a ADN de estas proteínas puesto que mutaciones por sustitución de tales residuos, reducen o anulan tal capacidad en los factores ZPT2-2 de *Petunia hybrida* y SUPERMAN de *A. thaliana* (Yoshioka et al., 2001; Dathan et al. 2002). Las proteínas con el motivo QALGGH (también llamado *Q-type* o tipo Q) pertenecen al subgrupo C1 de las C2H2-ZFPs, constituyendo el 85% de este subgrupo. Se han identificado 64 C2H2-ZFPs tipo Q en *A. thaliana*, 99 en arroz (*Oriza sativa*) y 47 en trigo (*Triticum aestivum*) (Klug y Schwabe, 1995; Kubo et al. 1998; Takatsuji, 1999; Sakamoto et al. 2004; Ciftci-Yilmaz y Mittler, 2008). Se ha demostrado experimentalmente la función de FT en varias proteínas del tipo C2H2-ZFP tales como como SCOF1 (Kim et al., 2001), SUPERMAN (Hiratsu et al., 2002), CAZFP1 (Kim et al., 2004) y ZFT1 (Uehara et al., 2005).

El gen *VvPSZ3 (Vitis vinifera POLLEN AND SEED ZINC FINGER PROTEIN*, con 3 “*zinc fingers*”) aislado y caracterizado en este estudio, codificaría una proteína de 359 aminoácidos con tres motivos “*zinc finger*” separados por más de 20 aminoácidos, correspondiendo su estructura general a la típica de una C2H2-ZFP clase C1, similar a ZAT4 de *A. thaliana*, PhZPT3-3 de *P. hybrida* y SlZPT3-1 de *Silene latifolia* (Fig. 2; Takatsuji et al., 1994; Kubo et al., 2000; Jenkins et al., 2005). Al igual que la mayoría de las C2H2-ZFPs de plantas, la proteína VvPSZ3 posee el motivo conservado QALGGH, el cual está posicionado en las putativas superficies de contacto de cada “*zinc finger*” con el ADN (Kubo et al., 1998). Adicionalmente en su extremo carboxilo terminal se localiza un motivo conformado por la secuencia  ${}^L/_F\text{DLN}^L/_F(X)P$ , dominio denominado “*ERF-associated amphiphilic repression*”

(EAR), el cual ha sido identificado en las proteínas NtERF3 (ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR 3) de tabaco y AtERF3 y AtERF4 de *A. thaliana*, todas ellas caracterizadas como represores de la transcripción, (Ohta et al., 2000; 2001). Se ha descrito que esta caja le confiere su actividad represora a PhZPT2-3 de *P. hybrida*, una proteína relacionada con la tolerancia a sequía en esta planta (Ohta et al., 2001; Sugano et al., 2003). Por otro lado, la secuencia de solo seis aminoácidos DLELRL de SUPERMAN, es suficiente para conferir capacidad represora sobre un dominio de unión a ADN heterólogo y, al mutar algunos aminoácidos dentro de la secuencia, esta capacidad se pierde (Ohta et al., 2001; Hiratsu et al., 2004). Así mismo, motivos del tipo EAR se han identificado en RELATED TO APETALA 2.1 (RAP2.1) de *A. thaliana*, represor transcripcional del tipo DREB que se une a elementos de respuesta a deshidratación y etileno (DRE/ERE) presentes en genes activados por tales condiciones, reprimiendo su expresión (Dong y Liu, 2010). En otro estudio, se ha demostrado que la proteína tipo “zinc finger” ZAT10 de *A. thaliana*, la que también posee la caja DLN, mostró actividad represora de la transcripción en ensayos de expresión análisis transitoria (Sakamoto et al., 2004).

La proteína VvPSZ3, posee en su estructura una señal de localización nuclear (NLS; Figs. 2 y 3) y experimentos de localización de la proteína de fusión VvPSZ3-GFP han demostrado su migración al núcleo celular. Ello sumado a los antecedentes anteriormente referidos, sugiere que la proteína codificada por el gen *VvPSZ3*, correspondería a un factor de transcripción que actuaría como represor transcripcional.

#### **4.2. VvPSZ3 POSEE SIMILITUD CON PROTEÍNAS DEL TIPO “ZINC FINGER” ASOCIADAS AL DESARROLLO REPRODUCTIVO EN OTRAS ESPECIES VEGETALES.**

El análisis comparativo de la proteína codificada por el gen *VvPSZ3* indica una alta similitud con proteínas descritas en otras especies vegetales, en las cuales es posible identificar los mismos dominios funcionales descritos anteriormente (Figs. 3 y 4). Entre ellas se incluye a *PhZPT3-3*, descrita en *P. hybrida* (Kubo et al, 2000) y *SIZPT3-1* su ortólogo en *Silene latifolia* (Jenkins et al., 2005). Ambas proteínas han sido reportadas como factores de

transcripción en tejidos reproductivos de sus respectivas especies. El gen *PhZPT3-3* de *P. hybrida* se expresa principalmente en el gineceo, específicamente en los tejidos estigmático y de transmisión para el tubo polínico y el tejido de sostén para el óvulo a fecundar (Kubo et al, 2000). Por su parte, en la especie dioica *Silene latifolia*, el gen *SIZPT3-1* participaría en las etapas iniciales de la morfogénesis del androceo y posee una expresión baja y transitoria en flores femeninas (Jenkins et al., 2005).

Otras proteínas similares a VvPSZ3 corresponden a ZAT4 y ZAT9 de *A. thaliana*. Los genes para ambas proteínas fueron inicialmente identificados por Mittler et al. (2006) al examinar la expresión bajo diferentes condiciones de estrés de un conjunto de genes para proteínas del tipo “*zinc finger*”. Los genes *ZAT4* (*AT2g45120*) y *ZAT9* (*At3g60580*) no tenían expresión diferencial en plantas estresadas, por lo que no fueron incluidos en los estudios posteriores realizados por este grupo. Con el fin de establecer una primera aproximación al rol funcional de VvPSZ3, en este estudio se profundizó en la caracterización de tales genes. Al examinar la base de datos “*The Bio-Array Resource for Plant Biology*” (<http://bar.utoronto.ca/>), ambos genes registran expresión en anteras, polen maduro y semillas (Fig. 10). Coherentemente con estos datos, el análisis de expresión realizado mediante qRT-PCR estableció que ellos son diferencialmente expresados durante el desarrollo de *A. thaliana*, alcanzando su máxima actividad transcripcional en flores y silicuas, patrón similar al detectado para el gen *VvPSZ3* de *Vitis vinifera* (Fig. 11). Una evaluación de la secuencia de *ZAT4* y *ZAT9* permitió identificar al primer gen como el homólogo de *VvPSZ3* en *A. thaliana* (sección 3.1.2).

El análisis posterior de la línea mutante CS841944, obtenida por inserción de T-DNA en la región promotora del gen *ZAT4*, reveló que las plantas mutantes homocigotas no son viables indicando que dicho gen codifica para una función esencial para el desarrollo de *A. thaliana* y que *ZAT4* y *ZAT9* cumplen roles diferentes y no corresponden a genes redundantes (Fig. 16). Dado que, a diferencia de *ZAT9*, *ZAT4* es expresado en plántulas de 5 y 10 días post-germinación (Fig. 11), es posible sugerir un rol clave de la proteína codificada en los estadios iniciales del desarrollo de la planta. Por otro lado, al comparar los niveles de expresión del

gen *ZAT4* entre el heterocigoto de la línea mutante respecto de la línea tipo silvestre, se detectó una menor actividad transcripcional de este gen en el heterocigoto, mientras que la comparación fenotípica entre ambas líneas registró diferencias significativas sólo en el número de semillas por silicua, sugiriendo esto último la participación de *ZAT4* en su desarrollo (Fig. 17; Tabla 3). Si el gen *VvPSZ3* posee la capacidad para complementar funcionalmente a la línea CS841944 debe aún ser demostrado.

#### **4.3. EL PERFIL DE EXPRESIÓN DEL GEN *VvPSZ3* SUGIERE SU PARTICIPACIÓN EN EL DESARROLLO REPRODUCTIVO DE *Vitis vinifera* Y CORRELACIONA CON LA PRESENCIA DE ELEMENTOS REGULATORIOS EN SU REGIÓN PROMOTORA.**

La mayor expresión de *VvPSZ3* se registró en flores cerradas y en bayas al estado de envero, estadios donde tiene lugar importantes eventos morfogénéticos y fisiológicos. En flores cerradas se realiza el desarrollo de estructuras reproductivas tales como anteras, polen, carpelos y óvulos. FTs del tipo “*zinc finger*” C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> han sido asociados al desarrollo de tales estructuras en *P. hybrida*. El factor TAZ1 es fundamental para el desarrollo del *tapetum* de las anteras y, por lo mismo, el silenciamiento de la expresión del gen que la codifica se traduce en alteraciones morfológicas y funcionales de este tejido y una significativa reducción tanto en la cantidad de polen producido como en la capacidad germinativa de éste (Kapoor et al., 2002). Otro grupo de factores de esta familia entre los que se incluye a ZPT3-2, ZPT2-5, ZPT4-2, ZPT4-3, ZPT3-1, ZPT4-1 y ZPT2-6, aún cuando menos estudiados, han sido asociados al desarrollo y maduración del polen (Takatsuji, 1998). Del mismo modo, los genes que codifican para los factores ZPT2-10 y ZPT3-3, pertenecientes a esta misma familia, son fundamentalmente expresados en tejidos reproductores femeninos tales como el estigma, estilo y placenta, aún cuando una expresión menor en polen ha sido detectada para el gen *ZPT3-3* (Kubo et al. 2000). En el caso del gen *VvPSZ3*, la expresión en tejido floral ocurre fundamentalmente en el polen, sugiriendo que aún cuando la proteína codificada por este



gen exhibe gran homología con el factor ZPT3-3 de petunia, cumpliría roles diferentes durante el desarrollo floral (Figs. 3 y 6).

En bayas al estadio de envero se inicia la maduración de la semilla y se producen importantes cambios en el metabolismo primario y secundario, gatillados por modificaciones tanto en el transcriptoma como en el proteoma de tales bayas (Deluc et al. 2007; Giribaldi et al., 2007). En bayas, la actividad transcripcional de *VvPSZ3* se registró en semillas siendo casi indetectable en pulpa y piel (Fig. 8). Tal resultado es concordante con lo descrito en otros estudios de expresión génica en frutos de vid, donde se establece que sobre el 75% de los genes analizados, son diferencialmente expresados entre la semilla y la pulpa o piel (Grimplet et al., 2007). Por otra parte esta especificidad en la expresión de *VvPSZ3* explica que en las bayas partenocárpicas no semilladas este gen posea una baja actividad transcripcional como ha sido establecido tanto en este estudio como en el análisis transcriptómico realizado previamente y cuyos resultados se resumen en la Tabla 1.

El perfil de expresión diferencial detectado para el gen *VvPSZ3* puede ser parcialmente explicado por la presencia de elementos regulatorios en su región promotora. Según el análisis *in silico* realizado para identificar tales elementos, la región promotora de *VvPSZ3* poseería sitios de unión para factores de transcripción asociados tanto al desarrollo floral como frutal en vides (Figs. 12, 13). Dos secuencias blanco para factores del tipo SQUAMOSA tales como APETALA1 o FRUITFUL, fueron identificadas en la región río arriba de este gen (Fig. 12), sugiriendo que *VvPSZ3* puede ser modulado en su expresión por los factores de transcripción VAP1 (*Vitis* APETALA1) o V-FUL-L (*Vitis* FRUITFUL-like). En vides y de acuerdo con su patrón de expresión estadio-específico, VAP1 ha sido asociado a la inducción floral y a la regulación del desarrollo de órganos florales en tanto que V-FUL-L corresponde a un factor implicado tanto en el desarrollo de carpelos como de frutos durante la fase de pre-envero (Calonje et al., 2004; Carmona et al., 2008, Vasconcelos et al., 2009). En diversas especies vegetales, muchos de los genes blanco de factores del tipo SQUAMOSA/APETALA1 codifican para reguladores de la transcripción y su activación es parte de los eventos que dan inicio a la floración integrando las vías del crecimiento, determinación de tejidos y control

hormonal (Kaufmann et al., 2010a y 2010b). También se identificó la presencia de un sitio de unión para el factor de transcripción AGAMOUS. Tal proteína es uno de los reguladores claves del proceso de desarrollo de órganos reproductores masculinos (anteras y polen) y femeninos (carpelos y óvulos) en plantas. En vides se ha descrito al gen *VvMADS1*, el más cercano homólogo a los genes AGAMOUS y SHATTERPROOF de *A. thaliana*, el cual es predominantemente expresado durante el desarrollo floral de la vid así como durante el desarrollo frutal, particularmente en pieles y semillas de bayas (Boss et al., 2001, 2002 y 2003). La presencia de tales elementos regulatorios en el promotor de *VvPSZ3*, sugiere que este gen puede ser blanco directo de los factores de transcripción mencionados y permitirían dar cuenta del patrón de expresión en tejido floral y en frutos durante el desarrollo reproductivo de la vid.

La elevada expresión detectada para *VvPSZ3* tanto en polen maduro como en semillas de vides, correlaciona con la presencia en su región promotora de elementos *cis* asociados a la expresión específica en tales órganos (Figs. 12 y 13). Numerosas repeticiones de secuencias homologas a aquellas presentes en el promotor de los genes *LAT52* de *Solanum lycopersicon* y *SBgLR* de *Solanum tuberosum*, ambos específicamente expresados en polen (Bate y Twell, 1998; Zhou et al., 2010), así como combinaciones de elementos *cis* detectados en genes de expresión específica en semillas (Ezcurra et al., 1999; Wu et al., 2000), han sido identificadas en la región río arriba de *VvPSZ3*.

Con el fin de establecer la relación del perfil transcripcional de *VvPSZ3* con las diferentes vías de transducción de señales asociadas a hormonas vegetales y otras moléculas elicitoras, la actividad transcripcional de este gen fue analizada mediante tratamiento exógeno con tales compuestos. La expresión de *VvPSZ3* fue fuertemente inducida en respuesta ABA y en menor grado por SA y sacarosa (Fig. 9). Interesantemente, se ha establecido que en dos cultivares diferentes de vides, ABA es acumulado en flores al estado de antesis y en frutos en envero (Inaba et al., 1976; Wheeler et al., 2009), estadios en los que *VvPSZ3* registra su mayor actividad transcripcional. Se ha planteado que la acumulación transitoria de ABA en envero gatilla el proceso de maduración de bayas, activando los

procesos fisiológicos y bioquímicos asociados a este proceso. Del mismo modo, en esta fase se inicia la acumulación de azúcares en la baya y se ha sugerido que ABA y sacarosa podrían interactuar para formar una compleja red de vías de señalización entrecruzada, coordinando la acumulación de antocianinas (Loreti et al. 2008). Lo anterior permite especular que la activación de *VvPSZ3* en semillas de frutos en envero correspondiera a uno de los eventos genético-moleculares asociados a la maduración de la semilla, proceso que se desarrolla fundamentalmente en la etapa de post-envero. La respuesta transcripcional de *VvPSZ3* frente al tratamiento exógeno con tales compuestos puede ser mediada por la presencia de elementos de respuesta a ABA, sacarosa y ácido salicílico, los cuales han sido identificados en su región promotora. Adicionalmente y considerando que el zinc posee un rol esencial en la estabilización y funcionamiento de proteína del tipo “*zinc finger*”, se investigó el efecto de Zn sobre la actividad transcripcional de *VvPSZ3*. En vides el tratamiento exógeno con este elemento ha demostrado su capacidad para inducir la expresión del gen *VvZIP3*, el cual codifica para un transportador involucrado en la movilización de zinc en tejidos reproductivos (Gáinza-Cortés et al., 2012). Sin embargo, similar tratamiento no posee efecto significativo sobre la expresión de *VvPSZ3* indicando que este gen no está sometido a los mismos mecanismos de regulación y sugiriendo que la manifestación de alteraciones en el desarrollo de frutos en vides inducidas por deficiencia de Zn no involucraría directamente al gen *VvPSZ3* como agente causal.

En relación al elemento en *cis* denominado “*TEIL binding site*” encontrado en una región conservada del promotor de *VvPSZ3* y sus homólogos, este relacionaría a dichos genes con el desarrollo floral, puesto que, al sobreexpresar y también al anular la expresión del gen *TEIL* (*Tobacco EIN3-Like*) en tabaco, el pistilo sobresale fuera de la flor y el tamaño de los otros órganos florales también se ve afectado, siendo este un fenotipo encontrado también al modificar la expresión de genes *EIN* en *A. thaliana* (Hibi et al., 2007; Wawrzynska et al., 2010). La interacción de este elemento más otros como aquellos que otorgan especificidad para expresión en polen, podría ser la responsable de una correcta expresión tejido específica de *VvPSZ3*.

Los más cercanos homologos a *VvPSZ3*, *ZAT4* de *Arabidopsis thaliana* y *PhZPT3-3* de *Petunia hybrida*, exhiben un patrón de expresión similar a éste. Al comparar sus regiones promotoras con la del gen de vid, se estableció que ellas comparten una organización estructural similar a la descrita anteriormente, siendo el promotor de *ZAT4* el más parecido al promotor de *VvPSZ3*. Ello, sumado a su estrecha relación filogenética, sugiere que tales genes podrían cumplir roles similares durante el desarrollo en sus respectivas especies.

#### **4.4. *VvFSK* Y *VvFTK* DE *V. vinifera* CODIFICAN PARA PROTEÍNAS CON CARACTERÍSTICAS DE RECEPTOR QUINASA DEL TIPO LRR-RLK.**

La generación de los diversos tejidos que forman un órgano como el ovario y los óvulos, así como el fruto que se origina a partir de ellos luego de ocurrida la fecundación, requiere de numerosos eventos de división y diferenciación celular. En organismos superiores, estos procesos están controlados principalmente por vías intercelulares de transducción de señales y reguladores transcripcionales que determinan la correcta especificación y organización celular. Tales vías se organizan en redes complejas que responden a señales externas las cuales son percibidas por receptores localizados en la membrana celular, activando una vía de transducción de señales y, finalmente, a los diversos reguladores de la expresión génica. En plantas se han descrito varios sistemas de señalización intercelular que operan durante el desarrollo, entre los que se incluye a aquellos que involucran la participación de receptores con función quinasa, los que pueden ser específicos para cada etapa del desarrollo de la planta (Nordine et al. 2011). En la planta modelo *A. thaliana*, se han identificado más de 600 genes que codifican proteínas denominadas “*receptor-like kinases*” o RLKs (Shiu et al., 2004), de los cuales solo un reducido número ha sido caracterizado. Las RLKs de plantas (PRKs) se sitúan principalmente en la membrana plasmática, estando constituidas por un dominio extracelular, uno transmembrana y uno intracelular que es el que posee la función quinasa, por lo general del tipo *Ser/Thr* quinasa en plantas. Este último dominio transmite la señal externa percibida, activándose por autofosforilación para luego fosforilar un sustrato específico. Las

PRKs han sido relacionadas a varias vías de señalización, las que incluyen función meristemática, interacción polen pistilo, percepción de brasinosteroides, abscisión floral, desarrollo del óvulo y embriogénesis, defensa y morfología de la planta (Becraft, 2002). Entre las PRKs, las LRR-RLKs constituyen la familia más grande de receptores de este tipo en plantas. Tales proteínas poseen el dominio denominado LRR (leucine rich repeat) el cual puede encontrarse repetido entre 1 a 32 veces, y le permitiría a la proteína formar heterodímeros con otras proteínas similares generando el receptor activo (Li, 2011).

Varias LRR-RLKs han sido descritas como de importancia para el desarrollo. Entre ellas, la cascada de PRKs mejor conocida en plantas es la vía CLAVATA (CLV) que controla el tamaño del conjunto de células troncales meristemáticas centrales en el meristema apical. En esta vía, la quinasa receptora CLV1 y la proteína receptora CLV2 dimerizan, siendo el pequeño péptido CLV3 el ligando. Esta vía restringe la expresión de *WUSCHEL*, regulando el balance entre división celular y diferenciación en el meristema apical (De Smet et al., 2009, Perales y Reddy, 2012). Algunas vías de transducción de señales mediadas por RLKs, aparecen asociadas a la respuesta frente a señales hormonales. Así, BRASINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1) es un receptor de la superficie celular del tipo LRR-RLK que percibe brasinosteroides (BR). Cuando BRI1 percibe la señal, se produce la transfosforilación de BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1 (BAK1), proteína con la cual forma un complejo. A esto sigue una cascada de señales que termina con la acumulación de los FT BRASSINAZOLE RESISTANT 1 y 2 (BZR1, 2), que regulan la expresión de genes en respuesta a BR (Kim y Wang, 2010). Por otro lado, recientemente se ha descrito que los primeros eventos de señalización de la hormona ABA ocurrirían a través de un conjunto de proteínas que incluyen a las clases PYRABACTIN RESISTANCE (PYR)/REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR (RCAR), PROTEIN PHOSPHATASE 2C (PP2C) y SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 2 (SnRK2). En este sistema, las proteínas tipo PYR/CAR actuarían como receptores y, en presencia de ABA inhibirían a la fosfatasa PP2C, que inactiva a SnRK2 removiéndole los grupos fosfatos que le dan capacidad quinasa. SnRK2 es un regulador positivo de las señales río abajo, como control de canales de iones y expresión génica (Hubbard et al., 2010).

La participación de LRR-RLKs en el desarrollo reproductivo de plantas ha sido también documentada. *HAIKU 2 (IKU2)*, gen que codifica para una proteína “**leucine rich repeat receptor like-kinase**” propia del endosperma, es regulado por *IKU1* y el FT *MINISEED 3 (MINI3)*, en lo que sería la vía IKU-MINI. Esta vía estaría relacionada con el control del tamaño de la semilla. Plantas mutantes en estos genes sufren reducciones en el tamaño del endosperma, la proliferación de los tejidos embrionarios y la elongación celular del integumento (García et al., 2003; Wang et al., 2010; Nodine et al., 2011).

En *V. vinifera*, a partir de un EST fuertemente reprimido en bayas no semilladas el cual codificaba para una proteína no identificada, se aislaron dos genes que codifican proteínas para las cuales el análisis bioinformático realizado en este trabajo estableció que correspondían a receptores quinasa putativos. Tales genes, denominados *VvFSK* y *VvFTK*, se localizan en los cromosomas 13 y 8, respectivamente y se sugiere que están involucrados en el desarrollo reproductivo en la vid. Las proteínas codificadas poseen cuatro dominios funcionales bien definidos: un péptido señal, un dominio estructural que consta de 10 repeticiones del motivo LRR, un segmento transmembrana y un dominio proteína quinasa, estructura similar a los encontrados en otros LRR-RLKs de plantas. El análisis *in silico* mediante tres programas diferentes predice que estas proteínas poseen localización en la membrana plasmática celular. El dominio quinasa de *VvFSK* y *VvFTK* muestra cierta singularidad. Al analizar la secuencia aminoacídica deducida para ambas proteínas con herramientas *online* como SMART, su especificidad de sustrato no resulta claramente definida, siendo identificada como una “**Ser/Thr/Tyr kinase**”, con la capacidad de fosforilar las proteínas blanco en residuos de serina, treonina y/o tirosina (Rudrabhatla et al., 2006). *VvFSK* y *VvFTK* poseen en el dominio quinasa, subdominios VIb y XI, secuencias aminoacídicas que las clasifica como quinasas de doble especificidad. Aun cuando la mayoría de las RLKs en plantas tienen especificidad por residuos de serina o treonina (Afzal et al., 2008), se ha identificado quinasas de doble especificidad en vegetales entre las que se clasifica a BRI1 y BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2 (BIN2), entre otras (Kim et al., 2009; Jaillais et al., 2011).

En consecuencia y sobre la base del análisis *in silico*, se postula que los genes *VvFSK* y *VvFTK* codifican para putativos receptores quinasas del tipo LRR-RLK con actividad de “*Ser/Thr/Tyr kinase*”.

#### **4.5. LOS GENES *VvFSK* y *VvFTK* CODIFICAN PARA PROTEÍNAS CON SIMILITUD A ScORK17 DE *Solanum chacoense*, PERO POSEEN DIFERENTES PATRONES DE EXPRESIÓN DURANTE EL DESARROLLO**

Al realizar un análisis comparativo de las proteínas *VvFSK* y *VvFTK* con aquellas encontradas en las bases de datos, es posible notar una alta similitud con proteínas de otras especies, entre ellas ScORK17 de *Solanum chacoense* y la proteína codificada por *At3g03770* de *Arabidopsis thaliana*. Sólo para ScORK17 se ha estudiado su estructura y función, determinándose que corresponde a una LRR-RLK cuyo rol se circunscribe al desarrollo del óvulo y la semilla en dicha planta. La expresión del gen que la codifica es inducida tras la fecundación y se expresa en el integumento del óvulo y el endotelio, un tejido encargado de la nutrición del saco embrionario. Al sobreexpresar el gen en un sistema heterólogo como *A. thaliana*, se produce alteraciones en el desarrollo del saco embrionario, provocando una disminución en el número de semillas que se obtiene por silicua (Germain et al., 2008).

No obstante la gran homología detectada entre los genes de vid, se estableció que ellos poseen diferentes patrones de actividad transcripcional durante el desarrollo. *VvFSK* aumenta desde el estadio de inflorescencia para llegar a un máximo en flores al estadio de antesis, detectándose finalmente en semillas del fruto en desarrollo. Por su parte, la expresión de *VvFTK* está concentrada principalmente en inflorescencias y flores inmaduras y también en zarcillo, siendo menor su actividad en la flor en antesis y en la baya formada. Ello permite especular que, si bien los productos de estos genes corresponden a proteínas similares, estarían cumpliendo funciones distintas durante el desarrollo. Al comparar la expresión descrita para ambos genes de vid con la de *At3g03770* de *A. thaliana*, se estableció que aunque este gen codifica para una proteína filogenéticamente más cercana a *VvFTK*,

exhibe un patrón de expresión similar al del gen *VvFSK*, alcanzando sus máximos niveles de actividad transcripcional en flores y semillas inmaduras (Fig. 24).

El análisis *in silico* de las secuencias promotoras de estos genes mediante el software CONSITE, reveló la presencia elementos en *cis* reconocidos por FTs del tipo MADS, asociados al desarrollo floral/frutal en plantas. Secuencias similares al sitio de unión consenso para SQUAMOSA (SQUA) o AGAMOUS-like 3 (AGL3) fueron identificadas en los promotores de los genes *VvFSK*, *VvFTK* y *At3g03770* de *A. thaliana*. Sin embargo, la presencia de elementos en *cis* para el FT AGAMOUS (AG) fue detectada sólo en el promotor de los genes *VvFSK* y *At3g03770*. Puesto que en vides el factor de transcripción con función de AG (*VvMADS1*) participa no solo en la regulación de la organogénesis floral sino que también en el desarrollo posterior de frutos (Carmona et al., 2008; Vasconcelos et al., 2009), tal diferencia en la estructura de las regiones promotoras puede dar cuenta de los distintos perfiles de expresión determinados para *VvFSK* y *VvFTK*.

Es interesante notar, además, la presencia en los promotores de los genes *VvFSK* y *VvFTK* de elementos regulatorios detectados en genes cuya expresión se localiza en tejido vascular. La expresión en tejido floemático ha sido confirmada para *At3g03770*, el homólogo en *A. thaliana* de los genes referidos (Ruiz-Medrano et al., 2011). Elementos regulatorios identificados anteriormente en el promotor del gen *SUCROSE TRANSPORTER 2 (AtSUC2)* de *Arabidopsis thaliana*, el cual exhibe expresión específica en las células acompañantes del floema (Schneidereit et al., 2008), han sido también detectados en la región regulatoria de *At3g03770*. Tales secuencias, están también presentes en los promotores de *VvFSK* y *VvFTK*, sugiriendo que tales genes podrían poseer similar especificidad de expresión.

#### **4.6. *VvFSK* y *VvFTK* SON INDUCIDOS POR SACAROSA**

Para completar el perfil transcripcional de los genes *VvFSK* y *VvFTK*, se realizó un tratamiento exógeno con hormonas vegetales y moléculas elicitoras sobre bayas del cultivar Carménère al estadio de pre-envero. Dicho estudio, reveló que, en las condiciones ensayadas, ambos genes no son inducidos en respuesta a las hormonas vegetales ABA, GA3 y



Etileno, aun cuando elementos de respuesta asociados a las vías de transducción de señales de tales compuestos fueron identificados en la región promotora de ambos genes.

Una inducción significativa de la expresión de ambos genes fue detectada en respuesta a tratamiento con sacarosa. El análisis *in silico* con el componente *Signal Scan Search* de PLACE, permitió identificar varios elementos de respuesta relacionados a sacarosa o azúcar. En el gen *Sporamin A1* de batata, se han identificado dos elementos de respuesta a azúcar denominados CMSRE-1 y CMSRE-2, los cuales son requeridos simultáneamente para permitir la inducción por sacarosa (Morikami et al., 2005). En el caso de los genes de vid, el elemento CMSRE-1 está presente en el promotor de *VvFSK* y *VvFTK*, pero no así CMSRE-2. Sin embargo, estudios realizados con el gen de la  $\beta$ -amilasa de batata, el cual también carece del elemento CMSRE-2, indican que tal secuencia puede ser reemplazada por otro elemento denominado SP8b (Maeo et al., 2001), el cual se encuentra presente en la región promotora de *VvFSK* y *VvFTK*.

La expresión de *VvFSK* y *VvFTK* no fue detectada en polen y probablemente su actividad transcripcional en flores se localice en ovarios y óvulos los que darán origen posterior a la semilla. Presumiblemente, los genes en estudio estarían involucrados en el desarrollo de estos órganos. En la vid, los azúcares han sido descritos como moléculas necesarias para el desarrollo reproductivo, desde inflorescencia hasta formación del fruto, donde no solo son requeridos como suministro energético, sino también como reguladores de la expresión génica y señales, siendo el aborto floral un síntoma de la falta de un suministro constante de azúcares, el cual es requerido durante la formación del gametofito femenino (Lebon et al., 2008). Del mismo modo, se ha descrito que eventos que tienen lugar durante la embriogénesis son regulados por azúcares (Gibson, 2004), por lo que es factible especular que la expresión de *VvFSK* en semillas podría estar asociada a este mecanismo regulatorio.

Estudios más detallados acerca de la expresión tejido y/o célula específica de los genes referidos y la identificación tanto de el o los ligandos que interactúan con el dominio receptor así como de las proteínas blanco de la actividad quinasa de los productos

codificados por los genes *VvFSK* y *VvFTK*, son necesarios para establecer con mayor precisión el rol de tales receptores quinasa en la modulación del desarrollo floral/frutal en la vid.

#### **4.7. LOS GENES *VvPSZ3* y *VvFSK* PRESENTAN DISTINTOS NIVELES DE EXPRESIÓN EN CULTIVARES CON DIFERENTE PROPENSIÓN AL DESARROLLO DE BAYAS PARTENOCÁRPICAS**

Los cultivares Cabernet Sauvignon y Carménère aun cuando derivan de un mismo ancestro presentan una diferente tendencia a problemas del desarrollo reproductivo tales como abscisión y partenocarpia en frutos (Moreno y Vallarino, 2011). Interesantemente, en ambos cultivares se detectan diferencias en los perfiles de expresión de los genes *VvPSZ3* y *VvFSK*. Si bien el gen *VvPSZ3* posee un patrón de expresión estadio específico similar en ambos cultivares, en Cabernet Sauvignon los niveles transcripcionales en tejidos florales inmaduros y maduros son notablemente más altos que en Carménère. Por otro lado, el gen *VvFSK* presentó, a través de todo el desarrollo reproductivo un nivel de transcrito mayor en el cultivar Cabernet Sauvignon por sobre Carménère, de particular interés es el hecho de que en el primer cultivar la expresión de este gen persiste hasta estados avanzados del desarrollo frutal en tanto que en el segundo cultivar la actividad transcripcional de este gen decrece bruscamente a partir del estado de envero. Análisis comparativos de este tipo no están ampliamente documentados en la literatura, sin embargo, estudios realizados por nuestro grupo de trabajo con relación a la expresión del gen *VvBOR1*, también asociado al proceso partenocárpico, indican que en este caso no se registran diferencias significativas en los perfiles transcripcionales de este gen entre ambos cultivares (Pérez-Castro et al., 2012). Tomados en su conjunto, estos resultados sugieren la participación de los genes *VvPSZ3* y *VvFSK* en la manifestación del proceso partenocárpico. Sin embargo, estudios más detallados son necesarios para establecer si ello es efectivo.

## **5. CONCLUSIONES**

1. El gen **VvPSZ3** aislado y caracterizado en este estudio, codifica para una proteína con características de FT, que posee tres motivos “**zinc finger**”, una señal de localización nuclear (*NLS*) y un dominio EAR previamente identificado en represores de la transcripción.
2. El putativo FT VvPSZ3, es similar al factor ZAT4 de *A. thaliana*, el cual es esencial para el desarrollo y supervivencia de plantas de esta especie.
3. Durante el desarrollo reproductivo en vides, la expresión de VvPSZ3 se detecta predominantemente en flores cerradas y en bayas al estado de envero. En estos órganos los mayores niveles de expresión fueron registrados en polen y semillas, respectivamente
4. La región promotora de VvPSZ3 posee tanto sitios de unión para factores de transcripción del tipo MADS asociados tanto al desarrollo floral/frutal en vides como elementos asociados a la expresión en polen y semillas.
5. Adicionalmente, en la región promotora de VvPS3, se identificaron elementos de respuesta a diversas hormonas vegetales. Algunos de tales elementos probaron ser funcionales como lo indica la inducción de este gen en respuesta a ABA; SA y sacarosa.
6. Los genes denominados VvFSK y VvFTK, codifican para proteínas con dominios características estructurales de receptores quinasas del tipo LRR-RLK de plantas. El análisis *in silico* predice que estas proteínas se localizan en la membrana plasmática celular y que su especificidad de sustrato corresponde al de las denominadas “**Ser/Thr/Tyr kinases**”.
7. VvFSK y VvFTK poseen diferentes patrones de actividad transcripcional durante el desarrollo. VvFSK es expresado fuertemente en flores y semillas de frutos en desarrollo en tanto que la expresión de VvFTK está concentrada principalmente en inflorescencias, flores inmaduras y en zarcillos.
8. El análisis *in silico* de las secuencias promotoras de VvFSK y VvFTK, reveló la presencia elementos en *cis* reconocidos por FTs del tipo MADS, asociados al desarrollo floral/frutal en plantas, y elementos asociados a la expresión floema-específica.

9. Adicionalmente la región promotora de ambos genes contiene elementos asociados a la respuesta a azúcares. Consistente con ello, la mayor inducción de *VvFSK* y *VvFTK* en tratamientos exógenos con hormonas y moléculas elicitoras, correspondió a la registrada al tratar los tejidos con sacarosa.

10. Los niveles transcripcionales del gen *VvPSZ3* en tejidos florales inmaduros y maduros son notablemente más altos en Cabernet Sauvignon que en Carménère. De manera similar, el gen *VvFSK* presentó, a través del desarrollo floral y frutal un nivel de transcrito mayor en el cultivar Cabernet Sauvignon por sobre Carménère. Estos resultados sugieren algún tipo de participación de los genes *VvPSZ3* y *VvFSK* en el desarrollo de la partenocarpia.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

- Abrash E. y Bergmann D. (2009). Asymmetric Cell Divisions: A View from Plant Development. *Developmental Cell*, 16, 783-796.
- Afzal A., Wood A. y Lightfoot D. (2008). Plant Receptor-Like Serine Threonine Kinases: Roles in Signaling and Plant Defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 21 (5), 507–517.
- Agarwal P., Kapoor S. y Tyagi A. (2011). Transcription factors regulating the progression of monocot and dicot seed development. *BioEssays*, 33 (3), 189–202.
- Almada R., Cabrera N., Casaretto J., Peña-Cortés H., Ruiz-Lara S. y González E. (2011). Epigenetic repressor-like genes are differentially regulated during grapevine (*Vitis vinifera* L.) development. *PLANT CELL REPORTS*, 30 (10), 1959-1968.
- Almada R., Cabrera N., Casaretto J., Ruiz-Lara S. y González E. (2009). VvCO and VvCOL1, two CONSTANS homologous genes, are regulated during flower induction and dormancy in grapevine buds. *PLANT CELL REPORTS*, 28 (8), 1193-1203
- Alonso-Ramírez A., Rodríguez D., Reyes D., Jiménez J., Nicolás G., López-Climent M., Gómez-Cadenas A. y Nicolás c. (2009). Evidence for a Role of Gibberellins in Salicylic Acid-Modulated Early Plant Responses to Abiotic Stress in Arabidopsis Seeds. *Plant Physiology*, 150, 1335–1344.
- Alva, O. (2011) Análisis estructural y funcional de genes para aminopropil transferasas de *Vitis vinifera*. Evaluación de su papel en el desarrollo frutal. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias mención Ingeniería Genética Vegetal. Universidad de Talca
- Antolín M., Baigorri H., De Luis I., Aguirrezábal F., Geny I., Broquedis M. y Sánchez-Díaz M. (2003). ABA during reproductive development in non-irrigated grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9, 169–176.
- Aoyama T., Dong C., Wu Y., Carabelli M., Sessa G., Ruberti I., Morelli G. y Chua N. (1995). Ectopic Expression of the Arabidopsis Transcriptional Activator Athb-1 Alters Leaf Cell Fate in Tobacco. *The Plant Cell*, 7, 1773-1785.
- Ariizumi T., Hatakeyama K., Hinata K., Sato S., Kato T., Tabata S. y Toriyama K. (2005). The HKM gene, which is identical to the MS1 gene of Arabidopsis thaliana, is essential for primexine formation and exine pattern formation. *SEXUAL PLANT REPRODUCTION*, 18 (1), 1-7.
- Bartley G. y Ishida B. (2003). Developmental gene regulation during tomato fruit ripening and in-vitro sepal morphogenesis. *BMC Plant Biology*, 3 (4).

Bate N. y Twell D. (1998). Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant Molecular Biology* , 37 (5), 859-869.

Becker A. y Theissen G. (2003). The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* , 29 (3), 464-489.

Becraft P. (2002). Receptor Kinase Signaling in Plant Development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* , 18: 163-192.

Bendtsen J., Nielsen H., von Heijne G. y Brunak S. (2004). Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* , 340, 783–795.

Berger F. y Chaudhury A. (2009). Parental memories shape seeds. *Trends in Plant Science* , 14 (10), 550-556.

Boss P., Vivier M., Matsumoto S., Dry I. y Thomas M. (2001). A cDNA from grapevine (*Vitis vinifera* L.), which shows homology to AGAMOUS and SHATTERPROOF, is not only expressed in flowers but also throughout berry development. *Plant Molecular Biology* , 45 (5), 541-553.

Boss P., Sensi E., Hua C., Davies C. y Thomas M. (2002). Cloning and characterisation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) MADS-box genes expressed during inflorescence and berry development. *Plant Science* , 162, 887-895.

Boss P., Buckeridge E., Poole A. y Thomas M. (2003). New insights into grapevine flowering. *Functional Plant Biology* , 30 (6), 593 - 606.

Bossi F., Cordoba E., Dupre P., Santos Mendoza M., San Román C. y León P. (2009). The Arabidopsis ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of ABI5 and SBE2.2 genes during sugar signaling. *The Plant Journal* , 59, 359–374.

Böttcher C., Keyzers R., Boss P. y Davies C. (2010). Sequestration of auxin by the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-1 in grape berry (*Vitis vinifera* L.) and the proposed role of auxin conjugation during ripening. *Journal of Experimental Botany* , 61 (13), 3615–3625.

Çakir B., Agasse A., Gaillard C., Saumonneau A., Delrot S. y Atanassova R. (2003). A Grape ASR Protein Involved in Sugar and Abscisic Acid Signaling. *The Plant Cell* , 15, 2165–2180.



Callejas, R., Galleguillos, M., & Benavides, C. (2004). Pérdidas de producción por fallas en la fecundación, competencia y anormal desarrollo de las bayas en vid vinifera. *Artículo de extensión. Centro de Estudio de la Vid. Universidad de Chile* , 1-10.

Calonje M., Cubas P., Martínez-Zapater J. y Carmona M. (2004). Floral Meristem Identity Genes Are Expressed during Tendril Development in Grapevine. *Plant Physiology*, 135, 1491–1501.

Carmona M., Chaïb J., Martínez-Zapater J. y Thomas M. (2008). A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. *Journal of Experimental Botany* , 59 (10), 2579–2596.

Carretero-Paulet L., Galstyan A., Roig-Villanova I., Martínez-García J., Bilbao-Castro J. y Robertson D. (2010). Genome-Wide Classification and Evolutionary Analysis of the bHLH Family of Transcription Factors in Arabidopsis, Poplar, Rice, Moss, and Algae. *Plant Physiology*, 153, 1398–1412.

Causier B., S.-S. Z. (2010). Floral organ identity: 20 years of ABCs. *Seminars in Cell & Developmental Biology* , 21, 73-79.

Chervin C. y Deluc L. (2010). Ethylene signalling receptors and transcription factors over the grape berry development: gene expression profiling. *Vitis* , 49 (3), 129–136.

Chervin C., Tira-umphon A., Terrier N., Zouine M., Severac D. y Roustan J. (2008). Stimulation of the grape berry expansion by ethylene and effects on related gene transcripts, over the ripening phase. *Physiologia Plantarum* , 134, 534–546.

Chiu W., Niwa Y., Zeng W., Hirano T., Kobayashi H. y Sheen J. (1996). Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology* , 6 (3), 325-330.

Christensen, L., Beede, R., & Peacock, W. (2006). Fall foliar sprays prevent boron-deficiency symptoms in grapes. *California agriculture*, 60(2), 100-103.

Ciampolini F., Faleri C., Di Pietro D. y Cresti M. (1996). Structural and Cytochemical Characteristics of the Stigma and Style in *Vitis vinifera* L. var. Sangiovese (Vitaceae). *Annals of Botany* , 78, 759-764.

Ciftci-Yilmaz S., Morsy M., Song L., Coutu A., Krizek B., Lewis M., Warren D., Cushman J., Connolly E. y Mittler R. (2007). The EAR-motif of the Cys2/His2-type Zinc Finger Protein Zat7 Plays a Key Role in the Defense Response of Arabidopsis to Salinity Stress. *The Journal of Biological Chemistry* , 282 (12), 9260–9268.

- Ciftci-Yilmaz S. y Mittler R. (2008). The zinc finger network of plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* , 65, 1150 – 1160.
- Cleland C. y Ajami A. (1974). Identification of the Flower-inducing Factor Isolated from Aphid Honeydew as being Salicylic Acid. *Plant Physiol.* , 54, 904-906.
- Colin L., Cholet C. y Geny L. (2002). Relationships between endogenous polyamines, cellular structure and arrested growth of grape berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research* , 8 (2), 101–108.
- Conde C., Silva P., Fontes N., Dias A., Tavares R., Sousa M., Agasse A., Delrot S. y Gerós H. (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food* , 1 (1), 1-22.
- Conrath U. (2006). Systemic Acquired Resistance. *Plant Signaling & Behavior* , 1 (4), 179-184.
- Coombe B. (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 (2), 241–250.
- Coombe B. (1992). Research on Development and Ripening of the Grape Berry. *Am. J. Enol. Vitic.* , 43 (1), 101-110.
- Coombe B. (1995). Growth Stages of the Grapevine: Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 1 (2), 104-110.
- Coombe B. y Hale R. (1973). The Hormone Content of Ripening Grape Berries and the Effects of Growth Substance Treatments. *Plant Physiol.* , 51 (14), 629–634.
- Coombe B. y McCarthy M. (2000). Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6 (2), 131–135.
- Cuming A., Cho S., Kamisugi Y., Graham H. y Quatrano R. (2007). Microarray analysis of transcriptional responses to abscisic acid and osmotic, salt, and drought stress in the moss, *Physcomitrella patens*. *New Phytologist* , 176, 275–287.
- Cutler S., Rodriguez P., Finkelstein R. y Abrams S. (2010). Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annu. Rev. Plant Biol.* , 61, 651–679.
- Dathan N., Zaccaro L., Esposito S., Isernia C., Omichinski J., Riccio A., Pedone C., Di Blasio B., Fattorusso R. y Pedone P. (2002). The Arabidopsis SUPERMAN protein is able to specifically bind DNA through its single Cys2–His2 zinc finger motif. *Nucl. Acids Res.* , 30 (22), 4945-4951.

Dauelsberg P., Matus J., Poupin M., Leiva-Ampuero A., Godoy F., Vega A. y Arce-Johnson P. (2011). Effect of pollination and fertilization on the expression of genes related to floral transition, hormone synthesis and berry development in grapevine. *Journal of Plant Physiology*, 168, 1667– 1674.

De Pater S., Katagiri F., Kijne, J. y Chua N. (1994). bZIP proteins bind to a palindromic sequence without an ACGT core located in a seed-specific element of the pea lectin promoter. *Plant Journal*. 6. 133-140.

De Smet I., Lau S., Mayer U. y Jürgens G. (2010). Embryogenesis – the humble beginnings of plant life. *The Plant Journal*, 61, 959–970.

De Smet I., Voß U., Jürgens G. y Beeckman T. (2009). Receptor-like kinases shape the plant. *Nature cell biology*, 11 (9), 1166-1173.

Deluc L., Grimplet J., Wheatley M., Tillett R., Quilici D, Osborne C., Schooley D., Schlauch K., Cushman J. y Cramer G. (2007). Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC Genomics*, 8 (429).

Dong C. y Liu J. (2010). The Arabidopsis EAR-motif-containing protein RAP2.1 functions as an active transcriptional repressor to keep stress responses under tight control. *BMC Plant Biology*, 10 (47).

Dauelsberg, P.; Matus, J.; Poupin, M.; Leiva-Ampuero, A.; Godoy, F.; Vega, A.; Arce-Johnson, P. (2011). Effect of pollination and fertilization on the expression of genes related to floral transition, hormone synthesis and berry development in grapevine. *Journal of Plant Physiology*, 168, 1667– 1674.

Dumas C. y Rogowsky P. (2008). Fertilization and early seed formation. *C. R. Biologies*, 331, 715–725.

El-Kereamy A., Chervin C., Roustan J., Cheynier, Souquet J., Moutounet M., Raynal J., Ford C., Latché A., Pech J. y Bouzayen M. (2003). Exogenous ethylene stimulates the long-term expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grape berries. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM*, 119, 175–182.

Englbrecht C., Schoof H. y Böhm S. (2004). Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the Arabidopsis thaliana genome. *BMC Genomics*, 5 (39).

Ezcurra I., Ellerström M., Wycliffe P., Stålberg K. y Rask L. (1999). Interaction between composite elements in the napA promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the

RY/G complex are necessary for seed-specific expression. *Plant Molecular Biology* , 40 (4), 699-709.

Ferrández C., Pelaz S. y Yanofsky M. (1999). Control of carpel and fruit development in arabidopsis. *Annu. Rev. Biochem.* , 68, 321–354.

Ferreira F. y Kieber J. (2005). Cytokinin signaling. *Current Opinion in Plant Biology* , 8, 518–525.

Finkelstein R., Gampala S. y Rock C. (2002). Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings. *The Plant Cell* , S15–S45.

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*.

Friedrichsen D., Joazeiro C., Li J., Hunter T. y Chory J. (2000). Brassinosteroid-Insensitive-1 Is a Ubiquitously Expressed Leucine-Rich Repeat Receptor Serine/Threonine Kinase. *Plant Physiology* , 123, 1247–1255.

Friend A., Trought M y Creasy G. (2009). The influence of seed weight on the development and growth of berries and live green ovaries in *Vitis vinifera* L. cvs. Pinot Noir and Cabernet Sauvignon. *Australian Journal of Grape and Wine Research* , 15 (2), 166–174.

Gainza-Cortés F., Pérez-Díaz R., Pérez-Castro R., Tapia J., Casaretto J., González S., Peña-Cortés H., Ruiz-Lara S. y González E. (2012). Characterization of a putative grapevine Zn transporter, VvZIP3, suggests its involvement in early reproductive development in *Vitis vinifera* L. *BMC Plant Biology*, 12:111.

Gambino G., Minuto M., Boccacci P., Perrone I., Vallania R. y Gribaudo I. (2010). Characterization of expression dynamics of WOX homeodomain transcription factors during somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. *Journal of Experimental Botany* , 62 (3), 1089–1101.

García D., Saingery V., Chambrier P., Mayer U., Jürgens G. y Berger F. (2003). Arabidopsis haiku Mutants Reveal New Controls of Seed Size by Endosperm. *Plant Physiology* , 131, 1661–1670.

García D., Fitz Gerald J. y Berger F. (2005). Maternal Control of Integument Cell Elongation and Zygotic Control of Endosperm Growth Are Coordinated to Determine Seed Size in Arabidopsis. *The Plant Cell*, Vol. 17, , 17, 52–60.

Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D. y Bairoch A. (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* , 31, 3784-3788.

Germain H., Gray-Mitsumune M., Lafleur E. y Matton D. (2008). ScORK17, a transmembrane receptor-like kinase predominantly expressed in ovules is involved in seed development. *Planta*, 228 (5), 851–862.

Gibson S. (2004). Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *Journal of Experimental Botany* , 55 (395), 253-264.

Gifford M., Dean S. y Ingram W. (2003). The Arabidopsis ACR4 gene plays a role in cell layer organisation during ovule integument and sepal margin development. *Development* , 130, 4249-4258.

Giovannoni J. (2004). Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. *The Plant Cell* , 16, S170–S180.

Giraudat, J. (2003). Practical Course on Genetic and Molecular Analysis of Arabidopsis. Mapping mutations using molecular markers. *EMBO COURSE*.

Giribaldi M., Perugini I., Sauvage F. y Schubert A. (2007). Analysis of protein changes during grape berry ripening by 2-DE and MALDI-TOF. *Plant Proteomics*, 7 (17), 3154-3170.

Gobierno de Chile. Ministerio de Agricultura. Servicio Agrícola y Ganadero. (2008). Informe Ejecutivo. Catastro Vitícola Nacional. SAG, División de Protección Agrícola y Forestal Subdepartamento de Viñas y Vinos.

Gómez-Gómez L. y Boller T. (2000). FLS2: An LRR Receptor-like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in Arabidopsis. *Molecular cell* , 5 (6), 1003–1011.

Gong J., Wei T., Jamitzky F., Heckl W., Rössle S y Stark R. (2010). TollML: a Database of Toll-like Receptor Structural Motifs. *Journal of Molecular Modeling* , 16 (7), 1283-2389.

Gordon S., Chickarmane V., Ohno C. y Meyerowitz E. (2009). Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the Arabidopsis shoot meristem. *PNAS* , 106 (38), 16529–16534.

Görtürkt Baydar N. y Harmankaya N. (2005). Changes in Endogenous Hormone Levels during the Ripening of Grape Cultivars Having Different Berry Set Mechanisms. *Turk J Agric For* , 29, 205-210.

Gourcilleau D., Lenne C., Armenise C., Moulia B., Julien J., Bronner G. y Leblanc-Fournier N. (2011). Phylogenetic Study of Plant Q-type C2H2 Zinc Finger Proteins and Expression Analysis of Poplar Genes in Response to Osmotic, Cold and Mechanical Stresses. *DNA RESEARCH* , 18, 77–92.

Grigg S., Galinha C., Kornet N., Canales C., Scheres B. y Tsiantis M. (2009). Repression of Apical Homeobox Genes Is Required for Embryonic Root Development in Arabidopsis. *Current Biology* , 19, 1485–1490.

Grimplet J., Deluc L., Tillett R., Wheatley M., Schlauch K., Cramer G. y Cushman J. (2007). Tissue-specific mRNA expression profiling in grape berry tissues. *BMC Genomics*, 8 (187).

Gutierrez L., Van Wuytswinkel O., Castelain M. y Bellini C. (2007). Combined networks regulating seed maturation. *Trends in Plant Science* , 12 (7), 294-300.

Hardie, W. J. (2000). Grapevine biology and adaptation to viticulture. *Australian Journal of Grape and Wine Research* , 6, 74–81.

Heazlewood J. y Wilson S. (2004). Anthesis, pollination and fruitset in Pinot Noir. *Vitis* , 43 (2), 65–68.

Hibi T., Kosugi S., Iwai T., Kawata M., Seo S., Mitsuhashi I. y Ohashi Y. (2007). Involvement of EIN3 homologues in basic PR gene expression and flower development in tobacco plants. *Journal of Experimental Botany*, 58 (13), 3671–3678.

Higginson ., Li S. y Parish R. (2003). AtMYB103 regulates tapetum and trichome development in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* , 35 (2), 77–192.

Higo K., Ugawa Y., Iwamoto M. y Korenaga T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucl. Acids Res.* , 27 (1), 297-300.

Hiratsu K., Mitsuda N., Matsui K. y Ohme-Takagi M. (2004). Identification of the minimal repression domain of SUPERMAN shows that the DLELRL hexapeptide is both necessary and sufficient for repression of transcription in Arabidopsis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 321, 172–178.

Holdsworth M., Bentsink L. y Soppe W. (2008). Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist* , 179 (1), 33–54.

Hord C., Chen C, DeYoung B., Clark S. y Ma H. (2006). The BAM1/BAM2 Receptor-Like Kinases Are Important Regulators of Arabidopsis Early Anther Development. *The Plant Cell* , 18, 1667–1680.

Horton P., Park K., Obayashi T., Fujita N., Harada H., Adams-Collier C. y Nakai k. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucl. Acids Res.* , 35, W585-W587.

Horvath D. (2009). Common mechanisms regulate flowering and dormancy. *Plant Science* , 177 (6), 523–531.

Hubbard K., Nishimura N., Hitomi K., Getzoff E. y Schroeder J. (2010). Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *GENES & DEVELOPMENT* , 24, 1695–1708.

Hunter S., Apweiler R., Attwood T., Bairoch A., Bateman A., Binns D., Bork P., Das U., Daugherty L., Duquenne L., Finn R., Gough J., Haft D., Hulo N., Kahn D., Kelly E., Laugraud A., Letunic I., Lonsdale D., Lopez R., Madera M., Maslen J., McAnulla C., Mc. (2009). InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Research*. 37, D211-D215.

Inaba A., Ishida M. y Sobajima Y. (1976). Changes in Endogenous Hormone Concentrations during Berry Development in Relation to the Ripening of Delaware Grapes. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* , 45 (3), 245-252.

Irish, V. The flowering of Arabidopsis flower development. *The Plant Journal* , 61, 1014–1028.

Isalan M., Klug A. y Choo Y. (1998). Comprehensive DNA Recognition through Concerted Interactions from Adjacent Zinc Fingers. *Biochemistry* , 37, 12026-12033.

Ito H., Motomura Y., Konno Y. Hatayama T. (1969). Exogenous Gibberellin as Responsible for the Seedless Berry Development of Grapes I. Physiological Studies on the Development of Seedless Delaware Grapes. *Tohoku journal of agricultural research* , 20 (1).

Ito T. y Shinozaki K. (2002). The MALE STERILITY1 Gene of Arabidopsis, Encoding a Nuclear Protein with a PHD-finger Motif, is Expressed in Tapetal Cells and is Required for Pollen Maturation. *Plant Cell Physiol* , 43 (11), 1285-1292.

Ito T., Nagata N., Yoshiba Y., Ohme-Takagi M., Ma H. y Shinozakif K. (2007). Arabidopsis MALE STERILITY1 Encodes a PHD-Type Transcription Factor and Regulates Pollen and Tapetum Development. *The Plant Cell* , 19, 3549–3562.

Jack, T. (2004). Molecular and Genetic Mechanisms of Floral Control. *The Plant Cell*, 16, S1–S17.

- Jaillais Y., Hothorn M., Belkhadir Y., Dabi T., Nimchuk Z., Meyerowitz E. y Chory J. (2011). Tyrosine phosphorylation controls brassinosteroid receptor activation by triggering membrane release of its kinase inhibitor. *Genes & Dev.*, 25: 232-237.
- Jenkins T., Li J., Scutt C. y Gilmartin P. (2005). Analysis of members of the *Silene latifolia* Cys2/His2 zinc-finger transcription factor family during dioecious flower development and in a novel stamen-defective mutant *ssf1*. *Planta*, 220: 559.
- Jeong S., Goto-Yamamoto N., Kobayashi S. y Esaka M. (2004). Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science* , 167, 247–252.
- Johannesson H., Wang Y., Hanson J. y Engström P. (2003). The *Arabidopsis thaliana* homeobox gene ATHB5 is a potential regulator of abscisic acid responsiveness in developing seedlings. *Plant Molecular Biology*. 51, 719–729.
- Joly D., Perrin M., Gertz C., Kronenberger J., Demangeat G. y Masson J. (2004). Expression analysis of flowering genes from seedling-stage to vineyard life of grapevine cv. Riesling. *Plant Science*, 166 (6), 1427–1436.
- K. MORI, H. SAITO, N. GOTO-YAMAMOTO, M. KITAYAMA, S. KOBAYASHI, S. SUGAYA, H. GEMMA y K. HASHIZUME. (2005). Effects of abscisic acid treatment and night temperatures on anthocyanin composition in Pinot noir grapes. *Vitis* , 44 (4), 161–165.
- Käll L., Krogh A. y Sonnhammer E. (2004). A Combined Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Method. *Journal of Molecular Biology* , 338 (5), 1027-1036.
- Kang H y Singh K. (2000). Characterization of salicylic acid-responsive, Arabidopsis Dof domain proteins: overexpression of OBP3 leads to growth defects. *The Plant Journal* , 21 (4), 329–339.
- Kapoor S., Kobayashi A. y Takatsuji H. (2002). Silencing of the Tapetum-Specific Zinc Finger Gene TAZ1 Causes Premature Degeneration of Tapetum and Pollen Abortion in Petunia. *Plant Cell* , 14, 2353–2367.
- Kaufmann K., Pajoro A. y Angenent G. (2010). Regulation of transcription in plants: mechanisms controlling developmental switches. *Nature Reviews Genetics* , 11, 830–842.
- Kaufmann K., Wellmer F., Muiño J., Ferrier T., Wuest S., Kumar W., Serrano-Mislata A., Madueño F., Krajewski P., Meyerowitz E., Angenent G. y Riechmann J. (2010). Orchestration of Floral Initiation by APETALA 1. *Science* , 328, 85-89.



Keller M. (2005). Deficit Irrigation and Vine Mineral Nutrition. *Am J Enology Viticulture*, 56(3):267–283.

Kennedy J., Matthews M y Waterhouse A. (2000). Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*, 55, 77-85.

Kevany B., Tieman D., Taylor M., Dal Cin V y Klee H. (2007). Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. *The Plant Journal*, 51, 458–467.

Kim T., Guan S., Sun Y., Deng Z., Tang W., Shang J., Sun Y., Burlingame A. y Wang Z. (2009). Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nature Cell Biology*, 11, 1254–1260.

Kim T. y Wang Z. (2010). Brassinosteroid Signal Transduction from Receptor Kinases to Transcription Factors. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61, 681–704.

Klosterman S., Choi J. y Hadwiger L. (2003). Analysis of pea HMG-I/Y expression suggests a role in defence gene regulation. *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY*. 4 (4), 249–258.

Klug A. (2010). The Discovery of Zinc Fingers and Their Applications in Gene Regulation and Genome Manipulation. *Annu. Rev. Biochem.*, 79, 213–231.

Klug A. y Schwabe J. (1995). Zinc fingers. *The FASEB journal*, 9, 597-604.

Komeda Y. (2004). Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*. *Annu. Rev. Plant Biol.* *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 521–535.

Kondo S. y Kawai M. (1998). Relationship between Free and Conjugated ABA Levels in Seeded and Gibberellin-treated Seedless, Maturing 'Pione' Grape Berries. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123 (5), 750-754.

Kramer E. y Hall J. (2005). Evolutionary dynamics of genes controlling floral development. *Current Opinion in Plant Biology*, 8 (1), 13-18.

Krogh A., Larsson B., von Heijne G. y Sonnhammer E. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305 (3), 567–580.

Kubo K., Sakamoto A., Kobayashi A., Rybka Z., Kanno Y., Nakagawa H., Nishino T. y Takatsuji H. (1998). Cys2/His2 zinc-finger protein family of petunia: evolution and general mechanism of target-sequence recognition. *Nucleic Acids Research*, 26 (2), 608–615.

- Kubo K., Kanno Y., Nishino T. y Takatsuji H. (2000). Zinc-Finger Genes That Specifically Express in Pistil Secretory Tissues of Petunia. *Plant Cell Physiol.* , 41 (3), 377-382.
- Kuhn N. y 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: 7–11.
- Kurup S., Jones H. y Holdsworth M. (2000). Interactions of the developmental regulator ABI3 with proteins identified from developing Arabidopsis seeds. *The Plant Journal* , 21 (2), 143–155.
- Lau S., Slane D., Herud O., Kong J. y Jürgens G. (2012). Early Embryogenesis in Flowering Plants: Setting Up the Basic Body Pattern. *Annu. Rev. Plant Biol.* , 63, 6.1–6.24.
- Lebon, G. Wojnarowicz G., Holzapfel B., Fontaine F., Vaillant-Gaveau N. y Clement C. Sugars and flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). (2008). *Journal of Experimental Botany*, 59 (10), 2565–2578.
- Le B., Cheng C., Bui a., Wagmaister J., Henry K., Pelletier J., Kwong I., Belmonte m., Kirkbride R., Horvath s., Drews g., Fischer r., Okamura J., Harada J. y Goldberg R. (2010). Global analysis of gene activity during Arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors. *PNAS* , 107 (18), 8063–8070.
- Lee K., Piao H., Kim H., Choi S., Jiang F., Hartung W., Hwang I., Kwak J., Lee I. y Hwang I. (2006). Activation of Glucosidase via Stress-Induced Polymerization Rapidly Increases Active Pools of Abscisic Acid. *Cell* , 126, 1109–1120.
- Leibfried A., To J., .Wolfgang Busch, Sandra Stehling, Andreas Kehle, Monika Demar, Joseph J. Kieber & Jan U. Lohmann. (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* , 438 (22), 1172-1175.
- Leivar P., González V., Castel S., Trelease R., López-Iglesias C., Arró M., Boronat A., Campos N., Ferrer A. y Fernández-Busquets X. (2005). Subcellular Localization of Arabidopsis 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase. *Plant Physiology* , 137, 57–69.
- Li J. (2011). Direct involvement of leucine-rich repeats in assembling ligand-triggered receptor–coreceptor complexes. *PNAS* , 108 (20), 8073–8074.
- Li S., Iacuone S. y Parish R. (2007). ?12PSBRO© 4IBolerx2a i6lf2ng0ngco70ki0tgurn- 0wd7B7a I7,FaSuppression and restoration of male fertility using a transcription factor. *Plant Biotechnology Journal* , 5, 297–312.

- Long J. y Barton M. (1998). The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis*. *Development*, 125, 3027-3035.
- Loreti E., Povero G., Novi G., Solfanelli C., Alpi A. y Perata P. (2008). Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 179 (4), 1004-1016.
- Maeo K., Tomiya T., Hayashi K., Akaike M., Morikami A., Ishiguro S y Nakamura K. (2001). Sugar-responsible elements in the promoter of a gene for  $\beta$ -amylase of sweet potato. *Plant Molecular Biology*, 46, 627–637.
- Maillot P., Lebel S., Schellenbaum P., Jacques A. y Walter B. (2009). Differential regulation of SERK, LEC1-Like and Pathogenesis-Related genes during indirect secondary somatic embryogenesis in grapevine. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 743–752.
- Martínez C., Pons E., Prats y León J. (2004). Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *The Plant Journal*, 37 (2), 209–217.
- Martínez de Toda, F. 1991. Biología de la Vid. Fundamentos biológicos de la viticultura. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Martínez-Esteso M., Sellés-Marchart S., Lijavetzky D., Pedreño M. y Bru-Martínez R. (2011). A DIGE-based quantitative proteomic analysis of grape berry flesh development and ripening reveals key events in sugar and organic acid metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 62 (8), 2521–2569.
- Michaels S. (2009). Flowering time regulation produces much fruit. *Current Opinion in Plant Biology*, 12 (1), 75-80.
- Mitsuda N. y Ohme-Takagi M. (2009). Functional Analysis of Transcription Factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.*, 50 (7), 1232–1248.
- Mittler R., Kim Y., Song L., Coutu J., Coutu A., Ciftci-Yilmaz S., Lee H., Stevenson B. y Zhu J. (2006). Gain- and loss-of-function mutations in *Zat10* enhance the tolerance of plants to abiotic stress. *FEBS Letters*, 580, 6537–6542.
- Mizuno S., Osakabe Y., Maruyama K., Ito T., Osakabe K., Sato T., Shinozaki K. y Yamaguchi-Shinozaki K. (2007). Receptor-like protein kinase 2 (RPK 2) is a novel factor controlling anther development in *Arabidopsis thaliana*.
- Moreno Y. y Vallarino J. (2011). Manual de consulta de cultivares y portainjertos de vides para vinificación. (1st ed.). Universidad de Talca.

- Morikami A., Matsunaga R., Tanaka Y., Suzuki S., Mano S. y Nakamura K. (2005). Two cis-acting regulatory elements are involved in the sucrose-inducible expression of the sporamin gene promoter from sweet potato in transgenic tobacco. *Mol Gen Genomics*, 272, 690–699.
- Mullins, M., Bouquet, A. y Williams, L. (1992). *Biology of the Grapevine*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Nemhauser J., Hong F. y Chory J. (2006). Different Plant Hormones Regulate Similar Processes through Largely Nonoverlapping Transcriptional Responses. *Cell*, 126, 467–475.
- Nesi N., Debeaujon I., Janda ., Stewart A., Jenkins G., Caboche M. y Lepiniec L. (2002). The TRANSPARENT TESTA16 Locus Encodes the ARABIDOPSIS BSISTER MADS Domain Protein and Is Required for Proper Development and Pigmentation of the Seed Coat. *The Plant Cell*, 14.
- Nodine M., Bryan A., Racolta A., Jerosky K. y Tax F. (2011). A few standing for many: embryo receptor-like kinases. *Trends in Plant Science*, 16 (4), 211-217.
- Obenauer J., Cantley L. y Yaffe M. (2003). Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res.*, 31 (13), 3635-3641.
- Ohta M., Matsui K., Hiratsu K., Shinshi H. y Ohme-Takagi M. (2001). Repression Domains of Class II ERF Transcriptional Repressors Share an Essential Motif for Active Repression. *The Plant Cell*, 13, 1959–1968.
- Ohta M., Ohme-Takagi M. y Shinshi H. (2000). Three ethylene-responsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions. *The Plant Journal*, 22 (1), 29–38.
- Ohto M., Fischer R., Goldberg R., Nakamura K. y Harada J. (2005). Control of seed mass by APETALA2. *PNAS*, 102 (8), 3123–3128.
- Ohto M., Floyd S., Fischer R., Goldberg R. y Harada J. (2009). Effects of APETALA2 on embryo, endosperm, and seed coat development determine seed size in Arabidopsis. *Sex Plant Reprod*, 22, 277–289.
- Olimpieri I., Siligato F., Caccia R., Soressi G., Mazzucato A., Mariotti L. y Ceccarelli N. (2007). Tomato fruit set driven by pollination or by the parthenocarpic fruit allele are mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis. *Planta*, 226 (4), 877-888.
- Öpik H. y Rolfe S. (2005). Reproductive development. En *The Physiology of Flowering Plants* (págs. 270-281). Cambridge University Press.

Owen S., Lafond M., Bowen P., Bogdanoff , Usher K. y Abrams S. (2009). Profiles of Abscisic Acid and Its Catabolites in Developing Merlot Grape (*Vitis vinifera*) Berries. *Am. J. Enol. Vitic.* , 60 (3), 277-284.

Ozga J. y Reinecke D. (2003). Hormonal Interactions in Fruit Development. *J Plant Growth Regul* , 22, 73–81.

Ozga J., Yu J. y Reinecke D. (2003). Pollination-, Development-, and Auxin-Specific Regulation of Gibberellin 3B-Hydroxylase Gene Expression in Pea Fruit and Seeds. *Plant Physiology* , 131, 1137–1146.

Paiejwala V., Parikli H. y Modi V. (1985). The role of abscisic acid in the ripening of grapes. *PHYSIOL. PLANT.* , 65, 498-502.

Pan Q., Li M., Peng C., Zhang N., Zou X., Zou K., Wang X., Yu X., Wang X. y Zhang D. (2005). Abscisic acid activates acid invertases in developing grape berry. *Physiologia Plantarum* , 125, 157–170.

Pavletich N. y Pabo C. (1991). Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* , 252 (5007), 809-817.

Penfield S., Li Y., Gilday A., Graham S. y Graham I. (2006). Arabidopsis ABA INSENSITIVE4 Regulates Lipid Mobilization in the Embryo and Reveals Repression of Seed Germination by the Endosperm. *The Plant Cell* , 18, 1887–1899.

Peña-Cortés H et al. (2005). Chilean Effort for Improving Fruit Quality in Grapevine: A Genomic Approach to Understanding Seed Formation, Fruit Ripening and Pathogen Response. *Acta Horticulturae*, 689:505

Perales M. y Reddy V. (2012). Stem cell maintenance in shoot apical meristems. *Current Opinion in Plant Biology*, 15 (1), 10-16.

Pérez F. y Gómez M. (2000). Possible role of soluble invertase in the gibberellic acid berry-sizing effect in Sultana grape. *Plant Growth Regulation* , 30, 111–116.

Pérez F., Viani C. y Retamales J. (2000). Bioactive Gibberellins in Seeded and Seedless Grapes: Identification and Changes in Content During Berry Development. *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol. 51, No. 4 , 51 (4), 315-318.

Posé D., Yant L. y Schmid M. (2012). The end of innocence: flowering networks explode in complexity. *Current Opinion in Plant Biology* , 15, 45-50.

- Poupin M., Federici F., Medina C., Matus J., Timmermann T. y Arce-Johnson P. (2007). Isolation of the three grape sub-lineages of B-class MADS-box TM6, PISTILLATA and APETALA3 genes which are differentially expressed during flower and fruit development. *Gene*, 404, 10–24.
- Prasad K., Zhang X., Tobón E. y Ambrose B. (2010). The Arabidopsis B-sister MADS-box protein, GORDITA, represses fruit growth and contributes to integument development. *The Plant Journal*, 62, 203–214.
- Pratt, C. (1971). Reproductive Anatomy in Cultivated Grapes - A Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 22 (2), 92-109.
- Prigge M., Otsuga D., Alonso J., Ecker J., Drews G. y Clark S. (2005). Class III Homeodomain-Leucine Zipper Gene Family Members Have Overlapping, Antagonistic, and Distinct Roles in Arabidopsis Development. *The Plant Cell*, 17, 61–76.
- Pszczółkowski, P. (2004). La invención del cv. Carménère (Vitis vinifera L) en Chile, desde la mirada de uno de sus actores. *Universum*, 2 (19), 150 - 165.
- Purves W., Sadava D., Orians G. y Heller H. (2003). Plant Responses to Environmental Challenges. En *Life: The Science of Biology*. (págs. 749-764).
- Rajjou L., Belghazi M., Huguet R., Robin C., Moreau A., Job C. y Job D. (2006). Proteomic Investigation of the Effect of Salicylic Acid on Arabidopsis Seed Germination and Establishment of Early Defense Mechanisms. *Plant Physiology*, 141, 910–923.
- Rate Dc. y Greenberg J. (2001). The Arabidopsis aberrant growth and death2 mutant shows resistance to Pseudomonas syringae and reveals a role for NPR1 in suppressing hypersensitive cell death. *The Plant Journal*, 27 (3), 203-211.
- Reid, K., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., & Lund, S. (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology*, 6 (27).
- Reynolds A., Wardle D., Zurowski C. y Looney N. (1992). Phenylureas CPPU and Thidiazuron Affect Yield Components, Fruit Composition, and Storage Potential of Four Seedless Grape Selections. *J. AMER. Soc. HORT. SCI.*, 117 (1), 85-89.
- Ristic R. e Iland P. (2005). Relationships between seed and berry development of Vitis Vinifera L. cv Shiraz: Developmental changes in seed morphology and phenolic composition. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11 (1), 43–58.

- Roby G y Matthews M. (2004). Relative proportions of seed, skin and flesh, in ripe berries from Cabernet Sauvignon grapevines grown in a vineyard either well irrigated or under water deficit. *Australian Journal of Grape and Wine Research* , 10 (1), 74–82.
- Rock C. (2000). Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytol.* , 148, 357-396.
- Ru D., Hai-peng J., Zeng W., Perl A., Hai-ying X, Wen Z., Shang-wu C. y Hui-qin M. (2011). Cloning and Characterization of WOX4 Gene from *Vitis vinifera* L. Involved in Stem Cell Regulation. *Agricultural Sciences in China* , 10 (12), 1861-1871.
- Rudrabhatla P., Reddy M. y Rajasekharan R. (2006). Genome-Wide Analysis and Experimentation of Plant Serine/ Threonine/Tyrosine-Specific Protein Kinases. *Plant Molecular Biology*, 60 (2), 293–319.
- Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cazares B., Ham B., Li G. y Lucas W. (2011). Vascular expression in *Arabidopsis* is predicted by the frequency of CT/GA-rich repeats in gene promoters. *The Plant Journal* , 67, 130–144.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* , 4 (4), 406-425.
- Sakamoto H., Maruyama K., Sakuma Y., Meshi T., Iwabuchi M., Shinozaki K. y Yamaguchi-Shinozaki K. (2004). *Arabidopsis* Cys2/His2-Type Zinc-Finger Proteins Function as Transcription Repressors under Drought, Cold, and High-Salinity Stress Conditions. *Plant Physiology* , 136, 2734–2746.
- Sandelin A., A. W. (2004). JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucl. Acids Res.* , 32, D91-D94.
- Santos-Mendoza M., Dubreuc B., Baud S., Parcy F., Caboche M. y Lepiniec L. (2008). Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* , 54, 608–620.
- Schiefthaler U., Balasubramanian S., Sieber P., Chevalier D., Wisman E. y Schneitz K. (1999). Molecular analysis of NOZZLE, a gene involved in pattern formation and early sporogenesis during sex organ development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 96, 11664–11669.
- Shiu S., Karlowski W., Pan R., Tzeng Y., Mayer K., y Lia W. (2004). Comparative Analysis of the Receptor-Like Kinase Family in *Arabidopsis* and Rice. *The Plant Cell* , 16, 1220–1234.

- Schneiderei A., Imlau A. y Sauer N. (2008). Conserved cis-regulatory elements for DNA-binding-with-one-Winger and homeo-domain-leucine-zipper transcription factors regulate companion cell-specific expression of the Arabidopsis thaliana SUCROSE TRANSPORTER 2 gene. *Planta* , 228, 651–662.
- Schruff M., Spielman M., Tiwari S., Adams S., Fenby N. y Scott R. (2005). The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of Arabidopsis links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development* , 133, 251-261.
- Schultz J., Milpetz F., Bork P. y Ponting C. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *PNAS* , 95 (11), 5857-5864.
- Shatkay H., Höglund A., Brady S., Blum T., Dönnies P., y Kohlbacher O. (2007). SherLoc: High-Accuracy Prediction of Protein Subcellular Localization by Integrating Text and Protein Sequence Data. *Bioinformatics* , 23 (11), 1410-1417.
- Simon M., Lee M., Lin Y., Gish L. y Schiefelbein J. (2007). Distinct and overlapping roles of single-repeat MYB genes in root epidermal patterning. *Developmental Biology* , 311, 566–578.
- Skinner D. J., Hill, T. A. y Gasser, C. S. (2004). Regulation of ovule development. *Plant Cell* 16, S32 -S45.
- Soltis D., Chanderbali A., Kim S., Buzgo M. y Soltis P. (2007). The ABC Model and its Applicability to Basal Angiosperms. *Annals of Botany* , 100 (2), 155-163.
- Staudt G. y Kassemeyer H. (1984). Do small berries in *Vitis vinifera* originates by parthenocarpy? *Vitis* , 23, 205-213.
- Staudt, G. (1999). Opening of flowers and time of anthesis in grapevines, *Vitis vinifera* L. *Vitis*, 38 (1), 15-20.
- Steenkamp, J., Wild, I., Lourens, A., & Helden, P. v. (1994). Improved Method for DNA Extraction From *Vitis vinifera*. *American Journal of Enology and Viticulture* , 45, 102-106.
- Stoll M., Loveys B. y Dry P. (2000). Hormonal changes induced by partial rootzone drying of irrigated grapevine. *J. Exp. Bot.* , 51 (350), 1627-1634.
- Sun L., Zhang M., Ren J., Qi J., Zhang J. y Leng P. (2010). Reciprocity between abscisic acid and ethylene at the onset of berry ripening and after harvest. *BMC Plant Biology* , 10 (257).



- Sun X., Shantharaj D., Kang Z. y Ni M. (2010). Transcriptional and hormonal signaling control of Arabidopsis seed development. *Current Opinion in Plant Biology* , 13, 611–620.
- Sun Y., Hord C., Chen C. y Ma H. (2007). Regulation of Arabidopsis Early Anther Development by Putative Cell-Cell Signaling Molecules and Transcriptional Regulators. *Journal of Integrative Plant Biology* , 49 (1), 60–68.
- Suzuki M. y McCarty D. (2008). Functional symmetry of the B3 network controlling seed development. *Current Opinion in Plant Biology* , 11, 548–553.
- Symons G., Davies C., Shavrukov Y., Dry I., Reid J. y Thomas M. (2006). Grapes on Steroids. Brassinosteroids Are Involved in Grape Berry Ripening. *Plant Physiology* , 140, 150–158.
- Szemenyei H., Hannon M. y Long J. (2008). TOPLESS Mediates Auxin-Dependent Transcriptional Repression During Arabidopsis Embryogenesis. *Science* , 319, 1384-1386.
- Taiz L. y Zeiger E. (2002). *Plant Physiology*.
- Takatsuji H. (1999). Zinc-finger proteins: the classical zinc finger emerges in contemporary plant science. *Plant Molecular Biology* , 39, 1073–1078.
- Takatsuji H. (1998). Zinc-finger transcription factors in plants. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* , 54, 582–596.
- Takeno K., Koshioka M., Pharis R., Rajasekaran K. y Mullins M. (1983). Endogenous Gibberellin-Like Substances in Somatic Embryos of Grape (*Vitis vinifera* × *Vitis rupestris*) in Relation to Embryogenesis and the Chilling Requirement for Subsequent Development of Mature Embryos. *Plant Physiol.* , 73, 803-808.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., and Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* , 24, 1596-1599.
- Thompson J., Gibson T., Plewniak F., Jeanmougin F. and Higgins D. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* , 25, 4876-4882.
- Tiedemann J., Rutten T., Mönke G., Vorwieger A., Rolletschek H., Meissner D., Milkowski C., Petereck S., Mock H., Zank T. y Bäumlein H. (2008). Dissection of a complex seed phenotype: Novel insights of FUSCA3 regulated developmental processes. *Developmental Biology* , 317, 1–12.

Van Huizen R., Ozga J., Reinecke D., Twitchin B. y Mander L. (1995). Seed and 4-Chloroindole-3-Acetic Acid Regulation of Cibberellin Metabolism in Pea Pericarp. *Plant Physiol.* , 109, 1213-1217.

Vasconcelos M., Greven M., Winefield C., Trought M. y Raw V. (2009). The Flowering Process of *Vitis vinifera*: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* , 60 (4), 411-434.

Verdier J. y Thompson R. (2008). Transcriptional Regulation of Storage Protein Synthesis During Dicotyledon Seed Filling. *Plant Cell Physiol.* , 49 (9), 1263–1271.

Vlot A., Dempsey D. y Klessig D. (2009). Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* , 47, 177–206.

von Heijne, G. (1992). Membrane Protein Structure Prediction: Hydrophobicity Analysis and the 'Positive Inside' Rule. *J.Mol.Biol.* , 225, 487-494.

Wang A., Garcia D., Zhang H., Feng K., Chaudhury A., Berger F., Peacock W., Dennis E. y Luo M. (2010). The VQ motif protein IKU1 regulates endosperm growth and seed size in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* , 63, 670–679.

Wang Z., Zhao F, Zhao X., Ge H., Chai L., Chen S., Perl A. y Ma H. (2012). Proteomic analysis of berry-sizing effect of GA3 on seedless *Vitis vinifera* L. *Proteomics* , 12, 86–94.

Wang, H.; Schauer, N.; Usadel, B.; Frasse, P.; Zouine, M.; Hernould, M.; Latche, A.; Pech, J.; Fernie, A.; Bouzayen, M. (2009). Regulatory Features Underlying Pollination-Dependent and -Independent Tomato Fruit Set Revealed by Transcript and Primary Metabolite Profiling. *The Plant Cell* , 21, 1428–1452.

Wawrzynska A., Lewandowska M. y Sirko A. (2010). *Nicotiana tabacum* EIL2 directly regulates expression of at least one tobacco gene induced by sulphur starvation. *Journal of Experimental Botany*, 61 (3), 889–900.

Weber H., Borisjuk L. y Wobus U. (2005). Molecular Physiology of Legume Seed Development. *Annu. Rev. Plant Biol.* , 56, 253–79.

Wheeler S., Loveys B., Ford C. y Davies C. (2009). The relationship between the expression of abscisic acid biosynthesis genes, accumulation of abscisic acid and the promotion of *Vitis vinifera* L. berry ripening by abscisic acid. *Australian Journal of Grape and Wine Research* , 15, 195–204.

Willemsen V. y Scheres B. (2004). Mechanisms of pattern formation in plant embryogenesis. *Annu. Rev. Genet.* , 38, 587–614.

- Wilson Z. y Zhang D. (2009). From Arabidopsis to rice: pathways in pollen development. *Journal of Experimental Botany* , 60 (5), 1479–1492.
- Wilson Z., Morroll S., Dawson J. Swarup R y Tighe P. (2001). The Arabidopsis MALE STERILITY1 (MS1) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-rger family of transcription factors. *The Plant Journal* , 28 (1), 27-39.
- Winter D., Vinegar B., Nahal H., Ammar R., Wilson G. y Provart N. (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE* , 2 (8), e718.
- Wolfe S., Nekludova L. y Pabo C. (2000). DNA recognition by cys2/his2 zinc finger proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* , 3, 183–212.
- Wu C., Washida H., Onodera Y., Harada K. y Takaiwa F. (2000). Quantitative nature of the Prolamin-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal cis-element requirements for endosperm-specific gene expression. *The Plant Journal* , 23 (3), 415–421.
- Wu X.,Chory J. y Weigel D. (2007). Combinations of WOX activities regulate tissue proliferation during Arabidopsis embryonic development. *Developmental Biology* , 309, 06–316.
- Xie Z., Zhang Z., Hanzlik S., Cook E. y Shen Q. (2007). Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid-inducible WRKY gene. *Plant Mol Biol* , 64, 293–303.
- Y. KOSHITA, T. ASAKURA, H. FUKUDA y Y. TSUCHIDA. (2007). Nighttime temperature treatment of fruit clusters of ‘Aki Queen’ grapes during maturation and its effect on the skin color and abscisic acid content. *Vitis* , 46 (4), 208–209.
- Yadav R., Fulton L., Batoux M. y Schneitz K. (2008). The Arabidopsis receptor-like kinase STRUBBELIG mediates inter-cell-layer signaling during floral development. *Developmental Biology*. 323, 261–270.
- Yalpani N., Shulaev V. y Raskin V. (1993). Endogenous salicylic acid levels correlate with accumulation of pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Phytopathology* , 702-708.
- Yanagisawa Y. y Sheen J. (1998). Involvement of Maize Dof Zinc Finger Proteins in Tissue-Specific and Light-Regulated Gene Expression. *The Plant Cell* , 10, 75–89.

Yang C., Vizcay-Barrena G., Conner K. y Wilson Z. (2007). MALE STERILITY1 Is Required for Tapetal Development and Pollen Wall Biosynthesis. *The Plant Cell*, *19*, 3530–3548.

Yang C., Vizcay-Barrena G., Conner K., y Wilson Z. (2007). MALE STERILITY1 Is Required for Tapetal Development and Pollen Wall Biosynthesis. *The Plant Cell*, *19*, 3530–3548.

Yang W., Ye D., Xu J. y Sundaresan V. (1999). The SPOROCTELESS gene of Arabidopsis is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. *GENES & DEVELOPMENT*, *13*, 2108–2117.

Yoshihara T., Washida H. y Takaiwa F. (1996). A 45-bp proximal region containing AACA and GCN4 motif is sufficient to confer endosperm-specific expression of the rice storage protein glutelin gene. *GluA-3. FEBS Letter.* *383*, 213-218.

Yoshioka K., Fukushima S., Yamazaki T., Yoshida M. y Takatsuji H. (2001). The Plant Zinc Finger Protein ZPT2–2 Has a Unique Mode of DNA Interaction. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, *276* (38), 35802–35807.

Yu C., Chen Y., Lu C. y Hwang J. (2006). Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, *64*, 643-651.

Zhang W., Sun Y., Timofejeva L., Chen C., Grossniklaus U. y Ma H. (2006). Regulation of Arabidopsis tapetum development and function by DYSFUNCTIONAL TAPETUM1 (DYT1) encoding a putative bHLH transcription factor. *Development*, *133*, 3085-3095.

Zhang X., Luo G., Wang R. y Wang J. (2003). Growth and Developmental Responses of Seeded and Seedless Grape Berries to Shoot Girdling. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *128* (3), 316-323.

Zhang Z., Zhu J., Gao J., Wang C., Li H., Li H., Zhang H., Zhang S., Wang D., Wang Q., Huang H., Xia H. y Yang Z. (2007). Transcription factor AtMYB103 is required for anther development by regulating tapetum development, callose dissolution and exine formation in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *52* (3), 528–538.

Zou J., Abrams C., Barton D., Taylor D., Pomeroy M. y Abrams S. (1995). Induction of Lipid and Oleosin Biosynthesis by (+)-Abscisic Acid and Its Metabolites in Microspore-Derived Embryos of Brassica napus 1. cv Reston. *Plant Physiol.*, *108*, 563-571.

Zhou Y., Zhang X., Kang X., Zhao X., Zhang X. y Ni M. (2009). SHORT HYPOCOTYL UNDER BLUE1 Associates with MINISEED3 and HAIKU2 Promoters in Vivo to Regulate Arabidopsis Seed Development. *The Plant Cell*, *21*, 106–117.

Zhou Y. y Ni M. (2010). SHORT HYPOCOTYL UNDER BLUE1 Truncations and Mutations Alter Its Association with a Signaling Protein Complex in Arabidopsis. *The Plant Cell* , 22, 703–715.

Zhou P., Yang F., Yu J., Ao G. y Zhao Q. (2010). Several cis-elements including a palindrome involved in pollen-specific activity of SBgLR promoter. *Plant Cell Reports* , 29 (5), 503-511.

## **7. ANEXOS**



Anexo 1. Tratamiento de bayas de vid con hormonas y moléculas inductoras de respuesta en plantas.