



Pontificia Universidad católica de Chile.
Facultad de Ciencias Biológicas.
Doctorado en Ciencias Biológicas,
mención Genética Molecular y Microbiología.

Participación de glucosa en el proceso de maduración del fruto de *Vitis vinifera*, a través de la regulación de la biosíntesis de antocianinas y el transporte polar de auxina

Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con mención en Genética Molecular y Microbiología.

Por

ALEJANDRA RITA DE LOURDES SERRANO CANALES

Director de Tesis : Dr. Jorge Patricio Arce Johnson
Comisión de Tesis : Dra. Loreto Holuigue
Dr. Francisco Melo
Dr. Gabriel León
Jefe de Mención : Dr. Rodrigo Gutiérrez

Octubre 2014

Lo que ahoga a alguien no es caerse al río,
sino mantenerse sumergido en él

Paulo Coelho

Esta tesis está dedicada a mis padres, mis hermanos, mi hijo y a mi amor Willy, quienes con todo su apoyo hicieron que un simple sueño se convirtiera en realidad.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi tutor de tesis, el Dr. Patricio Arce, quien durante todo el tiempo que trabajé en su laboratorio confió en mí y me apoyó en cada una de las ideas y necesidades que requiere realizar una tesis de doctorado. Gracias por la confianza y el apoyo que me brindó durante todo este tiempo.

Quiero agradecer a todos los integrantes que han sido y son parte del laboratorio, por toda la buena onda que a diario se irradia en ese grupo de trabajo, porque gracias que cada uno entrega una pequeña gota de alegría, trabajar ahí es un agrado. En ese laboratorio no sólo se encuentran compañeros de trabajo, sino que también amigos dispuestos a apoyarte y a ayudarte en todo momento y desinteresadamente. Gracias PA lab, me siento feliz de haber trabajado con ustedes. Especialmente quiero agradecer a Consuelo Medina por toda la ayuda que me brindó durante mi estadía en el laboratorio.

Agradezco también a Daniela Herrera y Derly Andrade ex integrantes del lab PA y a Constanza Núñez, actual tesista de doctorado, por su gran entusiasmo y colaboración en esta tesis.

También quiero agradecer a mis amigas del PA lab, que aunque algunas ya no son parte del laboratorio siguen siendo parte de mi vida. Mónica Madariaga, Jessica Devia, Ximena Álvarez, Anita Toso, Jennifer Serrano y Nathalia Kuhn, en ustedes encontré lo que cualquier persona quisiera encontrar en un trabajo, alegría y amistad, porque cada día con una pequeña sonrisa y un abrazo fueron capaces de levantarme, darme ánimos y hacerme sentir bien. Gracias a todas por todos los momentos compartidos, las palabras, los almuerzos infinitos, las conversaciones de pasillo, gracias por estar conmigo y por ser como son.

Quiero enfatizar mis agradecimientos a Nathalia Kuhn, mi amiga y compañera de doctorado, por cada uno de los momentos que compartimos y las ideas que a diario discutimos, porque fuiste un gran apoyo, no sólo espiritualmente, sino que también a nivel de trabajo. Gracias por acompañarme y ser parte de mis locuras, por escucharme y dejarme escucharte, por ser quien eres y por cómo has sido siempre conmigo.

No puedo dejar de agradecer Grace Armijo, Carmen Espinoza, Franko Restovic y Felipe Aquea, quienes con su amplio nivel de conocimiento, su vasta experiencia, su extremo profesionalismo y toda su generosidad, me ayudaron a guiar mi trabajo, aportaron ideas y me dieron una pequeña palmadita en el hombro para levantarme en uno de los momentos más difíciles. Gracias Grace por haber llegado al laboratorio a ponerle un toque de ternura y maternidad, gracias por tu ayuda y por acompañarme en todo este último tiempo.

Agradezco a mis dos amigos Andrés Leiva y Raúl Donoso, quienes me acompañaron durante todo este tiempo y quienes han sabido escucharme y entenderme. Gracias por todo su tiempo y por cada momento que hemos compartido.

Por supuesto quiero agradecer a mi gran amiga Ana Zúñiga, quien desde pregrado ha estado conmigo acompañándome. Hemos compartido buenos y malos momentos, pero

siempre has estado a mi lado apoyándome. Gracias por entenderme, soportarme y aceptarme tal como soy, por todo el tiempo que llevamos siendo amigas y por todos los caminos que hemos recorrido juntas, espero de todo corazón que nunca dejes de ser mi amiga.

Gracias a mis padres, quienes han estado conmigo siempre, desde que nací me han cuidado y apoyado en absolutamente todo, han estado conmigo en cada minuto de mi vida entregándome su amor incondicional. Realmente admiro quiénes son y como son, me siento orgullosa de tener unos padres como ustedes y algún día quisiera llegar a ser así. No sólo les agradezco por haberme apoyado durante estos cuatro años, sino que por haberme apoyado durante toda una vida. Gracias por todo, por su infinito amor y entrega, porque son los mejores padres y los mejores abuelos que mi hijo pudo haber tenido.

Agradezco también a mis hermanos, JP y Naty, porque con sus risas, sus chistes, sus burlas y todo su amor, alegran mi vida a diario, gracias por todo el tiempo lleno de felicidad que hemos compartido y por su gran apoyo durante estos cuatro años. Los hermanos no se escogen, pero a mí la vida me premió y me dio a los mejores.

El más importante de los agradecimientos a mi amor Willy y a mi hijo Benjamín, porque a diario llenan mi vida de amor, ternura, entrega y absoluta comprensión, porque son lo mejor que me pudo haber pasado en la vida. Willy, gracias por entenderme, ayudarme, apoyarme y por estar conmigo siempre, gracias a toda tu entrega y a tu apoyo incondicional he llegado donde estoy, porque hemos recorrido una vida juntos y en cada momento de esa vida has estado a mi lado entregándome tu infinito amor, gracias por ser mi compañero y mi cómplice.

Finalmente quiero agradecer a mi comisión de tesis por la ayuda que me brindaron durante el doctorado, en especial durante los inicios, a CONICYT por otorgarme la beca de doctorado nacional, beca de asistencia a congresos, beca de apoyo a tesis doctoral y la beca de extensión y a la Pontificia Universidad Católica de Chile, por aceptarme como alumna y a través de la VRI y la DIP otorgarme financiamiento durante mi doctorado.

INDICE DE MATERIAS

| | |
|---|----|
| DEDICATORIA | 1 |
| AGRADECIMIENTOS | 2 |
| INDICE DE MATERIAS | 4 |
| INDICE DE FIGURAS | 8 |
| INDICE DE TABLAS | 10 |
| ABREVITURAS | 11 |
| RESUMEN | 12 |
| ABSTRACT | 14 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 16 |
| 1.1. Desarrollo del fruto de <i>Vitis vinifera</i> | 16 |
| 1.2. Cambios fisiológicos y morfológicos asociados al proceso de maduración del fruto de vid..... | 17 |
| 1.3. Bases fisiológicas e importancia de la acumulación de azúcar durante la maduración del fruto de vid..... | 20 |
| 1.4. Regulación de la biosíntesis de antocianinas durante el desarrollo del fruto de vid..... | 23 |
| 1.5. Cambios hormonales asociados al proceso de maduración e importancia de la disminución de auxina durante el desarrollo..... | 27 |
| 2. MATERIALES | 32 |
| 2.1. Material Biológico..... | 32 |
| 2.1.1. Material Vegetal..... | 32 |
| 2.1.1.1. Plantas de campo de <i>Vitis vinifera</i> | 32 |

| | |
|--|-----------|
| 2.1.1.2. Plantas <i>in vitro</i> de <i>Vitis vinifera</i> | 32 |
| 2.1.1.3. Cultivos celulares de fruto de <i>Vitis vinifera</i> | 33 |
| 2.1.2. Cepas bacterianas..... | 33 |
| 2.2. Plásmidos..... | 33 |
| 2.3. Medios de cultivo e incubación..... | 34 |
| 2.4. Enzimas y kits comerciales..... | 35 |
| 2.5. Otros reactivos y materiales..... | 35 |
| 2.6. Sitios de internet, bases de datos y programas computacionales..... | 36 |
| 2.7. Oligonucleótidos..... | 37 |
| | |
| 3. MÉTODOS | 39 |
| | |
| 3.1. Obtención de material vegetal de <i>Vitis vinifera</i> y tratamientos con azúcar..... | 39 |
| 3.1.1. Tratamientos con azúcar a frutos de <i>Vitis vinifera</i> cv. Red Globe sin ser removidos de la planta..... | 39 |
| 3.1.2. Tratamientos con azúcar a frutos de <i>Vitis vinifera</i> removidos de la planta..... | 40 |
| 3.1.3. Tratamientos con azúcar a cultivos celulares de fruto de <i>Vitis vinifera</i> | 41 |
| 3.1.4. Tratamientos con glucosa, NPA e IAA a frutos de de <i>Vitis vinifera</i> sin ser removidos de la planta..... | 42 |
| 3.2. Extracción y manipulación de ácidos nucleicos de <i>Vitis vinifera</i> | 42 |
| 3.2.1. Extracción de DNA genómico..... | 42 |
| 3.2.2. Extracción de RNA total..... | 43 |
| 3.2.3. Cuantificación de la concentración del RNA..... | 44 |
| 3.2.4. Tratamiento del RNA total con DNasa..... | 44 |
| 3.2.5. Síntesis de cDNA mediante RT-PCR (reacción de transcripción inversa seguida de PCR)..... | 45 |
| 3.3. Cuantificación de transcritos de RNA mediante qPCR (PCR cuantitativo en tiempo real)..... | 45 |
| 3.4. Técnicas básicas de DNA recombinante..... | 46 |
| 3.4.1. Obtención de fragmentos de DNA por PCR (reacción en cadena de la polimerasa)..... | 46 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.4.2. | Electroforesis de DNA en geles de agarosa..... | 47 |
| 3.4.3. | Clonamiento de la región promotora del gen <i>MybA1</i> | 48 |
| 3.4.4. | Transformación de células de <i>E. coli</i> con plásmidos de interés..... | 48 |
| 3.4.5. | Obtención de DNA plasmidial a partir de cultivos bacterianos..... | 49 |
| 3.4.6. | Recombinación de plásmidos a partir del sistema GATEWAY..... | 49 |
| 3.4.7. | Preparación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> electrocompetente..... | 50 |
| 3.4.8. | Tranformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con plásmidos de interés..... | 50 |
| 3.4.9. | Transformación transiente de hojas de vid con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 54 |
| 3.5. | Análisis cualitativo de la actividad GUS en hojas de vid..... | 55 |
| 3.6. | Cuantificación del contenido de antocianinas en frutos de vid, mediante HPLC.... | 55 |
| 3.7. | Análisis de tejidos de <i>Vitis vinifera</i> mediante microscopía electrónica..... | 56 |
| 3.8. | Cuantificación del transporte polar de auxina en frutos de <i>Vitis vinifera</i> | 56 |
| 4. | RESULTADOS | 58 |
| 4.1. | Evaluación de la participación de glucosa y fructosa en la inducción del proceso de maduración del fruto de <i>Vitis vinifera</i> | 58 |
| 4.1.1. | Evaluación fenotípica de racimos tratados con distintas soluciones de azúcar y su efecto sobre la maduración..... | 58 |
| 4.1.2. | Efecto de los tratamientos con azúcar sobre el contenido total de sólidos solubles y genes que codifican para transportadores de hexosas..... | 61 |
| 4.1.3. | Efecto de los tratamientos con azúcar sobre el tamaño de los frutos y genes involucrados con expansión celular..... | 65 |
| 4.1.4. | Disgregación de la pared celular de frutos expuestos a distintos tratamientos con azúcar..... | 68 |
| 4.2. | Evaluación de la regulación de la biosíntesis de antocianinas mediada por glucosa y/o fructosa durante la maduración del fruto de <i>Vitis vinifera</i> | 70 |
| 4.2.1. | Efecto de los tratamientos con azúcar sobre el contenido de antocianinas y genes que participan en la síntesis de estos metabolitos..... | 70 |
| 4.2.2. | Caracterización de la expresión del gen <i>MybA1</i> en respuesta a tratamientos con glucosa y/o fructosa en frutos cortados del racimo..... | 75 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.2.3. | Caracterización de la expresión del gen <i>MybA1</i> en respuesta a tratamientos con glucosa y/o fructosa en cultivos celulares de fruto de <i>Vitis vinifera</i> | 81 |
| 4.2.4. | Análisis de actividad GUS en hojas de vides transformadas con el promotor del gen <i>MybA1</i> | 84 |
| 4.3. | Participación de glucosa en la regulación del transporte polar de auxina durante la maduración del fruto de <i>Vitis vinifera</i> | 86 |
| 4.3.1. | Transporte polar de auxina durante el desarrollo del fruto de vid..... | 86 |
| 4.3.2. | Regulación del transporte polar de auxina mediada por glucosa durante el desarrollo del fruto de <i>Vitis vinifera</i> | 89 |
| 5. | DISCUSIÓN | 93 |
| 5.1. | Evaluación de la participación de glucosa y/o fructosa en el proceso de maduración del fruto de <i>Vitis vinifera</i> | 93 |
| 5.2 | Evaluación de la regulación de la biosíntesis de antocianinas mediada por glucosa y/o fructosa durante la maduración del fruto de <i>Vitis vinifera</i> | 99 |
| 5.3 | Participación de glucosa en la regulación del transporte polar de auxina durante la maduración del fruto de <i>Vitis vinifera</i> | 102 |
| 6. | CONCLUSIONES | 106 |
| 7. | BIBLIOGRAFÍA | 107 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Etapas del desarrollo y cambios en la composición de azúcares y antocianinas en el fruto de <i>Vitis vinifera</i> | 19 |
| Figura 2. Esquema del transporte de azúcar a larga distancia en plantas de vid..... | 22 |
| Figura 3. Esquema de la ruta de biosíntesis de flavonoides..... | 26 |
| Figura 4. Esquema del vector de entrada pENTR TM /SD/D-TOPO | 52 |
| Figura 5. Esquema del vector PKGWFS7..... | 53 |
| Figura 6. Análisis cualitativo de los efectos de los tratamientos con glucosa, fructosa, manosa, manitol y agua sobre los frutos de <i>Vitis vinifera</i> | 60 |
| Figura 7. Contenido total de sólidos solubles y niveles de transcritos de genes que codifican para transportadores de hexosas en los racimos tratados con distintas azúcares y agua..... | 64 |
| Figura 8. Volumen de los frutos y niveles de transcritos de genes que codifican para enzimas relacionadas con expansión celular en los racimos tratados con distintas azúcares y agua..... | 67 |
| Figura 9. Microscopía electrónica de la pared celular de los frutos expuestos a tratamientos con distintas soluciones de azúcar o agua..... | 69 |
| Figura 10. Contenido total de antocianinas y niveles de transcritos del gen <i>MybA1</i> para los racimos expuestos a distintos tratamientos con azúcar y agua luego de 20 y 40 días post-tratamiento..... | 72 |

| | |
|--|----|
| Figura 11. Niveles de transcritos de <i>MybA1</i> y <i>UFGT</i> en los racimos tratados con distintas azúcares y agua..... | 74 |
| Figura 12. Niveles de transcritos de <i>MybA1</i> y <i>UFGT</i> a lo largo del desarrollo del fruto de <i>Vitis vinifera</i> | 76 |
| Figura 13. Niveles de transcritos de <i>MybA1</i> y <i>UFGT</i> en discos de frutos de <i>Vitis vinifera</i> cosechados en estado verde (EL-31) y sumergidos en soluciones con distintas concentraciones de azúcar..... | 79 |
| Figura 14. Niveles de transcritos de <i>MybA1</i> y <i>UFGT</i> en discos de frutos de <i>Vitis vinifera</i> cosechados en pinta (EL-35) y sumergidos en soluciones con distintas concentraciones de azúcar..... | 80 |
| Figura 15. Niveles de transcritos de <i>MybA1</i> y <i>UFGT</i> para cultivos celulares provenientes de fruto de vid incubados con glucosa o manitol..... | 83 |
| Figura 16. Actividad GUS en hojas de vides..... | 85 |
| Figura 17. Contenido total de sólidos solubles y transporte polar de auxina durante el desarrollo del fruto de <i>Vitis vinifera</i> | 88 |
| Figura 18. Transporte polar de auxina y fotografías de los racimos tratados con agua, NPA o glucosa + NPA..... | 91 |
| Figura 19. Transporte polar de auxina y fotografías de los racimos tratados con agua, glucosa o glucosa + IAA..... | 92 |

INDICE DE TABLAS

Tabla N°1: Secuencia y temperatura de apareamiento de los oligonucleótidos utilizados...38

ABREVIATURAS

| | | |
|---------|---|--|
| ANDEVA | : | Análisis de varianza. |
| ABA | : | Ácido abscísico. |
| cDNA | : | ADN complementario. |
| Ct | : | Ciclo umbral. |
| Cv | : | Cultivar |
| DEPC | : | Dietilpirocarbonato. |
| DPT | : | Días post-tratamiento |
| DNA | : | Ácido desoxirribonucleico. |
| DNAsa | : | Desoxirribonucleasa |
| dNTPs | : | Mezcla de nucleótidos dATP, dCTP, dTTP y dGTP |
| IAA | : | Indol-3-ácido acético |
| LB | : | Medio Luria- Bertani |
| MOPS | : | Ácido 3-(N-morfolino) propanolsulfónico |
| mRNA | : | ARN mensajero |
| nm | : | Nanómetro |
| nt | : | Nucleótido |
| NPA | : | Ácido naftil-p-talámico |
| PCR | : | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PVPP | : | Polivinilpolipirrolidona |
| qRT-PCR | : | RT-PCR en tiempo real |
| RNA | : | Ácido ribonucleico |
| RT-PCR | : | Transcripción reversa- Reacción en cadena de la polimerasa |
| Taq | : | DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i> |

RESUMEN

El desarrollo del fruto de vid, baya carnosa derivada del ovario de la flor, puede dividirse en tres etapas, dentro de las cuales ocurre una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos que permiten al fruto acumular diferentes solutos y diferenciarse en distintos tejidos tales como piel, pulpa y semilla. La etapa I es un periodo de formación y se caracteriza por tener una elevada tasa de expansión y división celular que permite el aumento exponencial del tamaño del fruto y también establecer el número total de células que formarán parte de él. En la etapa II no hay incremento del tamaño, sin embargo hacia el final de esta ocurre un aumento exponencial de glucosa y fructosa, principales azúcares que forman parte del fruto. Coincidentemente, en este mismo periodo del desarrollo en el cual comienza la acumulación de estas hexosas, se inicia la síntesis de antocianinas, metabolitos secundarios pertenecientes al grupo de los flavonoides, que otorgan coloración a las bayas de variedades tinta. Este momento se conoce como pinta y marca el inicio de la etapa III o maduración. Durante esta última etapa ocurren una serie de cambios genéticos, fisiológicos y morfológicos que permiten que el fruto se desarrolle completamente. Dentro de estos se encuentran: el aumento de la concentración de azúcar, principalmente glucosa y fructosa, aumento del contenido de antocianinas, disminución de la turgencia, aumento del tamaño, disminución de la acidez y variaciones hormonales que promueven o retardan la maduración. En este último caso, se ha demostrado que la disminución de auxina desde que el fruto entra en estado de pinta y durante toda la maduración es esencial para que el fruto madure, debido a que tratamientos exógenos con esta hormona a frutos en estado de pre-pinta retardan significativamente este proceso. Sin embargo se desconoce el mecanismo que permite su disminución. Resultados previos de este trabajo permitieron determinar que

el transporte polar de auxina, el cual permite el flujo de esta hormona a lo largo del fruto, disminuye desde pinta en adelante, es decir disminuye de manera paralela al aumento del contenido de de glucosa y fructosa.

De esta manera, a pesar del amplio conocimiento que existe acerca del desarrollo del fruto de vid, la naturaleza de la señal que inicia y regula el proceso de maduración permanece desconocida. Con el objetivo de conocer esta señal, este trabajo está enfocado principalmente en entender tres de los cambios que ocurren durante esta etapa: el aumento de la concentración de azúcar, el aumento de la concentración de antocianinas y las variaciones hormonales que regulan este proceso. Para esto, el objetivo de esta tesis es determinar si durante el desarrollo del fruto de *Vitis vinifera*, glucosa y/o fructosa participan en el proceso de maduración a través de la regulación de la síntesis de antocianinas y el transporte polar de auxina.

Los resultados de este trabajo permitieron demostrar la importancia de glucosa en la regulación de dos procesos que marcan el inicio del proceso de maduración del fruto de vid, debido a que frutos en estado de pre-pinta tratados con una solución de glucosa maduraron 20 días antes que frutos tratados sólo con agua. Esto fue demostrado a partir de análisis genéticos y fenotípicos que permitieron determinar el grado de madurez de los frutos. Además se demostró que esta hexosa regula transcripcionalmente la expresión del gen *MybA1*, a través del cual regula la síntesis de antocianinas. Por otro lado, los resultados obtenidos en este trabajo permitieron demostrar que durante el desarrollo del fruto de vid glucosa, además de regular la síntesis de estos metabolitos, tiene la capacidad de regular el transporte polar de auxina y a través de eso regular la maduración.

ABSTRACT

The berry grape development, which is a fleshy fruit derived from the ovary of the flower, can be divided into three stages, characterized by the occurrence of several physiological and biochemical changes that allow the accumulation of different solutes and cell differentiation into various tissues such as skin, pulp and seed. Stage I is the fruit formation period and is characterized by high cell expansion and division, that allow the exponential increase of the berry size and also to establish the total number of cells in it. During the stage II there is no evident berry size increase, however towards the end of it an exponential increase of glucose and fructose, main sugars of the berry, takes place. Remarkably, in this same period of development at which the sugar accumulation begins coincides with the anthocyanins biosynthesis initiation, which are secondary metabolites that belong to the flavonoids group and give coloration to the berries of red varieties. This moment is known as *veraison* and marks the beginning of stage III or ripening. During this last stage, genetics, morphological and physiological changes are produced, which allow to complete berry development. Among these are: the increase of the sugar concentration, especially glucose and fructose, the increase of anthocyanins, turgor decrease, size increase, decreased acidity and hormonal variations that promote or retard the ripening. In the latter case, it has been shown that the auxin decrease from *veraison* and throughout ripening, is essential for this process to occur, because exogenous treatment with this hormone to pre-*veraison* fruits significantly retard this process. However, the mechanism that allows the decrease is unknown. Preliminary results of this study showed that the polar auxin transport, which allows the flow of this hormone along the berry, decreases from *veraison* onward, thus decreases parallel at the increase of glucose and fructose.

Despite there is widespread knowledge about the berry grape development, the nature of the signal that initiates and facilitates the coordination of ripening processes remains unknown.

In order to determine which is the signal that initiates and regulates the ripening process in the grape berry, this work is mainly focused on understanding three of the changes that occur during this stage: sugar and anthocyanins concentration increase and the hormonal variations that regulate these process. Thus the aim of this thesis is to determine whether during the grape berry development, glucose and/or fructose participate in the ripening process through of anthocyanins biosynthesis and polar auxin transport regulation.

The results of this work allowed to demonstrate the importance of glucose in the regulation of berry grape ripening initiation. This because *pre-veraison* berries treated exogenously with glucose matured 20 days earlier than fruit treated with water. This was demonstrated by genetic and phenotypic analysis that allowed to determine the degree of ripening of the berry. Also this analysis showed that this hexose transcriptionally regulates the expression of *MybA1* gene, through which regulates the anthocyanins synthesis. Moreover, the results obtained in this study allowed to demonstrate that during the berry development, sugar, besides of regulate the anthocyanin synthesis, has the ability of regulate the polar auxin transport, through which regulates the ripening

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Desarrollo del fruto de *Vitis vinifera*

Los frutos pueden ser clasificados dentro de dos grupos: frutos climatéricos y no climatéricos, dependiendo del patrón de respiración celular y biosíntesis de etileno que poseen durante el proceso de maduración (Graham B. y cols. 1993; Giovannoni J. 2001). Los frutos climatéricos se caracterizan por tener un incremento tanto en la tasa de respiración como en la síntesis de etileno, siendo este último fundamental para que el fruto madure. Por el contrario, los frutos no climatéricos carecen de este aumento en la tasa de respiración (Graham B. y cols 1993; Giovannoni J. 2001) y el incremento de etileno es tan bajo que es incapaz de inducir por sí solo la maduración, por lo que la señal que desencadena este proceso permanece desconocida (Graham B. y cols 1993; Giovannoni J. 2001).

La vid (*Vitis vinifera*) es una especie leñosa perteneciente a la familia Vitaceae, que constituye uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, debido a que su fruto puede ser utilizado tanto para el consumo fresco, como para la producción de vino.

El fruto de vid (*Vitis vinifera*), baya carnosa derivada del ovario de la flor, es un fruto no climatérico cuyo desarrollo puede ser dividido en tres etapas (figura 1), durante las cuales ocurre una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos que le permiten a la baya acumular diferentes solutos y diferenciarse en tejidos como piel, pulpa y semilla (Kennedy J.A. 2002). La etapa I se caracteriza por ser un periodo de rápida división y expansión celular, que permiten el incremento exponencial del tamaño de la baya y a su vez establecer el número total de células que formarán parte de esta (Coombe B.G. y Hale R. 1973). La etapa

II es una fase lag de crecimiento, en la que no hay incremento en el tamaño de la baya, sin embargo hacia el final de esta etapa comienza una rápida acumulación de glucosa y fructosa, provenientes de la hidrólisis de la sacarosa translocada desde las hojas que cumplen la función de órganos fuente (Gil G. y cols. 2007). Interesantemente, esta rápida acumulación de hexosas en el interior de las células del fruto, coincide con el momento en el cual comienzan a sintetizarse las antocianinas, compuestos hidrosolubles que pertenecen al grupo de los flavonoides y que otorgan coloración a las bayas de variedades tintas (Boss P. y cols 1996). Este proceso se conoce como pinta y marca el comienzo de la etapa III o maduración, para la cual, al igual que en otros frutos no climatéricos, el mecanismo que controla el inicio de este proceso es pobremente entendido.

1.2 Cambios fisiológicos y morfológicos asociados al proceso de maduración del fruto de vid

El inicio del proceso de maduración del fruto de vid marca una transición en el desarrollo que involucra un amplio número de cambios fisiológicos y morfológicos, entre los cuales los más importantes son el aumento de la concentración de azúcar, principalmente glucosa y fructosa (Vignault C. y cols. 2005; Hayes M. y cols. 2007; Deluc L y cols. 2007, Fontes N. y cols. 2011); desarrollo del color, debido al incremento del contenido de las antocianinas (Boss P. y cols 1996); disminución de la turgencia y aumento del tamaño, debido a cambios estructurales de la pared celular (Chervin C y cols. 2008); disminución de la acidez (Costenaro-da-Silva D. y cols. 2010) y variaciones hormonales que regulan positiva o negativamente la maduración (Geros H y cols. 2012). Debido a que todos estos cambios ocurren paralelamente, el mecanismo que inicia este proceso debe ser capaz de

coordinar todas estas variaciones a lo largo del tiempo a través de un complejo mecanismo de regulación que puede ser transcripcional o post-transcripcional. Sin embargo, a pesar del amplio conocimiento que existe respecto a todos estos cambios, la naturaleza de la señal que inicia y permite esta coordinación permanece desconocida.

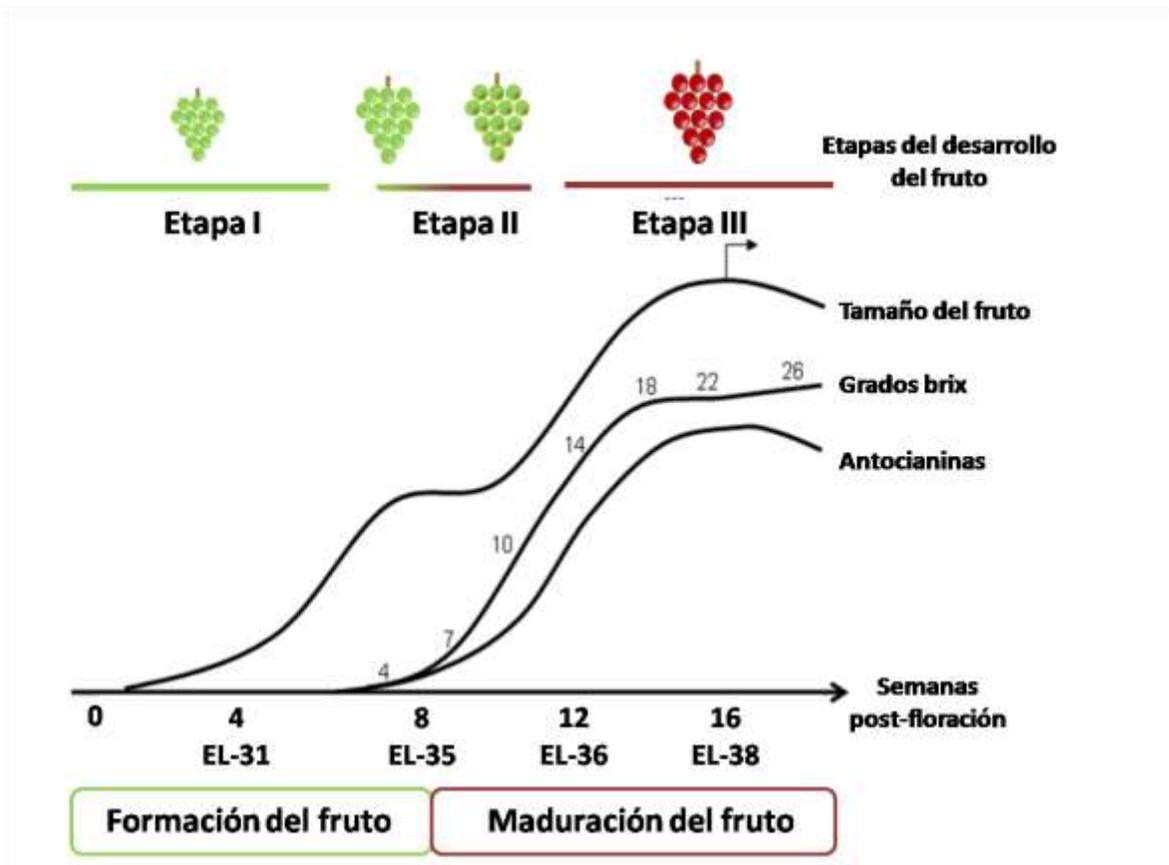


Figura 1: Etapas del desarrollo y cambios en la composición de azúcares y antocianinas en el fruto de *Vitis vinifera*.

La figura muestra los cambios en el tamaño y las variaciones en el contenido de azúcares y antocianinas a lo largo del desarrollo del fruto de *Vitis vinifera*. Las variaciones en el tamaño de la baya están representadas por una curva doble sigmoidea que muestra el desarrollo del fruto dividido en tres etapas. La etapa I se caracteriza por un rápido incremento del tamaño del fruto. La etapa II es una fase lag de crecimiento en la que comienza la acumulación de azúcares y antocianinas que dan inicio a la etapa III o maduración, durante la cual el contenido de ambos metabolitos incrementa de manera simultánea (Kennedy J.A y cols 2000).

1.3 Bases fisiológicas e importancia de la acumulación de azúcar durante la maduración del fruto de vid.

Durante el proceso de maduración del fruto de vid, ocurre un importante incremento de la concentración de glucosa y fructosa (Figura 1) que provienen de la hidrólisis de la sacarosa producida en las hojas a partir de la fotosíntesis (Gil G. y cols. 2007). Esta acumulación de azúcar comienza cuando el fruto entra en periodo de pinta y continúa a lo largo de toda la maduración, alcanzando concentraciones de hasta 1M de cada hexosa (Coombe B.G 1987).

La figura 2 muestra un esquema del transporte de azúcar en plantas de vid, en la que se observa que la sacarosa sintetizada a partir de la fotosíntesis en las células del mesófilo de las hojas, es transportada hacia el fruto a través de los elementos cribosos que forman parte del floema. Este transporte ocurre debido a que la presión hidrostática generada por el aumento de agua y solutos permite el desplazamiento de la savia desde las hojas hacia el fruto. Una vez en estos, la sacarosa entra a las células de este órgano vía simplástica, a través de los plasmodesmos, o vía apoplástica (Agasse A y cols. 2007). En este último caso se requiere de la actividad de proteínas de membrana que median el transporte de sacarosa o hexosas proveniente de la hidrólisis de esta misma (Agasse A y cols. 2007; Koch K. 2004)

Análisis del genoma de *Vitis vinifera* han permitido identificar al menos 20 genes que codifican para putativos transportadores de hexosas (Afoufa-Bastien y cols. 2010), dentro de los cuales varios han sido caracterizados y demostrada su participación en el transporte de azúcar durante el desarrollo del fruto de vid, tales como *VvHT1*, *VvHT2*, *VvHT3*, *VvHT4*, *VvHT5*, *VvTMT1* (Afoufa-Bastien y cols. 2010; Zeng L. y cols. 2010; Hayes M y cols. 2007; Atanassova R y cols. 2003).

Estudios de expresión génica global en hojas, tendriles, peciolas, raíces y frutos de *Vitis vinifera*, permitieron determinar que los genes que codifican para estos transportadores de azúcar poseen un patrón de expresión tejido específico y que además aquellos genes que se expresan en el fruto presentan una expresión diferencial a lo largo del desarrollo (Afoufa-Bastien y cols 2010). De esta manera, los transcritos de genes como *VvHT2* y *VvHT3*, que codifican para transportadores de hexosas de membrana plasmática y *VvTMT1*, que codifica para un transportador de hexosas a nivel de tonoplasto se acumulan durante el proceso de maduración del fruto de vid.

Se ha demostrado que en plantas el azúcar no sólo tiene un rol energético y/o estructural sino que también actúa como una molécula señal capaz de regular la expresión de una gran variedad de genes involucrados en distintos procesos, tales como fotosíntesis, metabolismo del carbono y del nitrógeno, respuesta a estrés, metabolismo secundario, etc. (Jang J.C. y cols. 1997; Dijkwel P.P y cols. 1995; Dijkwel P.P y cols. 1997; Martin T. y cols. 1997; Cho Y.H y cols. 2006; Rolland F y cols. 2002). En este tipo de regulación el azúcar es reconocida por un receptor específico para luego gatillar una vía de transducción de señales en la que participan distintos efectores y que puede culminar con la regulación y coordinación del crecimiento y desarrollo de la planta (Jang J.C. y cols 1997; Moore B y cols. 2003; Claeysen E y cols. 2007; Granot y cols. 2007; Rolland F y cols. 2006). De esta manera, la elevada concentración de glucosa y fructosa que se genera en el fruto desde que entra en estado de pinta y a lo largo de toda la maduración, sugiere que estas moléculas podrían tener no sólo un rol energético y estructural sino que también actuar como moléculas señal y regular importantes procesos asociados a esta etapa.

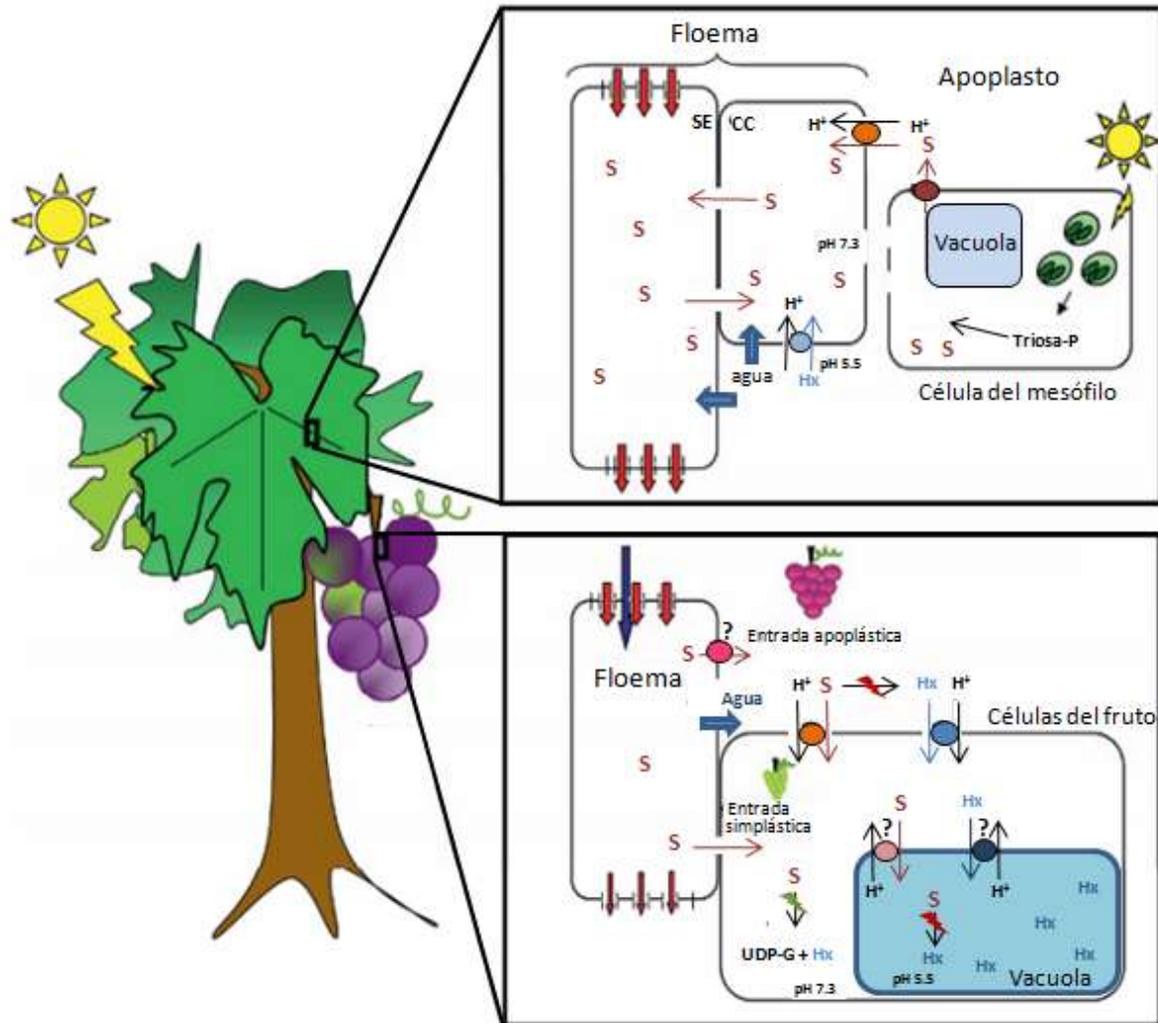


Figura 2: Esquema del transporte de azúcar a larga distancia en plantas de vid.

La figura muestra un esquema simplificado del transporte de sacarosa desde las hojas de vides que actúan como órganos fuente, hasta los frutos, los cuales funcionan como órganos sumideros. La sacarosa transportada vía floema, al llegar al fruto puede entrar a la célula a través de dos vías: simplástica o apoplástica. En este último caso se hace necesaria la actividad de transportadores de sacarosa o hexosas (en el caso de que la sacarosa haya sido hidrolizada por enzimas del tipo invertasas) ubicados a nivel de la membrana plasmática (Modificado de Kalliopi A. y cols. 2009).

1.4 Regulación de la biosíntesis de antocianinas durante el desarrollo del fruto de vid

Los flavonoides son un importante grupo de metabolitos secundarios de plantas involucrados en diversos procesos tales como protección contra luz UV, transporte de hormonas, defensa contra patógenos, tolerancia a condiciones abióticas desfavorables y pigmentación de los tejidos (Shirley B. 1996; Gollop R y cols 2001; Gollop R y cols 2002). Entre estos, las antocianinas son los principales compuestos flavonoides que otorgan coloración a distintos tejidos de las plantas.

Como fue descrito anteriormente, en la vid, las antocianinas son las moléculas encargadas de otorgar la coloración a los frutos de variedades tintas y su síntesis se caracteriza por ser el último paso de la ruta de biosíntesis de los flavonoides, donde una molécula de antocianidina (cianidinas o delfidinas) es glicosilada a partir de una reacción catalizada por una enzima denominada UFGT (UDP-glucosa flavonoide 3-O-glucosiltransferasa) (Figura 3) (Bogs J. y cols. 2007; He F. y cols. 2010). Esta glicosilación le otorga a la molécula una mayor estabilidad y con ello la capacidad de almacenarse en el interior de la vacuola de las células (He F. y cols. 2010).

Se ha visto que en la vid, los genes que codifican para las enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de los flavonoides y con ello, de las antocianinas, son controlados de manera tejido específica (Van Tunen A.J y cols. 1988) e inducidos por factores medioambientales tales como luz UV, patógenos y disponibilidad de fosfato, carbono y nitrato (Christie J.M. y cols. 1996; Frohnmeyer H y cols. 1997; Lamb C.J y cols 1989; Yamakawa T y cols. 1983). Por otro lado, el incremento simultáneo que se observa entre la concentración de glucosa y fructosa y la acumulación de antocianinas durante el proceso de maduración del fruto de vid, podría deberse a que la síntesis de estos metabolitos probablemente es

regulada por glucosa y fructosa, lo que puede sugerirse debido a que la incubación de cultivos celulares provenientes de fruto de vid con distintas concentraciones de estos azúcares provoca un incremento de la acumulación de antocianinas intracelulares, proporcional a la concentración de cada hexosa (Larronde F y cols. 1998). Sin embargo, a pesar de que los cultivos celulares son un buen modelo de estudio, estos podrían no representar fielmente las características fisiológicas del fruto, por lo que la regulación de la síntesis de antocianinas mediada por glucosa y fructosa durante la maduración del fruto, aún debe ser demostrada.

Adicionalmente, se ha identificado un amplio número de factores de transcripción que regulan la expresión de genes que participan en la biosíntesis de flavonoides, siendo los más estudiados los factores de tipo R2R3MYB (figura 3). Estos constituyen un abundante grupo en plantas y participan en el control de una gran variedad de procesos (Matus J.T y cols. 2008; Dubos C y cols. 2010). En *Vitis vinifera*, se han identificado 108 genes de la familia R2R3Myb, (Matus JT y cols. 2008), de los cuales se han descrito varios que participan en la regulación de la biosíntesis de flavonoides (figura 3), tales como MYBF1 (Czemmel S. y cols. 2009), MYBPA2 (Terrier N y cols. 2009), MYBPA1 (Bogs J. y cols. 2007), MYB5A (Deluc L y cols. 2006), MYB5B (Deluc L.y cols. 2008), MYBA2 (Geekiyana S. y cols. 2007) y MYBA1 (Kobayashi S y cols. 2002) siendo este último fundamental para que ocurra la síntesis de antocianinas, debido a que regula la expresión del gen *UFGT* (Cutanada M y cols. 2009; Kobayashi S y cols. 2002; Walker A. y cols. 2006; Walker A. y cols. 2007), el cual codifica para la enzima UDP-glucosa 3-O-flavonoide:glicosiltransferasa (UFGT), que como se mencionó anteriormente, cataliza el último paso de la ruta de biosíntesis de antocianinas en el fruto de vid.

Si se analizan los niveles de transcritos del gen *MybA1* durante el desarrollo del fruto de vid, éstos son detectados por primera vez durante el periodo de pinta (Kobayashi S. y cols. 2002, Vega A. y cols. 2011), precisamente el mismo estadio del desarrollo en el cual comienza la acumulación de glucosa y fructosa, lo que le permite sugerir que probablemente estos monosacáridos regulan la biosíntesis de antocianinas a través de la regulación transcripcional de gen *MybA1*, y por otro lado permite que este gen sea un excelente marcador de maduración.

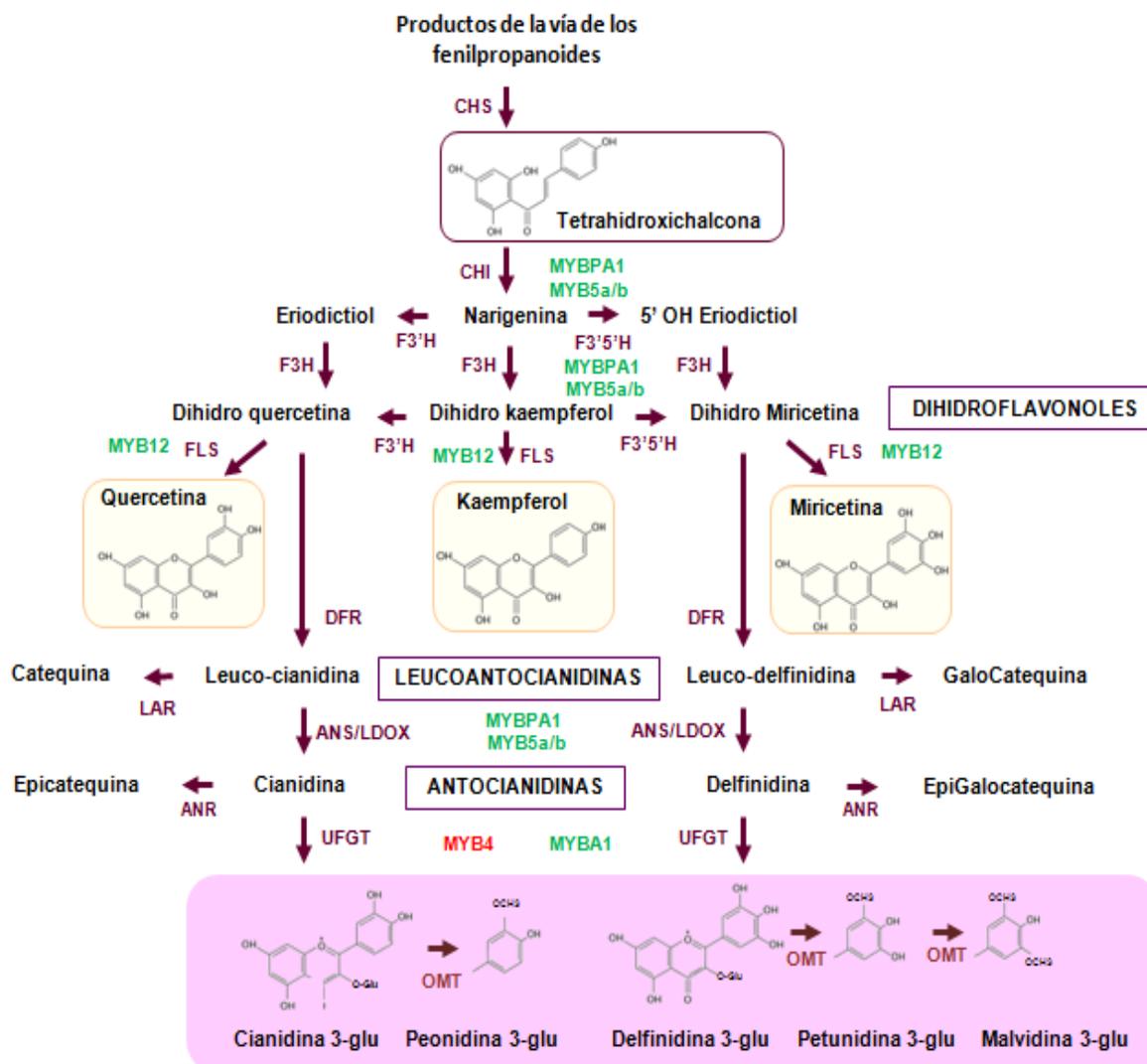


Figura 3: Esquema de la ruta de biosíntesis de flavonoides.

La figura muestra las reacciones involucradas en la síntesis de compuestos flavonoides. Se observa que las antocianinas forman parte del último paso de la ruta de biosíntesis de estos metabolitos y que pueden adicionalmente modificarse en el grupo 3' glucósido mediante glicosilaciones y acilaciones con ácidos fenólicos. En burdeos se muestran las enzimas que participan en la ruta de biosíntesis. CHS: chalcona sintasa, CHI: chalcona isomerasa, F3'H: flavonoide-3-hidroxilasa, F3'5'H: flavonoide -3'5'-hidroxilasa, FLS: flavonol sintasa, DFR: dihidroflavonol reductasa, ANS/LDOX: antocianidina sintasa /leucoantocianidina sintasa, LAR: leucoantocianidina reductasa, ANR: antocianidina reductasa, UFGT: UDP-glucosa flavonoide 3-O-glucosiltransferasa, OMT: O-metil-transferasa. En verde los factores de transcripción MYB descritos como reguladores positivos y en rojo el descrito como negativo. (Modificado de Matus T. y cols. 2009)

1.5 Cambios hormonales asociados al proceso de maduración e importancia de la disminución de auxina durante el desarrollo.

En plantas, las hormonas han sido reconocidas como importantes reguladores de un amplio número de procesos, siendo incluso capaces de regular su desarrollo a través de la coordinación de distintos factores. De esta manera, debido a que se desconoce la naturaleza de la señal que inicia la maduración del fruto de vid, varios estudios se han enfocado en tratar de comprender la función de las hormonas a lo largo de este proceso.

En general, todas las frutas poseen cambios similares a lo largo del desarrollo, sin embargo, durante el proceso de maduración existen diferencias significativas en cuanto al nivel de importancia que ciertas hormonas tienen durante la regulación de esta etapa. De esta manera, los frutos pueden clasificarse dentro de dos grupos, frutos climatéricos y no climatéricos (Graham B. y cols. 1993; Giovannoni J. 2001), dependiendo de la tasa de respiración y biosíntesis de etileno que poseen. Los frutos climatéricos se caracterizan por tener una elevada tasa de respiración celular y un incremento de la biosíntesis de etileno, siendo este último una de las principales y más relevantes características de ese tipo de frutos (Graham B. y cols. 1993; Giovannoni J. 2001). Por el contrario, los frutos no climatéricos, tales como el fruto de vid, presentan un incremento muy pequeño de etileno (Graham B. y cols. 1993) y a pesar de que mediante tratamientos exógenos se ha demostrado que esta hormona puede regular ciertas características de la maduración, el reducido incremento de los niveles a lo largo del desarrollo del fruto impiden que sea capaz de inducir por sí sola esta etapa.

Otras dos hormonas que se han propuesto como importantes en la regulación de la maduración del fruto de vid, son el ácido abscísico (ABA) y los brasinosteroides (BRs),

debido a que aplicaciones exógenas a bayas en estado de pre-pinta han demostrado que regulan características relevantes para la maduración, tales como aumento de la coloración y del tamaño del fruto, sin embargo no inducen todos los parámetros necesarios para que éste madure completamente (Wheeler S. y cols 2009; Chervin C. y cols. 2004; Chervin C. y cols. 2008; Symons G. y Cols. 2006). Por otro lado, durante el desarrollo del fruto de vid, el incremento de estas hormonas ocurre después que ha comenzado la pinta, es decir, una vez que ya se ha iniciado el proceso de maduración, por lo que probablemente regulan procesos asociados a este periodo, pero no son la señal que induce el inicio de los primeros cambios asociados a este proceso.

Adicionalmente, otras hormonas se han propuesto como reguladores negativos de la maduración del fruto de vid, las cuales participan en muchos aspectos del desarrollo de las plantas (Boutte y cols. 2007, Cheng y cols. 2007, De Smet y cols. 2007, Delker y cols. 2008). Entre estas se ha visto que auxina retarda el proceso de maduración de este fruto (Davies C. y cols. 1997; Bottcher C. y cols. 2010; Zillioto F. y cols. 2012), por lo que la reducción de los niveles de esta hormona antes de iniciarse el proceso de maduración parece ser un requisito para que este proceso se desencadene (Davies C. y cols 1997; Bottcher C. y cols. 2010).

El transporte de auxina está mediado por proteínas específicas de membrana plasmática que permiten el movimiento de esta dentro y fuera de las células. Este movimiento se denomina transporte polar y otorga a las plantas una única vía de movilización de auxina entre diferentes células y tejidos (Ljung K. 2013). Actualmente existen evidencias que demuestran la importancia del transporte polar de auxina en la generación de gradientes de esta hormona, lo cual es capaz de proporcionar diversas señales a lo largo del desarrollo de las plantas y con ello cumplir importantes funciones, tales como la formación del eje

apical-basal y el crecimiento de plantas de *Arabidopsis* (Friml J y cols. 2003; Blilou I y cols. 2005; Benková E y cols. 2009). En línea con esto, se ha demostrado que el transporte polar de auxina regula la sensibilidad de las células del fruto de vid a etileno y a través de esto controla el grado de abscisión de los frutos, debido a que etileno incrementa este proceso. De esa manera durante el desarrollo del fruto se requiere de un constante y activo transporte polar de auxina para mantener una baja sensibilidad a etileno (Taylor J.E. y cols. 2001).

Si se analizan los niveles de la auxina indol-3-ácido acético (IAA) en el fruto de vid, se puede ver que estos varían bruscamente a lo largo del desarrollo, debido a que se encuentran concentraciones altas en frutos jóvenes y muy bajas en frutos en estado de maduración (Zhan X.R. y cols. 2003), lo que coincide con la elevada tasa de división celular que se observa durante los primeros estadios del desarrollo. Por otro lado, se ha demostrado que aplicaciones exógenas de esta hormona a frutos de vides en estado de pre-pinta retardan de manera importante la maduración, afectando negativamente ciertos parámetros tales como deformabilidad, coloración, tamaño y grado de acidez de los frutos (Davies C. y cols 1997; Bottcher C y cols 2010). Sin embargo el mecanismo que regula la disminución de IAA justo antes de que el fruto entre en periodo de pinta, permanece desconocido.

Resultados previos de este trabajo mostraron que en el fruto de vid el transporte polar de auxinas disminuye a lo largo del desarrollo, siendo alto en estadios tempranos y bajo durante pinta y maduración. Es decir, disminuye al mismo tiempo que aumenta la concentración de glucosa y fructosa. Esto, en conjunto con un estudio realizado en *Arabidopsis* en el cual se demostró que genes relacionados con el metabolismo de auxina son regulados por glucosa (Mishra B. y cols. 2009), permite sugerir que durante el

desarrollo del fruto de *Vitis vinifera* el transporte polar de auxina podría ser regulado por glucosa.

En este trabajo se evaluó el posible rol de glucosa en la regulación de etapas iniciales del proceso de maduración del fruto de *Vitis vinifera*. Para esto, frutos en estado de pre-pinta de plantas crecidas en campo, fueron tratados exógenamente con una solución de glucosa y posteriormente evaluados a lo largo del desarrollo. Los resultados mostraron que los frutos tratados con glucosa maduraron 20 días antes que frutos tratados sólo con agua. Por otro lado, resultados preliminares permiten sugerir que esta hexosa regula transcripcionalmente la expresión del gen *MybA1*. Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo permitieron sugerir que durante el desarrollo del fruto de vid, glucosa regula el transporte polar de auxina, a través de lo cual podría regular la maduración.

Por lo tanto, considerando que en el fruto de vid:

- Se desconoce la señal que induce el proceso de maduración.
- Glucosa y fructosa incrementan en el mismo estadio del desarrollo en el que comienza la síntesis de antocianinas.
- Auxina retarda la maduración.
- El transporte polar de auxina disminuye al mismo tiempo que aumenta la concentración de glucosa y fructosa.

La hipótesis y objetivos de este trabajo son:

Hipótesis

Durante el desarrollo del fruto de *Vitis vinifera*, glucosa y/o fructosa participan en el proceso de maduración a través de la regulación de la síntesis de antocianinas y el transporte polar de auxina.

Objetivo general

Determinar si durante el desarrollo del fruto de *Vitis vinifera*, glucosa y/o fructosa participan en el proceso de maduración a través de la regulación de la síntesis de antocianinas y el transporte polar de auxina.

Objetivos específicos

1. Evaluar la participación de glucosa y/o fructosa en el proceso de maduración del fruto de *Vitis vinifera*.
2. Evaluar si glucosa o fructosa regulan la síntesis de antocianinas durante la maduración del fruto de *Vitis vinifera*.
3. Evaluar la participación de glucosa o fructosa en la regulación del transporte polar de auxina, durante la maduración del fruto de *Vitis vinifera*.

2. MATERIALES

2.1. Material Biológico

2.1.1 Material Vegetal

2.1.1.1 Plantas de campo de *Vitis vinifera*.

Se utilizaron plantas adultas de campo de *Vitis vinifera* cultivar Red Globe. Los tratamientos realizados a frutos cortados del racimo fueron desarrollados en una parcela experimental ubicada en la zona central de Chile en Curacaví, mientras que los experimentos realizados con racimos completos fueron desarrollados en 3 distintas parcelas ubicadas en las localidades de Curacaví, Malloco y Huechun. Todas las plantas se mantuvieron en similares condiciones de fertilización y riego.

2.1.1.2 Plantas de *Vitis vinifera* crecidas *in vitro*.

Se utilizaron plantas de *Vitis vinifera* crecidas *in vitro* en cámaras de crecimiento a una temperatura de 24°C, con una intensidad lumínica de $100\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad

2.1.1.3 Cultivos celulares de fruto de *Vitis vinifera*

Se utilizaron cultivos celulares provenientes de pulpa de frutos de Cabernet Sauvignon (CSB), los cuales fueron gentilmente donados en colaboración por el Instituto de las Ciencias de la Vid y el Vino de la Universidad de Bordeaux, Francia.

2.1.2 Cepas bacterianas

Se utilizaron las siguientes cepas bacterianas:

E.coli DH5 α químicamente competentes por cloruro de calcio y *A.tumefaciens* GV3101.

Ambas formaban parte del cepario del laboratorio.

2.2 Plásmidos

Se utilizaron los siguientes vectores comerciales:

pGEM-T- easy (Promega, USA).

pENTR/SD/D-TOPO (Invitrogen, USA)

pKGWFS7 (Gateway® Cloning Technology).

2.3 Medios de cultivo e incubación

Para el cultivo de *E.coli* DH5 α se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) el cual contiene bacto triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 5g/L. Para la selección de bacterias transformadas con el plásmido pGEM-T- easy se utilizó el antibiótico ampicilina en una concentración final de 100 μ g/mL; para la selección de bacterias transformadas con el plásmido pENTR/SD/D-TOPO se utilizó el antibiótico Kanamicina en una concentración final de 50 μ g/mL y para la selección de bacterias transformadas con el plásmido pKGWFS7 se utilizó el antibiótico Espectinomicina en una concentración final de 50 μ g/mL. Para preparar medio sólido LB-agar, el medio LB líquido fue suplementado con 20 g/L de agar-agar (MERCK, Alemania).

Las células de fruto de vid fueron incubadas en el medio CSB el cual está constituido por un medio basal de Murashige y Skoog (Ref: M0221, Duchefa, Holanda.), sacarosa 20 g/L, N-Z aminaA 0,25 g/L, ANA 0,46 mg/L, BAP 0,12 mg/L y 5 ml/L de una solución 10X de las siguientes vitaminas: mioinositol 20 g/L, ácido nicotínico 0,2 g/L, pantotenato de calcio 0,2 g/L, biotina 0,2 mg/L, piridoxina HCL 0,2 g/L y tiamina HCL 0,2 g/L. Para la generación de callos a partir de estos cultivos, el medio líquido CSB fue suplementado con 9 g/L de agar-agar.

Los frutos de vid cortados de la planta para posteriores tratamientos y las hojas de vid utilizadas para transformación transiente fueron incubados en un buffer de equilibrio que contenía 50 mM de Mes-Tris PH 5,5; 1 mM de EDTA, 5 mM de ácido ascórbico, 5 mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂ y 200 mM de manitol; y posteriormente incubados en un segundo buffer que contiene lo mismo que el buffer de equilibrio a excepción del manitol, y

al cual se le agregaba glucosa, fructosa o manitol en 3 distintas concentraciones: 50, 100 y 150 mM.

2.4 Enzimas y kits comerciales

-Se utilizó la enzima Taq Polimerasa, obtenida de Invitrogen, Estados Unidos.

Se utilizaron los siguientes kits comerciales:

- TURBO DNA-free™ (Ambion, USA) para la eliminación de DNA de muestras de RNA.
- Improm II (Promega, USA) para la síntesis de cDNA.
- Sensi Mix™ (Bioline, USA). Para la amplificación en ensayos de PCR en tiempo Real.
- Axiprep™ (Axigen Biosciences, USA). Para la purificación de DNA plasmidial
- Favorgen. (Taiwan). Para la purificación de productos de PCR
- BP Clonase™ II Enzyme Mix y LR Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen, USA) para el clonamiento mediante el sistema GATEWAY® (Invitrogen, USA)

2.5 Otros reactivos y materiales

- Marcadores de DNA “100 pares de bases” y “1kilobase plus”, nucleótidos (dATP, dCTP, dTTP y dGTP); obtenidos de Invitrogen, Estados Unidos.
- Sacarosa, glucosa, manosa, fructosa, manitol, cloruro de calcio (CaCl_2), cloruro de potasio (KCl), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de litio (LiCl_2), cloroformo (CHCl_3), N',N'-dimetilformamida ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$ o DMF), formaldehído en solución al 37% v/v, isopropanol o 2-propanol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$), alcohol isoamílico ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), etanol absoluto

(C₂H₅OH) y dimetilsulfóxido (DMSO), hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH), ácido clorhídrico (HCl), ácido acético glacial (CH₃COOH), agar-agar, tritón X-100, X-Gluc; obtenidos de MERCK, Alemania.

- N-2-hidroxi-etilpiperazina (HEPES), ácido 3-(N-morfolino) propanolsulfónico (MOPS), dietilpirocarbonato (DEPC), β-mercaptoetanol, Tris(hidroxiometil)-aminometano (Tris), N-Z aminaA o hidrolizado de caseína, CTAB o bromuro de cetiltrimetilamonio ((C₁₆H₃₃)N(CH₃)₃Br), espermidina (C₇H₁₉N₃), acetato de sodio (NaCH₃COO), azul de bromofenol ((C₁₉H₁₀O₅SB_{r4}), polivinilpolipirrolidona (PVPP), fosfato de sodio (NaPO₄), ferricianuro de potasio (K₃Fe(CN)₆), ferrocianuro de potasio (K₄Fe(CN)₆); IAA (Indol-3-ácido acético), lanolina y NPA (ácido naftil-p-talámico); obtenidos de Sigma Aldrich, USA.
- [5-³H]IAA, obtenido de American Radiolabeled Chemicals Inc.
- Agarosa, glicerol 85% v/v, Tampón TAE-50x; WINKLER (México).

2.6 Sitios de internet, bases de datos y programas computacionales

- La búsqueda de genes de *V. vinífera* se realizó en Grape Genome Browser (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>).
- Para los análisis bioinformáticos de homología de secuencia se utilizó BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
- Los análisis estadísticos de todos los datos obtenidos en este trabajo, se realizaron utilizando el software estadístico infoStat. (<http://www.infostat.com.ar>).

2.7 Oligonucleótidos

Oligonucleótidos específicos para la amplificación de secuencias de *Vitis vinifera* fueron sintetizados por IDT Integrated DNA Technologies, Inc, (USA) y distribuidos por Fermelo S.A. en Chile. El detalle de la secuencia de estos oligonucleótidos se encuentra en la Tabla N° 1.

Tabla N°1: Secuencia y temperatura de apareamiento de los oligonucleótidos utilizados

| Gen | Secuencia partidores 5'->3' | T° de apareamiento |
|----------------------|--|--------------------|
| UFGT | F-GGGATGGTAATGGCTGTGG R-ACATGGGTGGAGAGTGAGTT | 60 |
| MYBA1 | F-TAGTCACCACTTCAAAAAGG R-GAATGTGTTTGGGGTTTATC | 55 |
| HT2 | F-GTTGCCGTCAACTTCGCAAC R-GAAGGAATTTAGCTATGGCAGAG | 58 |
| HT3 | F-TAATCGAACGGGGATCAAG R-CCCCAGAAATCAATAAAACTC | 58 |
| HT6 | F-CTGTTCCGGTAGTGTCCAGA R-GCTCTCTTCATCCCCTGTT | 58 |
| Expansina | F-ACCTAGTCCTCATCACAAACGTTG R-TTTTGGCCCCAGTTCCTG | 58 |
| Celulosa sintasa | F-ACTGCAAACCCATTATTGAACC R-GACATGACCCACCATCATCG | 58 |
| Ubiquitina | F-TCTGAGGCTTCGTGGTGGTA R-AGGCGTGCATAACATTTGCG | 55 |
| GPDH (qRT-PCR) | F-TTGGCATTGTGGAGGGTCTT R-TTCCACCTCTCCAGTCCTTCA | 55 |
| GPDH (RT-PCR) | F-CAGGATGCCATGTGGGACAA R-GTGTTGCCTTCATTGAATTGG | 55 |
| PIN1 | F-GGTAGCGGGTGGGCGCAATT R-ACATGCCTGGGTGGGTGCC | 58 |
| Promotor MybA1 2Kb | F-CGAGTCAACTCAACACAAGAGA R-GATGTCATTTTTGACCTTCTTCAA | 54 |
| Promotor MybA1 1,5Kb | F-CAAAACCAACAAAACGCAAC R-GATGTCATTTTTGACCTTCTTCAA | 54 |
| Promotor MybA1 1Kb | F-GGACCCCTCCCTCTGGGAAA R-GATGTCATTTTTGACCTTCTTCAA | 54 |
| Promotor MybA1 0,5Kb | F-ACCACGGTTTCTGACAGCCG R-GATGTCATTTTTGACCTTCTTCAA | 54 |

3. MÉTODOS

3.1- Obtención de material vegetal de *Vitis vinifera* y tratamientos con azúcar.

3.1.1 Tratamientos con azúcar a frutos de *Vitis vinifera* cv. Red Globe sin ser removidos de la planta.

Los tratamientos realizados a racimos completos del cultivar Red Globe fueron desarrollados en tres parcelas ubicadas en distintos lugares: Curacaví, Huechun y Malloco; y durante dos temporadas (Enero-Marzo 2013 y Enero-Marzo 2014). En cada lugar se escogieron 5 plantas de manera azarosa y de ellas 15 racimos para realizar los tratamientos. Se utilizaron tres racimos como réplica biológica para cada tratamiento, cuyos frutos se encontraban en estado EL31, que corresponde a cuatro semanas post-floración, según la clasificación de estados definida por Coombe B.G en 1995. Los racimos, sin ser removidos de la planta, fueron asperjados con 200ml de una solución 100mM de glucosa, fructosa, manosa o manitol, este último se utilizó como control de estrés osmótico y además se utilizó agua como control del tratamiento. Inmediatamente después de realizar el tratamiento, se tomaron muestras de frutos, que corresponden al tiempo 0 y diez días después, los tratamientos se repitieron en los mismos racimos y con las mismas condiciones con las que fueron realizados la primera vez. Además del tiempo 0, se tomaron muestras cada 10 días, en donde se extrajeron 5 frutos de cada racimo tratado y se sumergieron en nitrógeno líquido para ser almacenados a -80°C para posteriores análisis.

3.1.2 Tratamientos con azúcar a frutos de *Vitis vinifera* removidos de la planta.

Plantas de *Vitis vinifera* cultivar Red Globe fueron marcadas en terreno para la recolección de frutos a lo largo de distintas etapas del desarrollo. De esta manera, la recolección se llevó a cabo en las siguientes etapas: etapa I (estado 31: EL31, que corresponde a cuatro semanas post-floración), etapa II (estado 35: EL35, que corresponde a 8 semanas post-floración) y etapa III (estado 36: EL36, que corresponde a 12 semanas post-floración) (Coombe B.G 1995). El estado EL35 corresponde al estado de pinta, el cual fue determinado cuando el 50% de los frutos de cada racimo presentaban pigmentación y el fruto presentaba una concentración de sólidos solubles de aproximadamente 8°Brix (8% p/p sólidos solubles). Los frutos se obtuvieron de tres plantas distintas, en donde cada una representaba una réplica biológica y en cada muestreo se recolectaron azarosamente 60 frutos de cada planta.

Las muestras fueron divididos en dos grupos: 20 frutos para análisis de expresión génica a lo largo del desarrollo y 40 para tratamientos con azúcar. Los frutos recolectados para análisis de expresión génica, una vez cortados de la planta, fueron inmediatamente sumergidos en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta la extracción de RNA total. Los frutos recolectados para tratamientos con azúcar fueron seccionados de manera transversal en discos de 0,1cm de grosor e incubados durante 30 minutos en 10 ml del buffer de equilibrio, descrito previamente en materiales. Posteriormente fueron incubados durante 120 minutos en 10 ml del buffer de incubación anteriormente descrito en materiales, el cual fue suplementado con 50, 100 o 150 mM de glucosa, fructosa o manitol. Luego de la incubación, los discos de frutos fueron sumergidos en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C para la posterior extracción de RNA y análisis de expresión génica.

3.1.3 Tratamientos con azúcar a cultivos celulares de fruto de *Vitis vinifera*.

Cultivos celulares de fruto de vid fueron obtenidos por el Instituto de las Ciencias de la Vid y el Vino de la Universidad de Bordeaux, Francia, según como está descrito en Coutos-Thévenot P y cols. 1992a, y en Coutos-Thévenot P y cols. 1992b. Los cultivos eran crecidos en medio CSB, previamente descrito en materiales, y subcultivados cada 7 días. Se mantenían en condiciones de oscuridad, con agitación constante a 120 rpm y 21°C. Para el desarrollo del experimento, en el séptimo día de crecimiento, se agregó al medio de cultivo glucosa o manitol en una concentración final de 100mM, concentración en la que se observaron resultados positivos en experimentos realizados con frutos. Se utilizaron tres matraces con cultivos como réplica biológica para cada tratamiento. El día previo al tratamiento, con el fin de homogeneizar el número de células, los cultivos con los que se desarrolló el experimento fueron incorporados en un matraz de 500 ml y posteriormente devueltos al matraz original. El día del experimento, una vez agregada el azúcar a cada cultivo, estos se mantuvieron en condiciones de oscuridad con agitación a 120 rpm y 21°C. Se tomaron muestras cada dos horas, durante ocho horas, en donde el control estaba representado por la muestra tomada en el tiempo 0, que corresponde al mismo instante en que se incorporó el azúcar. Para eliminar el líquido externo a las células de cada muestra, estas fueron filtradas con un filtro de 0,2 µm y posteriormente congelaron con nitrógeno líquido y almacenaron a -80 °C.

Todo lo anteriormente descrito se desarrolló en condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar.

3.1.4 Tratamientos con glucosa, NPA e IAA a frutos de de *Vitis vinifera* sin ser removidos de la planta.

Los tratamientos fueron desarrollados en la parcela experimental de Curacaví durante la temporada (Enero-Marzo 2014). En cada lugar se escogieron 5 plantas de manera azarosa y de ellas 12 racimos para realizar los tratamientos. Se utilizaron tres racimos como réplica biológica para cada tratamiento cuyos frutos se encontraban en estado EL31, que corresponde a cuatro semanas post-floración, según la clasificación de estados previamente definida por Coombe B.G en 1995. Los racimos, sin ser removidos de la planta, fueron tratados con glucosa 100 mM, NPA 40 μ M, glucosa 100 mM + NPA40 μ M o IAA 1 μ M. Para realizar los tratamientos con NPA o IAA se utilizó lanolina. A los 4 días se tomaron muestras de frutos para cuantificar el transporte polar de auxina, mientras que a los 4 DPT y a los 14 DPT se tomaron muestras para posteriores análisis, por lo que éstas se sumergieron en nitrógeno líquido para ser almacenados a -80 °C.

3.2- Extracción y manipulación de ácidos nucleicos de *Vitis vinifera*.

3.2.1 Extracción de ADN genómico

DNA de *V. vinifera* fue obtenido desde hojas de plantas de vid crecidas *in vitro*. Para esto 200 mg de tejido vegetal fueron congelados en nitrógeno líquido y posteriormente molidos hasta obtener un polvo fino. Se agregó 500 μ L de buffer CTAB a las muestras y luego fueron incubadas a 55°C durante 15 min en baño termoregulado. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 12000 x g durante 5 min a 4 °C y el sobrenadante fue

transferido a un tubo nuevo. 250 μL de cloroformo: IAA (24:1) fueron adicionados y mezclados por inversión para luego centrifugar a 12000 x g durante 1 min. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se agregó 50 μL NaOAc 7,5 M y 500 μL de etanol absoluto frío. Los tubos fueron almacenados a -20°C durante 12 horas. Posteriormente fueron centrifugados a 12000 x g durante 1 min y el sobrenadante fue eliminado. El sedimento fue lavado con 500 μL de etanol frío al 70% y posteriormente centrifugado durante 1 min a 12000 x g. El sobrenadante fue removido y el sedimento fue secado durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez seco, el sedimento fue resuspendido en 100 μL de agua estéril y luego fue almacenado a -20°C hasta su uso.

3.2.2 Extracción de ARN total

Para la obtención de ARN total de frutos y cultivos celulares de *Vitis vinifera*, inicialmente ambos tejidos deben ser molidos, por lo que deben estar completamente congelados. El método de extracción de ARN utilizado fue previamente publicado por Reid K. y cols. en 2006, por lo que los siguientes pasos después de la molienda fueron los mismos para ambos tejidos. Se incorporaron 3 g de tejido molido a un tubo de 50 ml y se agregaron 15 ml de buffer de extracción (CTAB 2% p/v, PVPP 2% p/v, Tris HCl 300 mM, EDTA 25 mM, NaCl 2 M, espermidina 0,05% p/v y β -mercaptoetanol 2% v/v). El homogeneizado fue incubado en baño a 65°C durante 10 minutos y posteriormente lavado 3 veces con 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico centrifugando a 3500 x g durante 15 minutos a 4°C , entre cada lavado. Luego se agregó 0,1 volúmenes de NaOAc al sobrenadante y 0,6 volúmenes de isopropanol y se incubó durante 30 minutos a -80°C . Posteriormente, la

muestra fue centrifugada a 3500 x g durante 40 minutos a 4 °C. El sedimento obtenido fue resuspendido en 1ml de buffer TE pH 7,5 y transferido a un tubo de 1,5 ml. Al sobrenadante obtenido se agregó 0,3 volúmenes de LiCl 8 M y se incubó durante 12 horas a 4 °C. Luego de las 12 horas de incubación las muestras fueron centrifugadas a 3500 x g durante 30 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se obtuvo un sedimento de RNA, el cual fue lavado con etanol 70% v/v, secado a temperatura ambiente y posteriormente resuspendido en 20 µl de agua-DEPC.

3.2.3 Cuantificación de la concentración del ARN

La concentración de RNA se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm a partir de 1µl de RNA en NANODROP 2000c (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE).

3.2.4 Tratamiento del ARN total con DNasa

Para utilizar el ARN en la síntesis de ADN complementario, previamente fue tratado con TurboTM DNasa (Ambion). Para esto 150-200 µg de RNA fueron tratados con 1µl de TurboTM DNasa y 0,1 volúmenes de 10× TURBO DNasa Buffer. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se agregó 0,1 volúmenes de DNase Inactivation Reagent para detener la actividad de la enzima y se centrifugaron a 10.000 x g durante 2,5 minutos. Finalmente se recuperó el sobrenadante, correspondiente al RNA.

3.2.5 Síntesis de cDNA mediante RT-PCR (reacción de transcripción inversa seguida de PCR)

Se sintetizó cDNA a partir del RNA extraído desde muestras de tejido de vid utilizando el sistema comercial ImpromII™ Reverse Transcription System (Promega). Para esto 1µg de RNA, previamente tratado con DNasa (Ambion), fue mezclado con 1µl (50 ng/µL) de random primers. La mezcla se llevó a un volumen final de 10µl con agua DEPC e incubó a 70°C durante 10 minutos, para luego pasar rápidamente los tubos a hielo. Se agregaron 10µl de una solución RT que contenía: 4µl de buffer 5X (Tris-HCl 10 mM pH 9, KCl 50 mM, Triton-X100 0,1 % v/v), 1µl de MgCl₂ 25mM, 1µl de dNTPs 10mM, 1µl de Transcriptasa reversa (50U) y 3µl de agua libre de nucleasas. La reacción se incubó en un termociclador a 25°C durante 10 minutos, 42°C durante 60 minutos y 70°C durante 15 minutos.

3.3 Cuantificación de transcritos de RNA mediante qPCR (PCR cuantitativo en tiempo real).

Los niveles de transcrito de RNA fueron cuantificados mediante qRT-PCR. Para esto se utilizó el sistema comercial Brilliant SYBR Green "Sensi MixPlus SYBR kit" y el equipo de PCR en tiempo real Stratagene Mx3000P.

Primero se analizó la eficiencia y la calidad de los partidores que se utilizaron. Para esto se realizaron diluciones seriadas del producto de PCR amplificado por los partidores específicos de cada gen a analizar, las que fueron utilizadas como molde para una reacción de PCR. La reacción se realizó en 25 µl totales, en donde se agregó 1 µl de muestra

templado; 12,5 µl de Sensi MixPlus SYBR (buffer de reacción, DNA polimerasa, dNTPs, MgCl₂, 6mM de SYBR Green I y estándar interno ROX); 0,5 µl de cada partidor 10 µM y 10,5 µl de agua ultra pura. Se utilizó el siguiente programa para la amplificación: 10 minutos a 95 °C (activación de la enzima), y 40 ciclos de: 20 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55-60 °C y 20 segundos a 72 °C. Para calcular la eficiencia de cada partidor el valor del Ct de cada dilución fue graficado y la pendiente de la curva se utilizó para calcular la eficiencia según la siguiente ecuación: Eficiencia = $10^{(-1/\text{pendiente de la curva estándar})}$. Se utilizaron partidores con eficiencia entre 90 y 100%.

Posteriormente, para cuantificar los niveles de transcritos se utilizó como molde muestras de cDNA sintetizadas a partir del RNA extraído de cada tejido de vid. La reacción se llevó a cabo utilizando los mismos reactivos descritos anteriormente, en las mismas proporciones. Se utilizó para cada experimento cDNA proveniente de 3 réplicas biológicas y además para cada réplica biológica se realizaron 3 réplicas técnicas. Como control de normalización se utilizaron los transcritos de dos genes: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) y ubiquitina. Los cuales fueron determinados como genes de expresión constitutiva mediante el programa geneNorm (Vandesompele J y cols. 2002).

3.4 Técnicas básicas de DNA recombinante

3.4.1 Obtención de fragmentos de DNA por PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

Las reacciones de PCR fueron realizadas con un volumen final de 25 µl y utilizando Taq polimerasa de invitrogen. Para esto se utilizó 1 µl de templado (DNA o cDNA) y se mezcló

con 2,5 µl de buffer 10X, 0,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µl de dNTPs 10 mM, 0,5 µl de cada oligonucleótido específico 10 µM, 19,2 µl de agua ultra pura y 0,3 µl de Taq polimerasa. Para llevar a cabo la reacción inicialmente se realizó una etapa de desnaturalación a 94 °C por 5 minutos, seguido de 30-40 ciclos de las siguientes 3 etapas: 94 °C por 30 segundos (desnaturalación), 55-60 °C (dependiendo de la composición de los oligonucleótidos) por 30 segundos (hibridación) y 72 °C por 30-120 segundos (dependiendo del tamaño del producto de PCR a amplificar) (elongación). Para terminar se realizó una etapa final de elongación a 72 °C por 7 minutos.

3.4.2 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Los fragmentos de DNA obtenidos por PCR fueron separados mediante electroforesis en gel horizontal de agarosa al 1-3% p/v, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. Los geles se prepararon con buffer TAE al 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM; pH 8,0) y los fragmentos de DNA fueron teñidos con GelRed (Biotium), el cual fue agregado al gel en una concentración final de 1X. Las muestras fueron cargadas en el gel con ¼ de su volumen de una solución de carga constituida por glicerol 20% v/v, sarcosyl 0,1% p/v, azul de bromofenol 0,1% p/v y EDTA 25 mM. La electroforesis se realizó a 50 mA (100V) por 30 minutos usando TAE 1X como solución de corrida. Finalmente los fragmentos de DNA fueron visualizados en un transiluminador UV.

3.4.3 Clonamiento de la región promotora del gen *MybA1*.

Para analizar la actividad del promotor del gen *MybA1* se obtuvo mediante PCR un producto de 1 Kb correspondiente a la región río arriba del gen *MybA1* (desde el ATG). El producto de PCR fue clonado en el vector TOPO-SD (invitrogen), para lo cual se diseñaron partidores específicos que amplificaran esta región y que además tuvieran la secuencia CACC en el extremo 5' del partidor F, para luego introducir el producto de PCR en el vector. En un volumen final de 6µl se agregó: 1 µl del vector, 4 µl de producto de PCR y 1 µl de solución de sales. La muestra se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente se procedió a transformar células de *E.coli* con el producto de esta reacción.

3.4.4 Transformación de células de *E. coli* con plásmidos de interés.

Células de *E. coli* químicamente competentes fueron transformadas con el vector TOPO-SD que llevaba incorporado la región promotora del gen *MybA1*. Para esto, las células fueron descongeladas en hielo y mezcladas con 10 µl de la solución con el vector modificado. La mezcla fue incubada a 42 °C por 40 segundos y luego mantenidas en hielo por 3 minutos. Posteriormente se adicionaron 200 µl de medio LB y se incubaron a 37 °C con agitación durante 1 hora. Al pasar la hora de incubación, el cultivo fue sembrado en placas de LB con espectinomicina 50 µg/µl. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 12 horas y luego las colonias que crecieron fueron analizadas mediante PCR, para confirmar la presencia de esta región, para lo que se utilizaron los partidores que amplificaban específicamente la región promotora del gen *MybA1*. Las colonias bacterianas

positivas fueron crecidas en 2 ml de medio LB con el antibiótico de selección para la posterior extracción del plásmido.

3.4.5 Obtención de DNA plasmidial a partir de cultivos bacterianos.

Los cultivos bacterianos de *E.coli* DH5 α positivamente transformados con el vector de interés fueron crecidos en medio LB a 37 °C con agitación y en presencia del antibiótico de selección, en este caso espectinomicina 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Los plásmidos fueron purificados a partir de 2 ml de cultivo bacteriano utilizando el sistema comercial Miniprep de AXYGEN. Una alícuota de plásmido purificado fue enviada a Macrogen Inc. para su secuenciación. Para chequear la identidad de secuencia de las construcciones obtenidas, fue utilizado el software Vector NTI.

3.4.6 Recombinación de plásmidos a partir del sistema GATEWAY.

El vector TOPO-SD (invitrogen) posee los sitios attL que recombinan con los sitios attR del vector de destino PKGWFS7, reacción que es catalizada por la enzima BP clonase. Al incorporarse la secuencia de interés en este vector, esta queda río arriba del gen reportero *uidA*, que codifica para la proteína GUS y a partir de la actividad de la proteína GUS se mide la actividad del promotor. Para llevar a cabo la reacción de recombinación se utilizó el kit BP clonaseTM II Enzyme mix, y en un volumen final de 8 μl se incubaron el vector TOPO-SD con el fragmento de interés (150 ng/ μl), el vector de destino (150 ng/ μl), 2 μl Mix BP clonasa y buffer TE, pH 8.0 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). Se incubó toda la noche a

4 °C, luego se agregó 1 µl de proteinasa K 20 mg/ml y se incubó a 37 °C durante 10 minutos. Finalmente se transformaron células competentes de *E.coli* con la mezcla.

3.4.7 Preparación de *Agrobacterium tumefaciens* electrocompetente.

Para la preparación de células electro-competentes 500 mL de medio LB suplementado con rifampicina a una concentración de 50 µg/ml fue inoculado con 1 mL de un cultivo saturado de *A. tumefaciens* GV3001 e incubado a 28°C en agitación (120 rpm) hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0,5. Posteriormente las células fueron centrifugadas durante 10 min en frío a 4000 x g en tubos de polipropileno de 50 ml y el sedimento celular fue resuspendido en 50 mL de agua MilliQ estéril y fría. Este paso se repitió dos veces, asegurando que las células permanezcan siempre frías. A partir de este momento se consideraban las bacterias como competentes para la transformación mediante el método de electroporación. Posteriormente las bacterias fueron mezcladas con glicerol (concentración final 14% v/v) y alicuotadas en tubos eppendorff. Luego fueron congeladas en N₂ líquido y almacenadas a -80 °C.

3.4.8 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con plásmidos de interés.

Para la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con el vector PKGWFS7 modificado, según lo descrito en el punto 3.4.6, 100 µL de células electrocompetentes de *A. tumefaciens* GV3101 fue agregado 1 µg del plásmido y la mezcla fue transferida a una

cubeta de electroporación de 2 mm. La electroporación fue realizada utilizando las siguientes condiciones: 25 uF de capacitancia, 2,4KV y 200 Ohms de resistencia. El pulso de electroporación fue de 5 seg. Inmediatamente después, se agregó 1 mL de LB a la cubeta y la suspensión bacteriana fue transferida a un tubo de cultivo de 15 mL. La recuperación de las células fue realizada a 28 °C durante 4 h en agitación constante. Las células fueron colectadas por centrifugación y sembradas en placas de LB agar suplementado con el antibiótico Espectinomicina. Las placas fueron incubadas durante 48 h a 28 °C hasta que las colonias fueron visibles. Las colonias resistentes al antibiótico fueron analizadas por PCR con partidores específicos los productos de PCR fueron clonados y secuenciados.

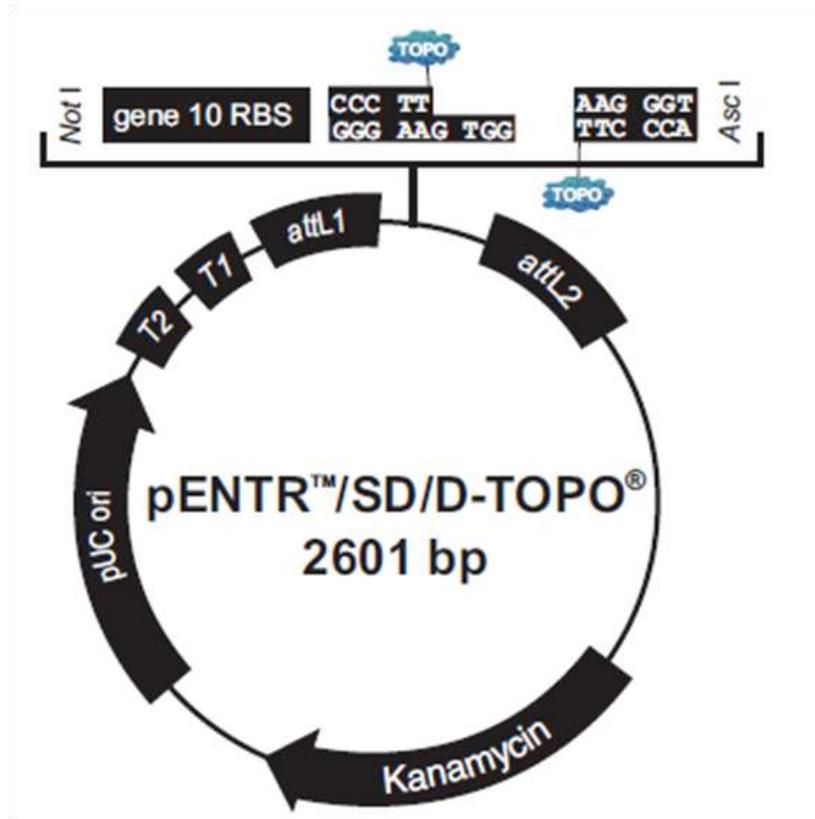


Figura 4: Esquema del vector de entrada pENTR™/SD/D-TOPO

Vector de entrada utilizado para clonar el promotor del gen *MybA1* con el sistema de recombinación GATEWAY. En la figura se muestran los sitios de recombinación attL1 y attL2 del vector, que recombinan con los sitios attR1 y attR2 presentes en el vector PKGWFS7. Este vector presenta resistencia a kanamicina.

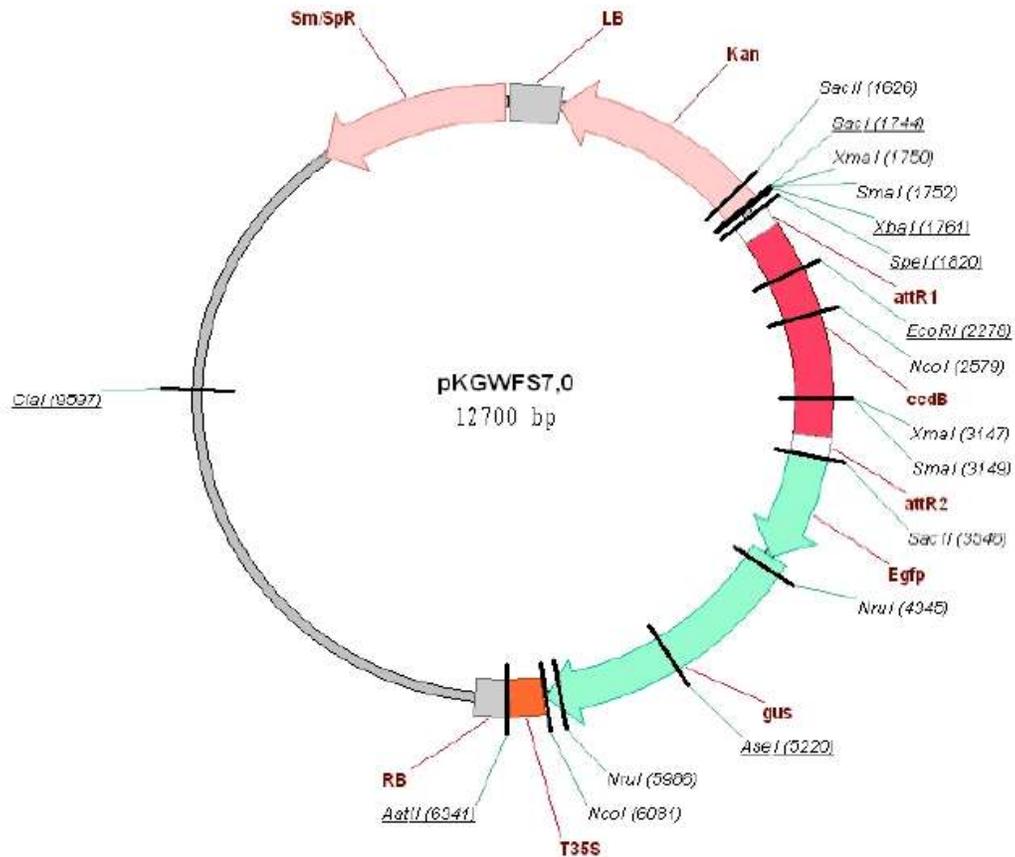


Figura 5: Esquema del vector PKGWFS7

Vector de destino utilizado para clonar el promotor del gen *MybA1* con el sistema de recombinación GATEWAY. El vector posee un gen reportero que codifica para la proteína GUS y otro que codifica para la proteína fluorescente GFP (ambos en verde), lo que permite analizar la actividad del promotor en estudio. Los sitios de recombinación attR1 y attR2 (blanco) recombinan con los sitios de recombinación attL1 y attL2 del vector de entrada. También tiene un de resistencia a espectinomomicina para bacterias y kanamicina para plantas.

3.4.9 Transformación transiente de hojas de vid con *Agrobacterium tumefaciens*

Para la transformación de hojas de vides, 200 μ l de una solución de *Agrobacterium* previamente transformada con el plásmido de interés se inoculó en 10 ml de medio LB con kanamicina 50 μ g/ml y se incubó durante 12 horas a 28°C en agitación. Posterior a las 12 horas 1 ml del cultivo se inoculó en 5 ml de medio de pre-agroinfiltración (medio LB + MES 10mM, acetosiringona 150 μ M y kanamicina 50 μ g/ml). Este cultivo, al igual que el anterior, se incubó durante 12 horas a 28°C en agitación. Posteriormente las células fueron centrifugadas durante 15 min en frío a 4000 x g en tubos de polipropileno de 50 ml y el sedimento celular fue resuspendido en 5 mL de buffer de inducción (MES 10 mM pH 5,6, MgCl₂ 10 mM, sacarosa 2% p/v y acetosiringona 150 μ M). La mezcla se incubó durante 3-5 horas a temperatura ambiente hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0,4. Las hojas de plantas de vid crecidas *in vitro* durante 8 semanas fueron cortadas sin eliminar la parte inicial del tallo. Estas fueron colocadas en 5 ml de solución con *Agrobacterium*, en multiplacas de 6 pocillos, con la superficie abaxial hacia abajo y posteriormente cubiertas con un filtro miracloth, de tal manera de cubrir toda la superficie de la hoja. Se realizó vacío (15 mmHg) durante 2 minutos, repitiendo este proceso 4 veces. Finalmente las hojas fueron lavadas con agua estéril, con el fin de eliminar todas bacterias de la hoja y luego fueron incubadas en distintas soluciones de buffer de incubación, previamente descrito en materiales, suplementado con glucosa, fructosa o manosa 100 mM.

3.5 Análisis cualitativo de la actividad GUS en hojas de vid

Hojas de plantas de vid crecidas *in vitro* previamente transformadas e incubadas en soluciones con distintos azúcares fueron incubadas en la solución de coloración GUS (NaPO_4 50 mM pH 7,2; $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,5 mM; $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0,5 mM; Tritón X-100 0,1% v/v) con X-Gluc 1 mM (la solución stock estaba 100 mM en dimetilformamida). Se aplicó vacío durante 10 minutos y se incubaron a 37 °C durante 12 horas (Jefferson R. 1987). Finalmente las hojas fueron desteñidas con etanol 70% v/v a 37 °C y posteriormente observadas en una lupa NIKON ZM-81 y en un microscopio óptico eclipse 80i, Nikon Instruments inc.

3.6 Cuantificación del contenido de antocianinas en frutos de vid.

Se cuantificó el contenido total de antocianinas en frutos tratados con glucosa, fructosa, manosa, manitol y agua. Esto se realizó según el protocolo descrito en Hurley B. y cols. en 2010. Para esto las bayas muestreadas en el tiempo 20 y 40 fueron molidas en presencia de N_2 líquido y luego 15 gramos de tejido de cada baya fueron homogeneizados en 1ml de solución tampón de extracción (18% v/v 1-propanolol y 1% HCL concentrado) y luego agitadas durante 1 hora. El homogeneizado se puso en agua hirviendo durante 1 hora y luego incubado por 10 horas a 23°C en oscuridad. Se cuantificó la absorbancia del sobrenadante a 535 y 650 nm y se calculó el contenido de antocianinas totales por gramo de peso fresco según $A_{535}-A_{650} * 0.24$. Este último para compensar la pequeña absorbancia de la clorofila.

3.7 Análisis de tejidos de *Vitis vinifera* mediante microscopía electrónica.

Frutos de *Vitis vinifera* cv. Red Globe fueron analizados mediante microscopía electrónica. Para esto las muestras se fijaron en buffer de cacodilato 1% pH 7,2 y glutaraldehído 3% durante 3 horas a temperatura ambiente (Lartey R. y cols 1997). Posteriormente fueron deshidratadas con etanol y acetona en distintas concentraciones 50%, 70%, 95% y 100% de manera seriada y se fijaron en Embed 812. Las muestras se dejaron a 60°C durante toda la noche para la polimerización. Se cortaron secciones finas (70-80nm) con un ultramicrotomo Sorvall MT2-B y se tiñeron con acetato de uranilo (Epstein M.A y cols. 1963) y posteriormente con citrato de plata (Reynolds E.S. 1963) para luego ser observadas en microscopio electrónico de transmisión.

3.8 Cuantificación del transporte polar de auxina en frutos de *Vitis vinifera*

El ensayo para la medición del transporte basipétalo del ácido indol-3-acético (IAA) descrito por Else y cols. (2004), se modificó para cuantificar el transporte de IAA a través del eje longitudinal de bayas de vid. Brevemente, las bayas se escindieron del racimo para lo cual se cortó el pedicelo bajo el agua con un bisturí. A continuación, se hizo un pequeño agujero en el extremo apical de la baya para aplicar una gota 0,2 μ L de [5-³H]IAA (actividad específica de 50,55 TBq/mmol, American Radiolabeled Chemicals Inc.) diluida 1:10 en etanol puro. Después de agregar la gota de [5-³H]IAA, las bayas se colocaron con su superficie basal en contacto con discos de agar receptores (1,5% p/v de agar-agar (Merck), 0,2% p/v de MES (Sigma-Aldrich), pH 5,5; en un volumen final de 300 μ l),

dispuestos en una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos (Sigma-Aldrich). A continuación, la placa se cubrió con el fin de mantener la humedad y se mantuvo a 22° C durante 4 horas. Luego de la incubación, las bayas y los discos de agar se homogeneizaron en 2 mL de metanol 80% con agitación durante 12 horas a 4° C y luego se transfirieron a un vial que contenía 3 mL de cóctel de centelleo líquido OptiPhase HiSafe 3 (Perkin-Elmer). La radiactividad acumulada en las bayas y discos de agar se determinó por recuento de desintegraciones por minuto (DPM) en un analizador de centelleo líquido (Beckman LS6500). Los resultados se expresaron como porcentaje (%) de transporte polar de auxina, como se ha descrito previamente en Liu y cols. en 2011, y los valores fueron corregidos por el volumen del fruto y la superficie de contacto, de acuerdo con la ecuación 1:

$$100 \left[\frac{\text{DPM}_{\text{agar}}}{\text{DPM}_{\text{agar}} + \text{DPM}_{\text{bayas}}} \right] (\text{vol}^{1/3} / R) = \% \text{ de transporte polar de auxina (1)}$$

donde DPM_{agar} es la radioactividad acumulada en los discos de agar, y $\text{DPM}_{\text{bayas}}$ es la radioactividad remanente en las bayas. R es el radio de la superficie de contacto y vol es el volumen promedio de las bayas, estimado de acuerdo a la ecuación 2:

$$\left[\frac{4}{3} \pi \left(\frac{\text{TD}^2}{4} \right) \left(\frac{\text{LD}}{2} \right) \right] = \text{vol} [\text{mm}^3] \text{ (2)}$$

donde TD y LD son el diámetro transversal y longitudinal de la baya, respectivamente, medidos usando un caliper. En todas las mediciones una réplica biológica consistió en un *pool* de 6 bayas seleccionadas de un racimo. En total, tres racimos de tres plantas fueron utilizados.

4-RESULTADOS

4.1 Evaluación de la participación de glucosa y fructosa en la inducción del proceso de maduración del fruto de *Vitis vinifera*.

4.1.1 Evaluación fenotípica de racimos tratados con distintas soluciones de azúcar y su efecto sobre la maduración.

Como fue descrito anteriormente, durante el proceso de maduración del fruto de vid ocurren una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos que le permiten a la baya acumular diferentes solutos y diferenciarse en distintos tejidos. Todos estos cambios son normalmente regulados tanto por factores genéticos como ambientales, donde las condiciones climáticas, disponibilidad de nutrientes, etc, afectan de manera importante este proceso. Con el objetivo de determinar la participación de glucosa y fructosa en el proceso de maduración del fruto de vid, racimos con bayas en estado de pre-pinta (EL-31) fueron asperjados con distintas soluciones de estas hexosas, en donde además se utilizó manitol y agua como control. Por otro lado, con el fin de determinar si los posibles efectos causados por glucosa y fructosa son el resultado de una señal gatillada por estas hexosas más que de producto del metabolismo de las mismas, se utilizó también una solución de manosa, debido a que esta es un epímero de glucosa no metabolizable. Se ha demostrado en cultivos celulares de fruto de vid, que esta hexosa al ser reconocida por una hexoquinasa gatilla una cascada de señalización que culmina con la activación de la síntesis de antocianinas (Vitrac X. y cols 2000). La figura 6 muestra distintas fotografías de los racimos de la localidad de

Huechun expuestos a los distintos tratamientos. Estas fotografías representan de manera significativa los resultados obtenidos en las tres parcelas donde se realizaron los experimentos (Huechun, Curacaví y Malloco), así como también lo observado durante las dos temporadas en las cuales se trabajó (2012-2013 y 2013-2014). Se puede ver que aquellos racimos tratados con glucosa y manosa entran en estado de pinta (EL-35) a los 10 días post-tratamiento, es decir 20 días antes que aquellos racimos tratados con fructosa, manitol y agua, los cuales pintaron a los 30 días post-tratamiento. Así mismo, los racimos tratados con glucosa y manosa parecen madurar más tempranamente que aquellos tratados con fructosa, manitol y agua, debido a que ya a los 40 días post-tratamiento el cien por ciento de los frutos presentaron coloración, una de las principales características de un fruto maduro en variedades tintas, sin embargo en ese mismo momento, aquellos racimos tratados con fructosa, manitol y agua, aún tenían un 30% de los frutos en estado verde.

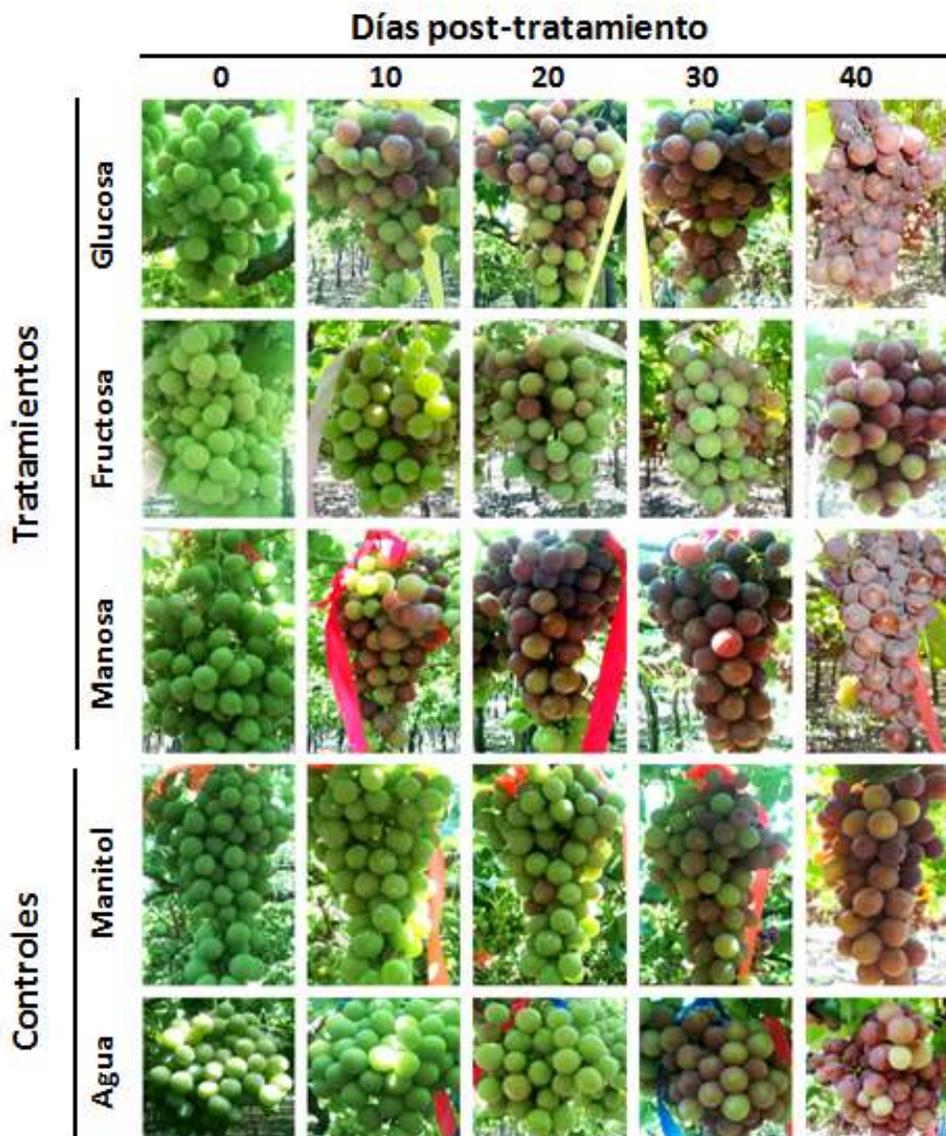


Figura 6: Análisis cualitativo del efecto de los tratamientos con glucosa, fructosa, manosa, manitol y agua sobre los frutos de *Vitis vinifera*.

La figura muestra fotografías de los racimos ubicados en la localidad de Huechun, tratados con glucosa, manosa, fructosa, manitol y agua desde el tiempo 0 (momento en que se realizaron los tratamientos) y cada 10 días hasta el tiempo 40 (40 días post-tratamiento). Para cada tratamiento se utilizaron 3 réplicas biológicas correspondientes a racimos completos.

4.1.2 Efecto de los tratamientos con azúcar sobre el contenido total de sólidos solubles y genes que codifican para transportadores de hexosas.

Durante el desarrollo del fruto de vid, el aumento del contenido de los carbohidratos que comienza en pinta y continua a lo largo de toda la maduración puede ser medido a través de la cuantificación de los grados brix, los cuales representan el contenido total de sólidos solubles que forman parte del fruto, caracterizados principalmente por glucosa y fructosa (Coombe B.G. y McCarthy M.G. 2000). Con el objetivo de determinar el efecto de los distintos tratamientos realizados a frutos de vid sobre la acumulación de los carbohidratos, se cuantificó el contenido total de sólidos solubles (grados brix) de cada uno de los racimos expuestos a los distintos tratamientos. De esta manera, la figura 7 muestra los grados brix presentes en los distintos racimos desde el día 0 hasta los 40 días post-tratamiento. Se puede ver que desde T10 hasta T40 los racimos tratados con glucosa y manosa presentaron mayor contenido total de sólidos solubles que aquellos racimos tratados con manitol y agua. Adicionalmente, en los frutos tratados con fructosa el aumento del contenido total de sólidos solubles se observó más tardíamente que en los racimos tratados con glucosa y manosa, debido a que recién se encuentran diferencias significativas con los racimos control a los 20 DPT. Interesantemente, los niveles de sólidos solubles de los frutos tratados con manitol y agua aumentaron a los 30 DPT, momento en el que también se observó aumento de la coloración de los frutos (figura 6). Sin embargo estos niveles de transcritos permanecieron siempre menores que en los frutos tratados con glucosa y manosa.

En base a lo anterior, se determinó el efecto de los tratamientos sobre la acumulación de transcritos que codifican para transportadores de hexosas y se analizaron mediante PCR

cuantitativo los niveles de transcritos de tres genes cuya expresión se ha encontrado sólo durante maduración. La figura 7 muestra los niveles de transcritos de *VvHT2*, *VvHT3* y *VvHT6* (*VvTMT1*), tres transportadores de hexosas ubicados el primero y el segundo a nivel de la membrana plasmática y el tercero a nivel de tonoplasto. (Fillion L. y cols. 1999; Vignault C. y cols. 2005; Conde C. y Cols. 2006; Hayes M. y cols. 2007; Afoufa-Bastien D. y cols. 2010). A partir de la figura se observa que los transcritos de los tres genes varían a lo largo del desarrollo del fruto y que a su vez los distintos tratamientos afectan los niveles de transcritos de manera significativa. En el caso de *VvHT2*, durante los tiempos T0 y T10 no se encontraron transcritos de este gen presentes en ninguno de los racimos analizados, sin embargo en T20 estos fueron detectables en todos los frutos expuestos a los diferentes tratamientos. Durante este tiempo los frutos tratados con glucosa y manosa presentaron niveles de transcritos más altos que los tratados con fructosa, manitol y agua, no obstante, los frutos tratados con fructosa presentaron mayores niveles de transcritos que aquellos tratados con manitol y agua. Durante T30 y T40 los transcritos de *VvHT2* disminuyeron considerablemente en los racimos expuestos a glucosa y manosa, mientras que aumentaron en aquellos tratados con fructosa, manitol y agua, el mismo periodo en el cual se observó aumento de los grados brix en estos frutos.

En el caso de *VvHT3* se puede ver que los transcritos de este gen fueron detectados por primera vez en T10, sin embargo, recién en T20 los niveles fueron lo suficientemente altos como para evidenciar la existencia de diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Durante este tiempo en los frutos tratados con glucosa, manosa y fructosa los niveles de transcritos de este gen fueron más altos que en los racimos tratados con manitol y agua, sin embargo en estos últimos ocurrió un brusco aumento en T30, llegando incluso a

ser significativamente más altos que en los racimos tratados con glucosa, manosa y fructosa. En T40 todos los frutos presentaron similares niveles de transcritos de *VvHT3*.

Finalmente, en el caso de *VvHT6*, denominado también en la literatura como *VvTMT1* debido a que es un transportador de hexosa ubicado a nivel de tonoplasto, se observa un pequeño aumento de los niveles de transcritos en los racimos tratados con glucosa y manosa durante T10, único momento en el que se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

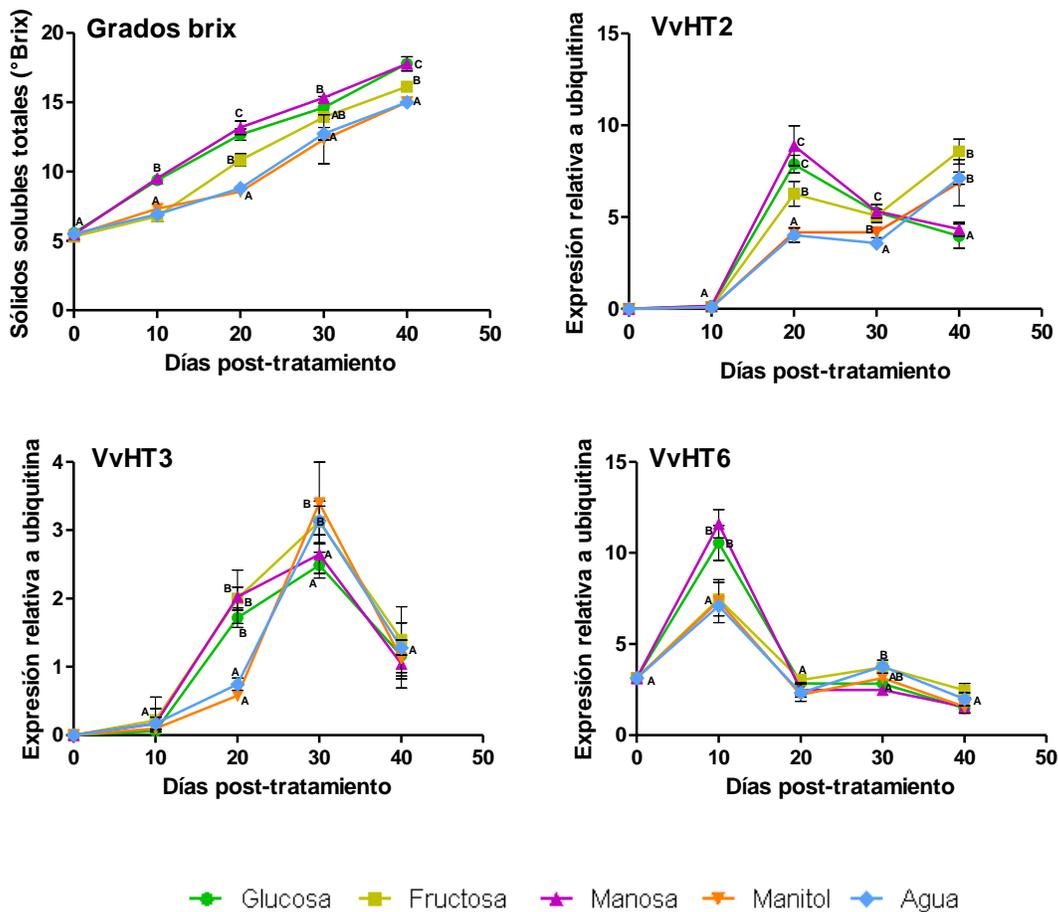


Figura 7: Contenido total de sólidos solubles y niveles de transcritos de genes que codifican para transportadores de hexosas en los racimos tratados con distintos azúcares y agua.

La figura muestra el contenido total de sólidos solubles (°Brix) y los niveles de transcritos de genes que codifican para transportadores de hexosas (*VvHTs*) de membrana plasmática (*VvHT2* y *VvHT3*) y de tonoplasto (*VvHT6*) en los racimos expuestos a distintos tratamientos, a lo largo de todas las fechas de muestreo (T0, T10, T20, T30 y T40). Cada color especificado en la figura, representa el resultado de un tratamiento específico analizado para tres racimos distintos (3 réplicas biológicas). La cuantificación de los grados brix y de los transcritos se realizó de acuerdo a lo descrito en métodos, mientras que para este último parámetro cada gráfico muestra la expresión relativa al gen constitutivo ubiquitina. Letras distintas indican diferencias significativas entre las condiciones analizadas mediante ANDEVA y test de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.1.3 Efecto de los tratamientos con azúcar sobre el tamaño de los frutos y genes involucrados en expansión celular.

Durante el proceso de maduración del fruto de vid el incremento exponencial del tamaño de la baya y el significativo ablandamiento de los tejidos sucede debido a que los polisacáridos que conforman la pared celular se desensamblan para otorgar a las células una mayor flexibilidad y con ello la capacidad de aumentar su tamaño. Estas modificaciones estructurales son catalizadas por las mismas enzimas que forman parte de la pared celular, tales como las expansinas, celulosas sintasas, poligalacturonasas, etc, las cuales actúan conjuntamente para desensamblar la red de polímeros que forman parte de esta y con ello contribuir a la elasticidad y capacidad de expansión de las células (Chervin C. y cols. 2008).

En este trabajo, con el fin de determinar el efecto de los tratamientos con azúcar sobre el aumento del tamaño de los frutos, se midió en cada fecha de muestreo, el diámetro de 20 bayas de todos los racimos tratados. Debido a que las bayas de Red Globe son circulares, a partir del diámetro se calculó el volumen de cada baya y con ello el volumen promedio de las bayas de cada uno de los racimos. La figura 8 muestra el volumen de los frutos a lo largo del desarrollo desde el momento en que fueron realizados los tratamientos. Se puede ver que en T0 todos los racimos comenzaron con frutos de volúmenes similares, sin embargo desde los 20 DPT en adelante, el volumen de los frutos tratados con manosa fue siempre mayor que el de todos los demás, mientras que los frutos tratados con glucosa, desde los 20 DPT en adelante presentaron siempre mayor tamaño que los frutos control y que los frutos tratados con fructosa. En el caso de estos últimos, hasta los 30 DPT no mostraron diferencias significativas con los frutos control, no obstante, a los 40 DPT su

tamaño era significativamente mayor, pero aun así menor que el de los frutos tratados con glucosa y manosa.

Adicionalmente, en este trabajo se cuantificaron los niveles de transcritos de dos genes involucrados en otorgar mayor extensibilidad a las células del fruto, los cuales son Expansina 1 y Celulosa sintasa 1 (Chervin y cols. 2008). Los resultados se muestran en la figura 8, que intenta demostrar la existencia de una correlación entre la variación del volumen de los frutos y el patrón de expresión de genes relacionados con expansión celular. Se puede ver que en T10, en los frutos tratados con glucosa y manosa los niveles de transcritos de expansina 1 son el doble que en los frutos tratados con fructosa, manitol y agua, mientras que en tiempos posteriores, los niveles de transcritos de este gen para todos los frutos fueron similares, a excepción de aquellos tratados con fructosa, cuyos valores aumentan significativamente en T30. Interesantemente, la figura muestra que tanto en los frutos tratados con glucosa y manosa como en aquellos tratados con fructosa, el aumento del tamaño ocurre aproximadamente 10 días después que el aumento de los transcritos que codifican para la enzima expansina 1.

En el caso de los niveles de transcritos del gen que codifica para celulosa sintasa 1, sólo en T20 se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, donde los frutos tratados con glucosa, manosa y fructosa presentaron mayores niveles de transcritos que los frutos tratados con manitol y agua.

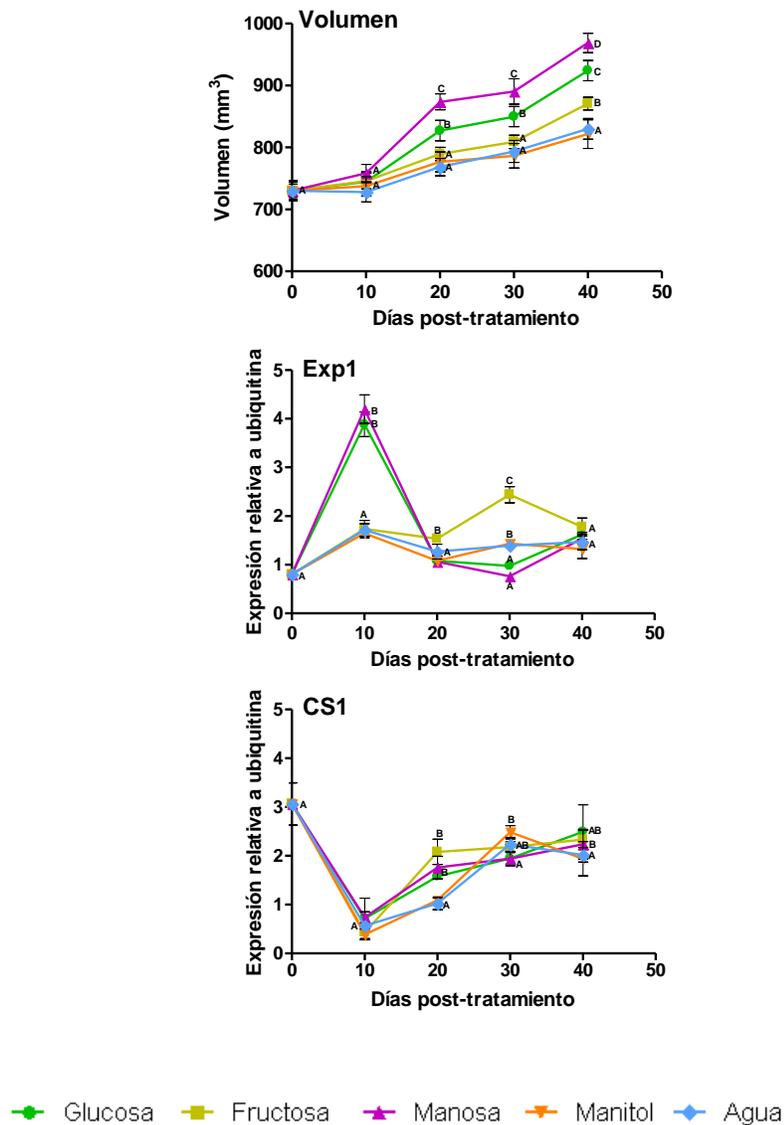


Figura 8: Volumen de los frutos y niveles de transcritos de genes que codifican para enzimas relacionadas con expansión celular en los racimos tratados con distintos azúcares y agua.

La figura muestra las diferencias en el volumen y los niveles de transcritos de genes que codifican para enzimas relacionadas con expansión celular (Exp1 y CS1) en los racimos expuestos a distintos tratamientos, a lo largo de todas las fechas de muestreo (T0, T10, T20, T30 y T40). Cada color especificado en la figura, representa el resultado de un tratamiento específico analizado para tres racimos distintos (3 réplicas biológicas). La cuantificación del volumen y de los transcritos se realizó de acuerdo a lo descrito en métodos. Para este último parámetro cada gráfico muestra la expresión relativa al gen constitutivo ubiquitina. Letras distintas indican diferencias significativas entre las condiciones analizadas mediante ANDEVA y test de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.1.4 Disgregación de la pared celular de frutos expuestos a distintos tratamientos con azúcar.

Tal como se mencionó anteriormente, durante la maduración los tejidos de los frutos de vid se ablandan debido a que los polímeros que forman parte de la pared de las células comienzan a desensamblarse, lo que le otorga a esta un mayor grado de hinchazón y desorden, y al mismo tiempo, a los frutos menor turgencia y un mayor volumen. De esta manera, otra forma de determinar las diferencias en el grado de madurez de los frutos es analizando la disgregación de la pared celular, debido a que los frutos que han entrado en esta etapa del desarrollo presentan mayor disgregación que los frutos en estado verde. Con el objetivo de determinar este tipo de diferencias entre los frutos tratados con las distintas soluciones de azúcar o agua, se analizó el grado de disgregación de la pared de la célula de los frutos a los 20 DPT, a través de microscopía electrónica. En la figura 9 se observa que los frutos tratados con glucosa y manosa presentan mayor disgregación de la pared celular que los frutos tratados con fructosa, lo que concuerda con los resultados obtenidos en los análisis anteriores donde se muestra que glucosa y manosa inducen otros parámetros relacionados con maduración.

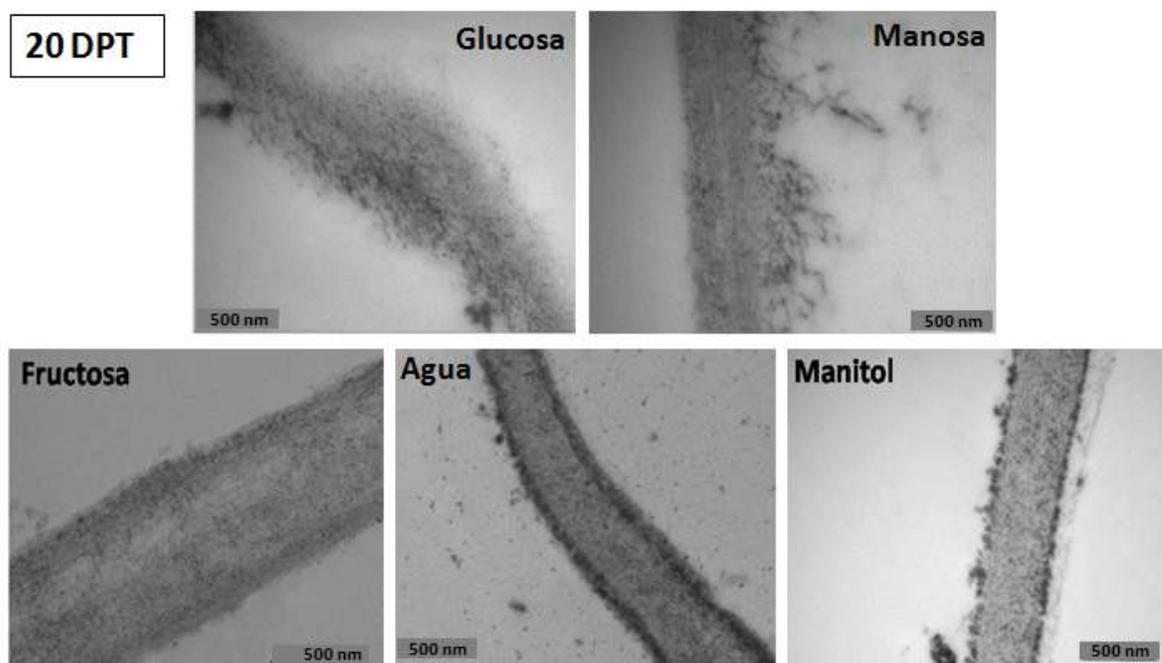


Figura 9: Microscopía electrónica de la pared celular de los frutos expuestos a tratamientos con distintas soluciones de azúcar o agua.

La figura muestra microscopías electrónicas realizadas a los frutos tratados con glucosa, manosa, fructosa, manitol y agua, a los 20 días post-tratamiento. Las microscopías electrónicas se realizaron según el protocolo descrito en métodos. Se muestra una escala de 500nM.

4.2 Evaluación de la regulación de la biosíntesis de antocianinas mediada por glucosa y/o fructosa durante la maduración del fruto de *Vitis vinifera*

4.2.1 Efecto de los tratamientos con azúcar sobre el contenido de antocianinas y genes que participan en la síntesis de estos metabolitos.

Con el fin de determinar el efecto de glucosa y fructosa sobre los niveles de antocianinas durante el desarrollo del fruto de vid, se cuantificó el contenido total de estas moléculas en los frutos tratados con las distintas azúcares y también se cuantificaron los niveles de transcritos del gen *MybA1* luego de 20 y 40 días post tratamiento. Se escogieron estos tiempos debido a que cualitativamente fue el momento en que los racimos a los cuales se les aplicó glucosa y manosa presentaron mayor diferencia con aquellos racimos a los que se les aplicó fructosa, manitol y agua (figura 6). La figura 10 muestra el contenido total de antocianinas (A) a los 20 y 40 DPT de los frutos expuestos a los distintos tratamientos. Se puede ver que los frutos tratados con glucosa y manosa presentaron un contenido de antocianinas significativamente mayor que aquellos tratados con fructosa, manitol y agua. En T20 los racimos tratados con glucosa y manosa presentaron aproximadamente un cincuenta por ciento más de antocianinas que aquellos racimos tratados con fructosa, manitol y agua, y en T40 un cien por ciento más de estos metabolitos. Por otro lado, los racimos tratados con fructosa, manitol y agua mostraron similares niveles de acumulación de antocianinas entre ellos en ambos tiempos.

Estos resultados muestran que glucosa y manosa, al ser agregada de manera exógena al fruto de vid tienen un efecto significativo sobre el contenido total de antocianinas.

Adicionalmente, la figura 10 B muestra que los niveles de transcritos del gen *MybA1* son significativamente más altos en ambos tiempos, en los racimos tratados con glucosa y manosa que en aquellos tratados con fructosa, manitol y agua y que por su parte, los racimos tratados con fructosa, manitol y agua presentaron siempre valores similares entre ellos.

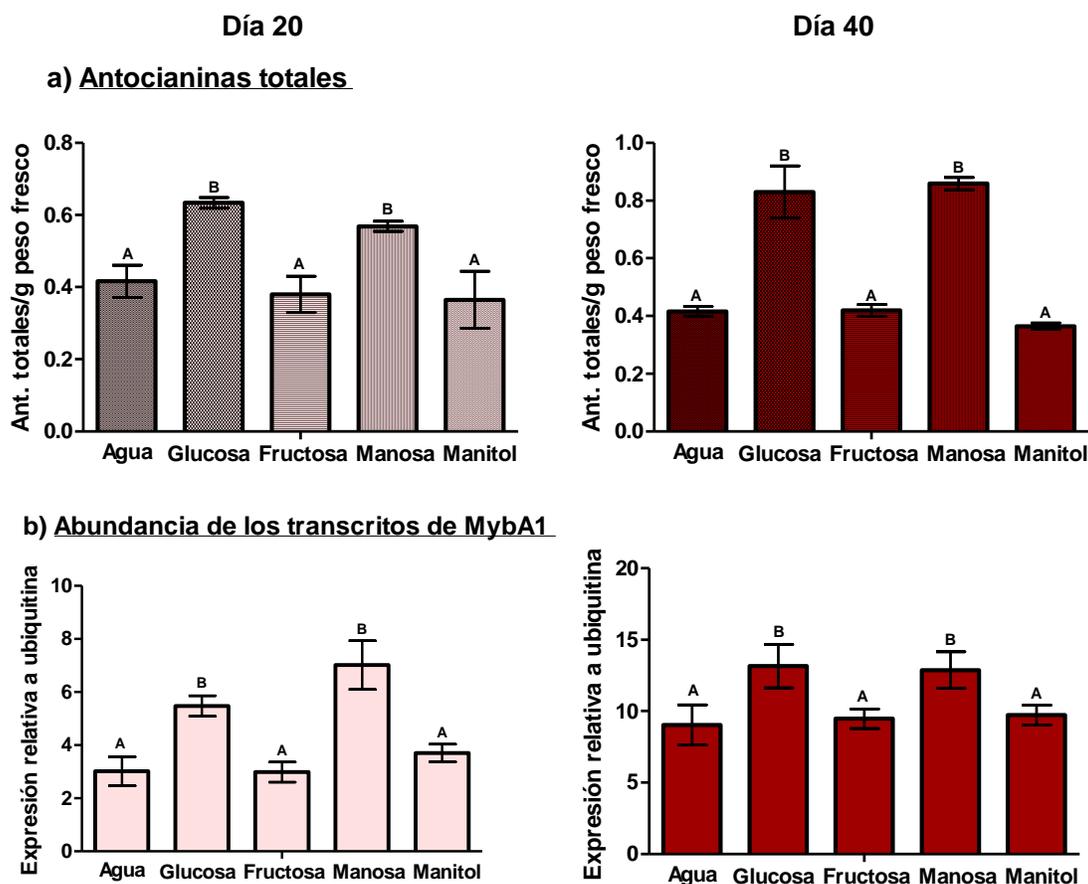


Figura 10: Contenido total de antocianinas y niveles de transcritos del gen *MybA1* para los racimos expuestos a distintos tratamientos con azúcar y agua luego de 20 y 40 días post-tratamiento.

La figura muestra el contenido total de antocianinas (A) y los niveles de transcritos del gen *MybA1* (factor de transcripción MYBA1) (B) de los racimos tratados con glucosa, fructosa, manosa, manitol y agua, luego de 20 y 40 días post-tratamiento. Cada gráfico muestra la desviación estándar de 3 réplicas biológicas representadas por racimos. La cuantificación de las antocianinas y de los transcritos se realizó de acuerdo a lo descrito en métodos. Para este último parámetro cada gráfico muestra la expresión relativa al gen constitutivo ubiquitina. Letras distintas indican diferencias significativas entre las condiciones analizadas mediante ANDEVA y test de Tukey ($p \leq 0,05$).

Adicionalmente, se cuantificaron los niveles de transcritos del gen *MybA1* y también de *UFGT* durante todos los tiempos de muestreo. De esta manera la figura 11 muestra la expresión relativa de estos genes con respecto al gen constitutivo ubiquitina. En esta figura se puede ver que en T0 los niveles de transcritos de ambos genes fueron similares entre los distintos racimos, sin embargo, en T10 los transcritos de *MybA1* ya mostraron diferencias significativas entre tratamientos debido a que los racimos tratados con glucosa y manosa presentaron niveles de transcritos significativamente mayores que los racimos tratados con fructosa, manitol y agua. Interesantemente, estas diferencias se mantuvieron a lo largo de todos los tiempos de muestreo.

Por el contrario, los niveles de transcritos del gen *UFGT* presentaron diferencias significativas entre tratamientos sólo en los días 20 y 30 post-tratamiento, donde al igual que para *MybA1*, los racimos tratados con glucosa y manosa mostraron niveles de transcritos más altos que los racimos tratados con fructosa, manitol y agua.

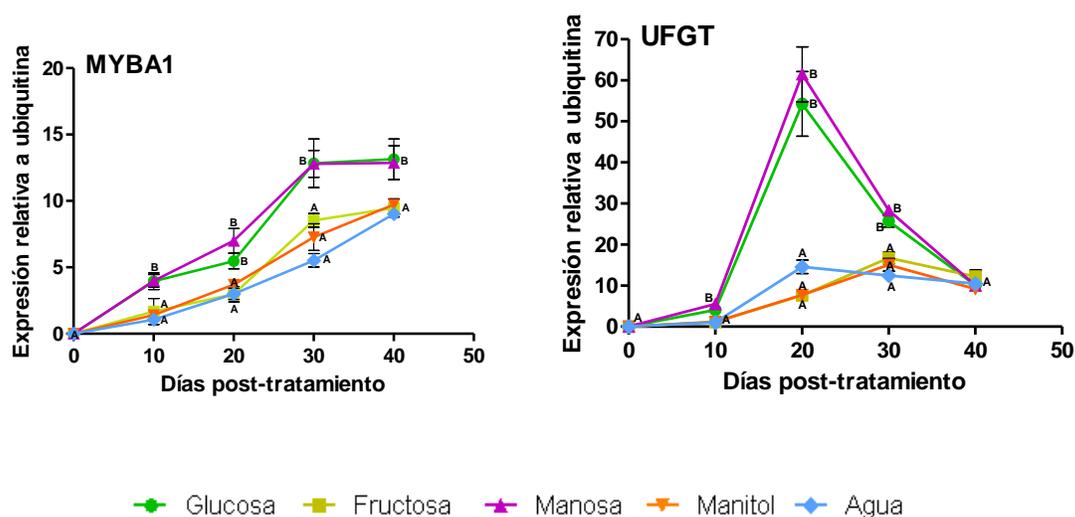


Figura 11: Niveles de transcritos de *MybA1* y *UFGT* en los racimos tratados con distintos azúcares y agua.

La figura muestra la cuantificación de los niveles de transcritos de los genes que codifican para *MybA1* (factor de transcripción MYBA1) y *UFGT* (UDP-glucosa flavonoide 3-O-glucosiltransferasa), en los racimos expuestos a distintos tratamientos, a lo largo de todas las fechas de muestreo (T0, T10, T20, T30 y T40). Cada color especificado en la figura, representa el resultado de un tratamiento, analizado para tres racimos distintos (3 réplicas biológicas). La cuantificación de los transcritos se realizó de acuerdo a lo descrito en métodos y cada gráfico muestra la expresión relativa al gen constitutivo ubiquitina. Letras distintas indican diferencias significativas entre las condiciones analizadas mediante ANDEVA y test de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.2.2 Caracterización de la expresión del gen *MybA1* en respuesta a tratamientos con glucosa y/o fructosa en frutos cortados del racimo.

Dado que los tratamientos con glucosa a racimos sin ser cortados de la planta incrementan el contenido total de antocianinas a lo largo del desarrollo, así como también los niveles de transcritos del gen *MybA1*, nos preguntamos si glucosa podría regular transcripcionalmente al gen *MybA1*. Para corroborar esto se trabajó con frutos de vid extraídos de la planta en dos distintos estadios del desarrollo. Lo primero que se hizo fue corroborar el estado de los frutos a través de la cuantificación de los niveles de transcritos del gen *MybA1* y *UFGT*, esperando encontrar resultados similares a lo descrito en la literatura. La figura 12 muestra los niveles de transcritos del gen *MybA1* (regulador transcripcional del tipo MYB) y su gen blanco *UFGT* (UDP-glucosa flavonoide 3-O-glucosiltransferasa) (Kobayashi S. y cols. 2002) a lo largo del desarrollo de frutos de *Vitis vinifera* cv. Red Globe obtenidos de los mismos racimos que posteriormente fueron utilizados para tratamientos con azúcar. Se observa que tanto los niveles de transcritos de *MybA1* como los de *UFGT* aparecen recién en el fruto en estado de pinta (EL-35), debido a que no hubieron transcritos detectables durante los primeros estadios del desarrollo (EL-31). De esta manera, la expresión de ambos genes incrementa de manera simultánea al aumento del color. En estadios posteriores a pinta (EL-36) los niveles de transcritos de ambos genes aumentan (Figura 12), así como también aumenta el contenido de antocianinas (Boss P. y cols. 1996). Estos resultados permiten corroborar que los frutos de *Vitis vinifera* utilizados a lo largo de esta tesis presentan un comportamiento similar a lo descrito en la literatura.

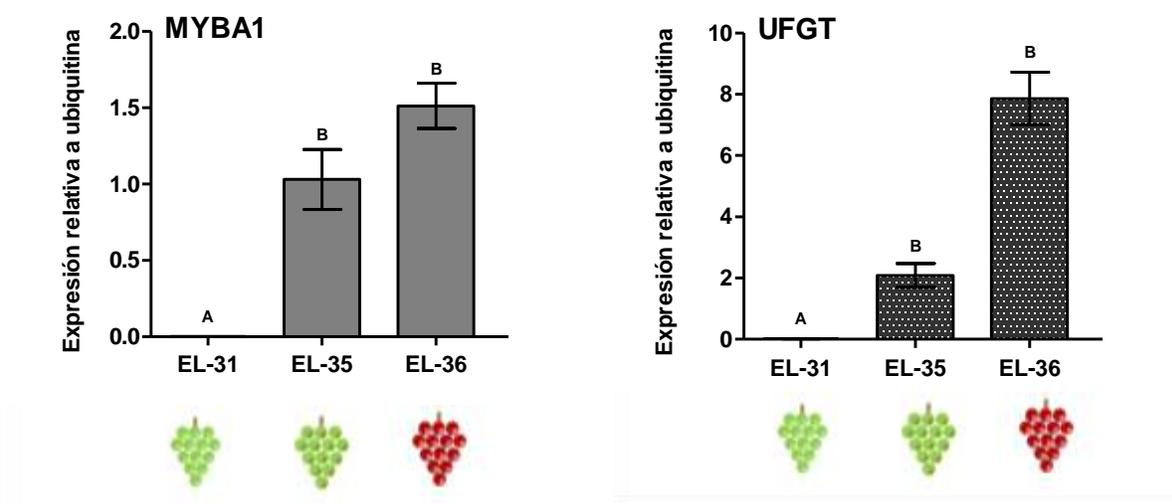


Figura 12: Niveles de transcritos de *MybA1* y *UFGT* a lo largo del desarrollo del fruto de *Vitis vinifera*.

La figura muestra los niveles de transcritos del gen *MybA1* (regulador transcripcional del tipo MYB) y *UFGT* (UDP-glucosa flavonoide 3-O-glucosiltransferasa) de frutos de *Vitis vinifera* a lo largo del desarrollo. El color de los racimos representa el estado de desarrollo en el momento en que fueron tomadas las muestras. Para los análisis se utilizaron frutos obtenidos de distintos racimos de 3 plantas diferentes (3 réplicas biológicas). La cuantificación de los transcritos se realizó de acuerdo a lo descrito en métodos. Los gráficos para *MybA1* y *UFGT* muestran la expresión relativa al gen constitutivo ubiquitina. Letras distintas indican diferencias significativas entre las condiciones analizadas mediante ANDEVA y test de Tukey ($p \leq 0,05$).

Una vez corroborados las diferencias en los niveles de transcritos de los genes *MybA1* y *UFGT* y con ello las diferencias en el desarrollo de los frutos, con el objetivo de determinar la existencia de una posible regulación del gen *MybA1* mediada por glucosa, se caracterizó la expresión de este gen en respuesta a distintas concentraciones de este azúcar. Para esto, frutos de *Vitis vinifera* en distintos estadios del desarrollo fueron cortados del racimo y seccionados en discos de 0,1 cm de grosor. Estos discos fueron sumergidos durante 2 horas en una solución que contenía distintas concentraciones de glucosa. Además, con el fin de descartar un posible rol de fructosa sobre la regulación de los niveles de transcritos del gen *MybA1*, debido a que anteriormente se mostró que los tratamientos con esta hexosa a racimos de vid no tuvieron efectos importantes, también se utilizó fructosa en distintas concentraciones para llevar a cabo los tratamientos. Además se utilizó manitol como control de estrés osmótico y agua como control del tratamiento. Con el fin de descartar los efectos que podrían haber tenido las condiciones ambientales en los experimentos realizados en campo, este experimento se llevó a cabo en condiciones de luz y temperatura controlada. La figura 13 muestra los resultados obtenidos para los discos provenientes de frutos cosechados en estado EL-31 y sumergidos durante 2 horas en las distintas soluciones. Se puede ver que los niveles de transcritos de *MybA1* son significativamente más altos en los discos de frutos sumergidos en glucosa en concentraciones de 100 y 150mM que en los discos de frutos sumergidos en la solución control (agua). Sin embargo, si se comparan con los niveles de transcritos de aquellos discos sumergidos en soluciones con manitol, se puede ver que en una solución con glucosa 100mM los transcritos son significativamente mayores que en manitol 100mM, mientras que en 150mM, a pesar de que los transcritos también son mayores para los discos sumergidos en glucosa, las diferencias no son significativas. En el caso de fructosa, ninguna

de las concentraciones con las cuales se trabajó tuvieron efecto sobre los niveles de transcritos de *MybA1*.

En el caso de *UFGT*, el cual se ha descrito que es regulado transcripcionalmente por el factor de transcripción MYBA1 (Kobayashi S. y cols. 2002), se puede ver en la figura 13 que ninguna de las soluciones en las cuales fueron sumergidos los discos de frutos cosechados en estado verde (E-31), tuvieron efecto sobre los niveles de transcritos de este gen.

Adicionalmente, al llevar a cabo estos experimentos con discos de frutos cosechados en estado de pinta (EL-35), momento del desarrollo en el cual los niveles de azúcar son más altos que en estado verde (EL-31), los resultados obtenidos fueron los mismos tanto para *MybA1* como para *UFGT* (Figura 14), en donde en ninguno de los casos, con ningún tratamiento se observaron variación en los niveles de transcritos comparados con la condición control.

Estos resultados muestran que glucosa en concentraciones bajas regula la acumulación de transcritos de *MybA1* y que esta regulación ocurre sólo en estadíos tempranos del desarrollo, debido a que en frutos cosechados en estado verde los transcritos aumentan en presencia de glucosa 100mM, sin embargo, en concentraciones más altas manitol también tuvo efectos.

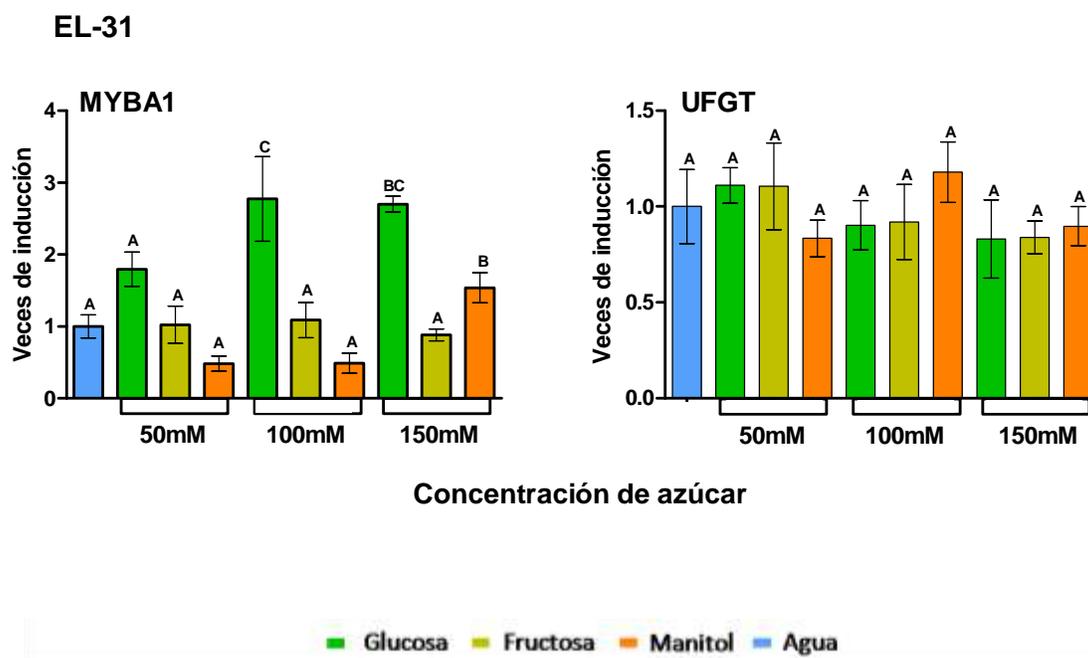


Figura 13: Niveles de transcritos de *MybA1* y *UFGT* en discos de frutos de *Vitis vinifera* cosechados en estado verde (EL-31) y sumergidos en soluciones con distintas concentraciones de azúcar.

La figura muestra los niveles de transcritos del gen *MybA1* (regulador transcripcional del tipo MYB) y *UFGT* (UDP-glucosa flavonoide 3-O-glucosiltransferasa) en discos de frutos de *Vitis vinifera* cosechados en estado verde (EL-31) y sumergidos en soluciones con distintas concentraciones de glucosa, fructosa, manitol y agua. Los colores especificados en la figura representan cada tratamiento, mientras que la concentración se especifica en el mismo gráfico. Para los análisis se utilizaron frutos obtenidos de distintos racimos de 3 plantas diferentes (3 réplicas biológicas), los cuales una vez cortados fueron seccionados en discos de 0,1cm de grosor. La cuantificación de los transcritos se realizó de acuerdo a lo descrito en métodos. Los gráficos para *MybA1* y *UFGT* muestran las veces de inducción de cada gen relativo al gen constitutivo ubiquitina y a la condición control con agua. Letras distintas indican diferencias significativas entre las condiciones analizadas mediante ANDEVA y test de Tukey ($p \leq 0,05$).

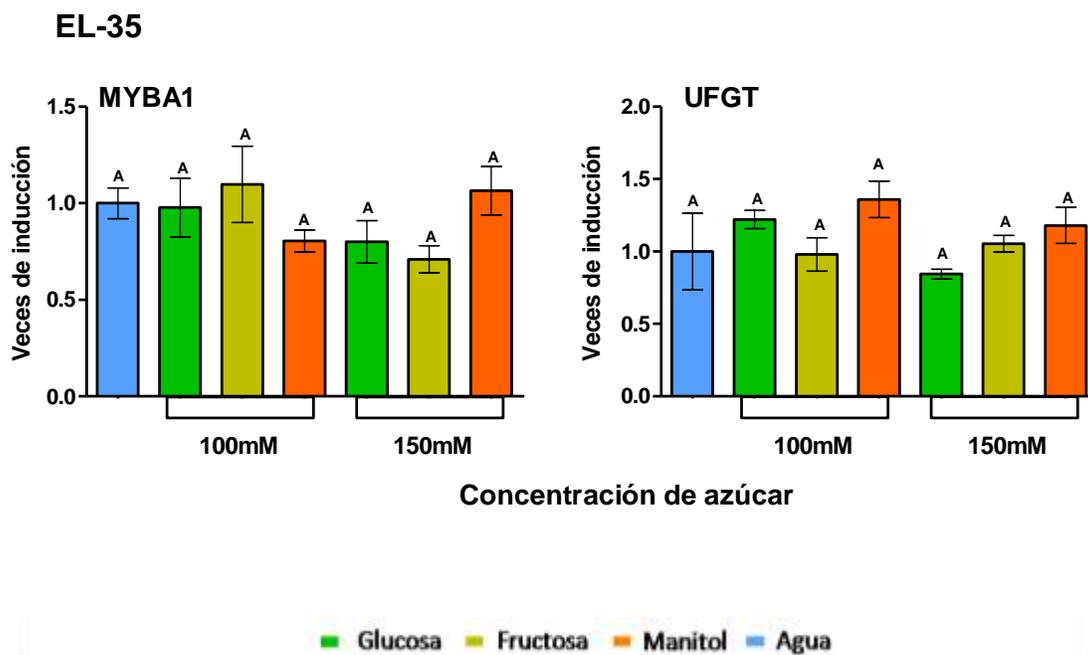


Figura 14: Niveles de transcritos de *MybA1* y *UFGT* en discos de frutos de *Vitis vinifera* cosechados en pinta (EL-35) y sumergidos en soluciones con distintas concentraciones de azúcar.

La figura muestra los niveles de transcritos del gen *MybA1* (regulador transcripcional del tipo MYB) y *UFGT* (UDP-glucosa flavonoide 3-O-glucosiltransferasa) en discos de frutos de *Vitis vinifera* cosechados durante pinta (EL-35) y sumergidos en soluciones con distintas concentraciones de glucosa, fructosa, manitol y agua. Los colores, especificados en la figura, representan cada tratamiento, mientras que la concentración se especifica en el mismo gráfico. Para los análisis se utilizaron frutos obtenidos de distintos racimos de 3 plantas diferentes (3 réplicas biológicas), los cuales una vez cortados fueron seccionados en discos de 0,1cm de grosor. La cuantificación de los transcritos se realizó de acuerdo a lo descrito en métodos. Los gráficos para *MybA1* y *UFGT* muestran las veces de inducción de cada gen relativo al gen constitutivo ubiquitina y a la condición control con agua. Letras distintas indican diferencias significativas entre las condiciones analizadas mediante ANDEVA y test de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.2.3 Caracterización de la expresión del gen *MybA1* en respuesta a tratamientos con glucosa y/o fructosa en cultivos celulares de fruto de *Vitis vinifera*.

Los cultivos celulares provenientes de fruto de vid representan uno de los mejores modelos de estudio de este fruto, debido a que han permitido comprender y aumentar el conocimiento tanto de procesos fisiológicos como genéticos a nivel del desarrollo del fruto, así como también estudiar la respuesta a distintos tratamientos (Larrode y cols. 1998; Vitrac y cols. 2000; Gollop R. y cols. 2001; Belhadj A. y cols. 2008; Ferri M. y cols. 2011). Con el objetivo de analizar el efecto cinético de glucosa sobre la inducción de los niveles de transcritos del gen *MybA1* y determinar además si la inducción gatillada por este monosacárido culmina finalmente con la acumulación de los transcritos de *UFGT*, suspensiones celulares provenientes de fruto de vid fueron incubados en un medio de cultivo con 100mM de glucosa o manitol. La concentración utilizada fue definida a partir de los resultados obtenidos en los experimentos anteriormente mencionados en esta tesis. La figura 15 muestra los niveles de transcritos de los genes *MybA1* y *UFGT* en suspensiones celulares provenientes de frutos de vid incubados durante 8 horas en un medio de cultivo con 100mM de glucosa o manitol. Se puede ver que en el caso de los cultivos incubados con glucosa, los transcritos de *MybA1* son recién detectados a las 2 horas de iniciado el tratamiento, sin embargo, los niveles de transcritos fueron muy bajos hasta las 4 horas post-tratamiento, momento en el cual aumentaron en un 300% en comparación con el tiempo 0. En horas posteriores los niveles de transcritos comienzan a disminuir llegando casi a 0 a las 8 horas post-tratamiento. Al mismo tiempo, si se analizan los transcritos en cultivos tratados con manitol no se observa aumento de los mismos durante ninguno de los tiempos.

En el caso de *UFGT* los resultados son bastante similares, debido a que en los cultivos incubados con manitol los transcritos de este gen no aumentaron durante ninguno de los tiempos analizados, sin embargo, en el caso de los cultivos incubados en un medio con glucosa, los transcritos fueron detectados recién a las 4 horas post-tratamiento y mostraron un aumento de un 200% a las 6 horas post iniciado el tratamiento, es decir, 2 horas después que el mayor aumento de los transcritos de *MybA1*.

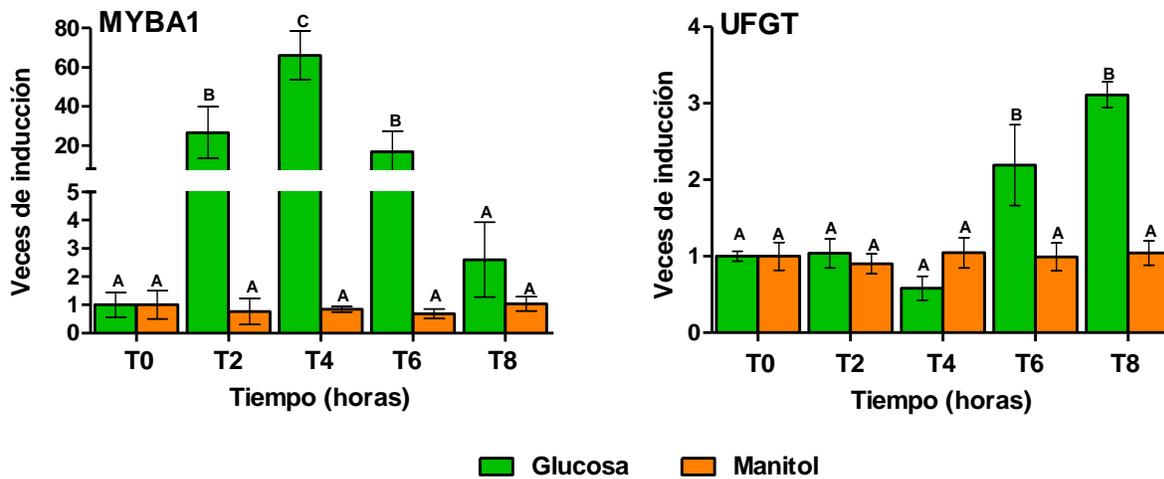


Figura 15: Niveles de transcritos de *MybA1* y *UFGT* para cultivos celulares provenientes de fruto de vid incubados con glucosa o manitol.

La figura muestra los niveles de transcritos del gen *MybA1* (regulador transcripcional del tipo MYB) y *UFGT* (UDP-glucosa flavonoide 3-O-glucosiltransferasa) en cultivos celulares provenientes de fruto de vid incubados durante 8 horas en un medio con glucosa y manitol 100mM. Los colores especificados en la figura representan cada tratamiento. Para los análisis se utilizaron 3 réplicas biológicas representadas por 3 distintos matraces. La cuantificación de los transcritos se realizó de acuerdo a lo descrito en métodos. Los gráficos para *MybA1* y *UFGT* muestran las veces de inducción de cada gen relativo al gen constitutivo ubiquitina y al tiempo 0. Letras distintas indican diferencias significativas entre las condiciones analizadas mediante ANDEVA y test de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.2.4 Análisis de actividad GUS en hojas de vides transformadas con el promotor del gen *MybA1*.

En plantas, una de las formas más comunes de estudiar la respuesta de un promotor de un gen específico a distintos factores, es a través de la utilización de genes reporteros. En vides esta es una técnica ampliamente utilizada que ha permitido comprender en muchas ocasiones el funcionamiento de procesos fisiológicos tan relevantes como la regulación de genes asociados a la síntesis de antocianinas (Gollop y cols 2001; Gollop y cols 2002).

Con el objetivo de analizar la actividad del promotor del gen *MybA1* en respuesta a glucosa y fructosa, hojas de plantas *in vitro* de vides fueron transformadas de manera transiente con un vector que llevaba 1Kb del promotor de este gen fusionado al gen reportero *uidA*, el cual codifica para la proteína GUS. Las hojas fueron transformadas mediante agroinfiltración e incubadas durante 48 horas en distintas soluciones de glucosa, fructosa y manitol 100Mm. Luego de 48 horas de incubación se realizó el análisis cualitativo de la actividad GUS.

En la figura 16 se observa una fotografía completa de las hojas (A), parte de la hoja mirada a través de una lupa (B) y miradas al microscopio óptico con un aumento de 10X (C). Las hojas transformadas con el vector que llevaba un promotor fuerte fusionado al gen *uidA* mostraron actividad GUS en gran parte de los tejidos, sin embargo, las hojas transformadas con el vector vacío no mostraron actividad GUS. Por su parte, las hojas transformadas con el vector que llevaba 1Kb del promotor del gen *MybA1* y luego incubadas en la solución con glucosa mostraron actividad GUS en pequeñas porciones de la hoja, lo cual puede corroborarse al observar las hojas con lupa y microscopio. Sin embargo, aquellas hojas transformadas con el mismo vector pero incubadas en una solución con fructosa, no mostraron actividad GUS así como tampoco aquellas incubadas en una solución con manitol.

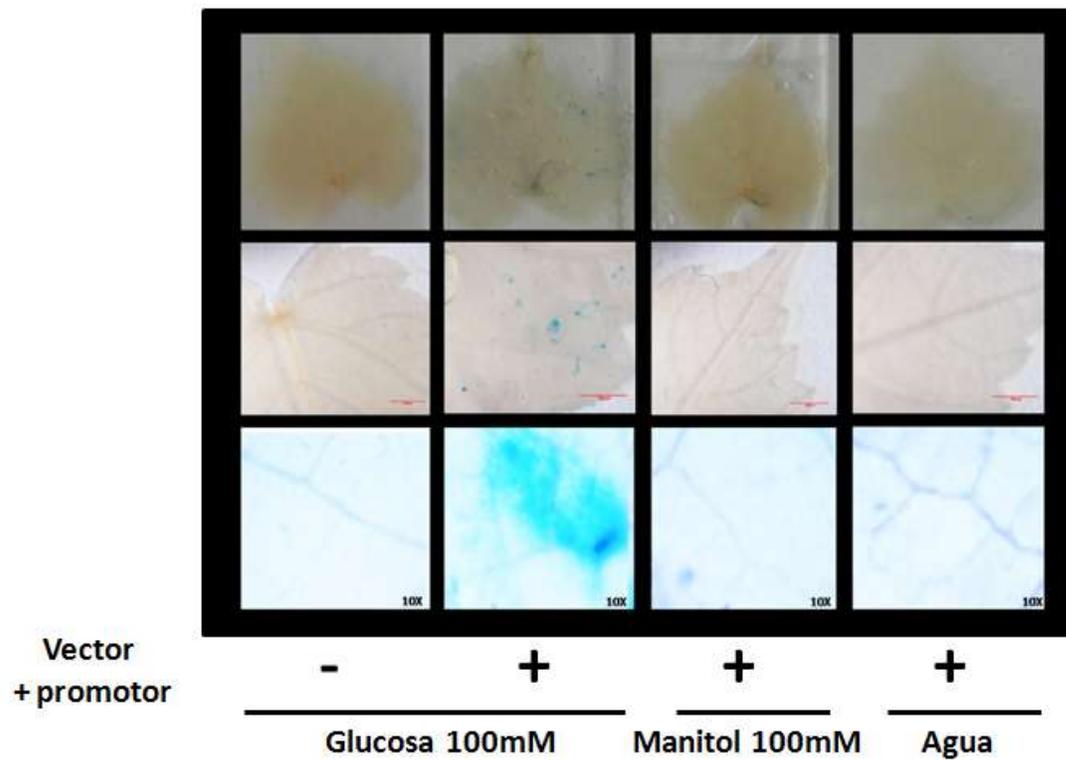


Figura 16: Actividad GUS en hojas de vides

La figura muestra las hojas de vides transformadas con el vector PKGWFS7 vacío o con 1Kb del promotor del gen *MybA1* fusionado a *uidA*. Estas hojas luego fueron incubadas en distintas soluciones (glucosa, manitol o agua). Se muestran una fotografía de la hoja completa (A), parte de la hoja mirada a través de una lupa (B) y parte de la hoja mirada a través de un microscopio de luz con un aumento 10X (C). La transformación de las hojas y la tinción GUS se realizaron según lo descrito en métodos.

4.3 Participación de glucosa en la regulación del transporte polar de auxina durante la maduración del fruto de *Vitis vinifera*.

4.3.1 Transporte polar de auxina durante el desarrollo del fruto de vid

En el fruto de vid la auxina IAA (Indol-3-ácido acético) cumple una importante función durante los primeros estadios del desarrollo, debido a que durante esta etapa la tasa de expansión y división celular es muy alta. Sin embargo en estadios posteriores, desde que el fruto entra pinta y durante toda la maduración, los niveles de esta hormona disminuyen considerablemente, por lo que se ha propuesto que su presencia durante estadios tardíos del desarrollo retardan el proceso de maduración del fruto (Davies C. y cols. 1997; Bottcher C. y cols. 2010). En plantas, el transporte de auxina es mediado por proteínas específicas de membrana que permiten el movimiento desde una célula a otra de manera polarizada, por lo cual se denomina transporte polar de auxina (Ljung K. y cols. 2013). En el caso del fruto de vid, el transporte ocurre desde el ápice hasta la base del fruto, lo que implica que la gradiente de esta hormona tenga esta misma dirección. En este trabajo, con el objetivo de comprender el mecanismo que regula la disminución de auxina durante la maduración del fruto de vid y permitir que este proceso ocurra de manera normal, en primer lugar se cuantificó el transporte polar de auxina a lo largo del desarrollo del fruto. Los resultados se pueden ver en la figura 17, la cual muestra el contenido total de sólidos solubles y el porcentaje de transporte polar de auxina durante el desarrollo del fruto de vid. Se puede ver que el porcentaje de transporte polar de auxina es alto en estadios tempranos del desarrollo (EL-31) en comparación con estadios tardíos (EL-35, EL-36), debido a que se observa que este disminuye significativamente en el momento en que el fruto está en estado de pinta y

se mantiene constante hacia la maduración. Adicionalmente en la misma figura se observa que el transporte polar de auxina disminuye al mismo tiempo que aumenta la concentración de azúcar en el fruto, debido a que como ya se ha discutido anteriormente en este trabajo, el contenido total de sólidos solubles es muy bajo en estadios iniciales del desarrollo y alto en estadios tardíos.

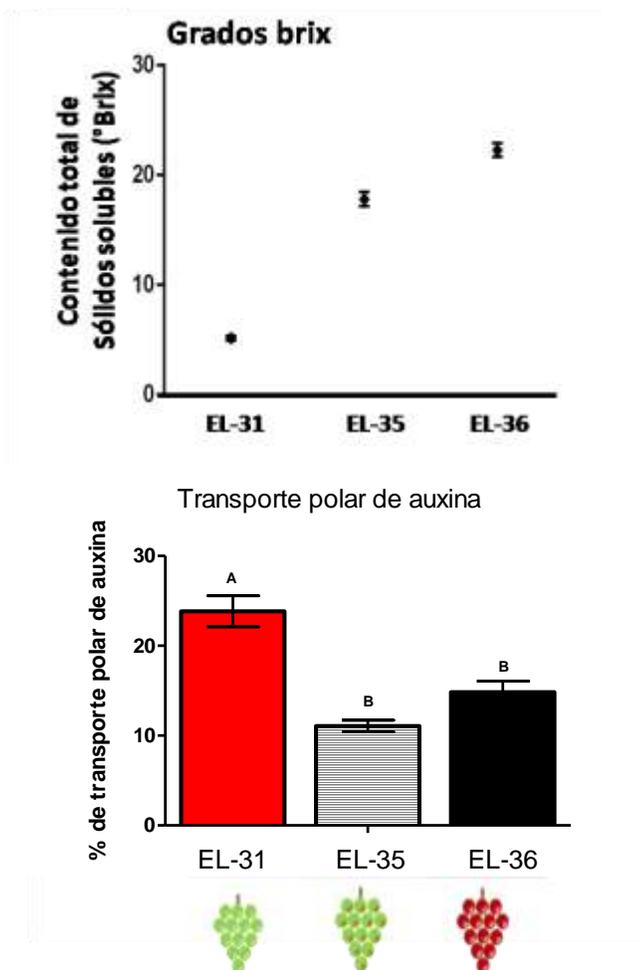


Figura 17: Contenido total de sólidos solubles y transporte polar de auxina durante el desarrollo del fruto de *Vitis vinifera*.

La figura muestra el contenido total de sólidos solubles y el porcentaje de transporte polar de auxina de frutos de *Vitis vinifera* a lo largo del desarrollo. El color de los racimos que se observan al final de la figura representa el estado de desarrollo en el cual fueron tomadas las muestras. Para los análisis se utilizaron frutos obtenidos de distintos racimos de 3 plantas diferentes (3 réplicas biológicas). La cuantificación del transporte polar de auxinas se realizó de acuerdo a lo descrito en métodos. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones analizadas mediante ANDEVA y test de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.3.2 Regulación del transporte polar de auxina mediada por glucosa durante el desarrollo del fruto de *Vitis vinifera*.

Dado que resultados anteriores mostraron que durante el desarrollo del fruto de vid el transporte polar de auxina disminuye al mismo tiempo que aumenta el contenido total de sólidos solubles. Con el objetivo de demostrar una posible regulación del transporte polar de auxina, mediada por glucosa, frutos de vid en estado de pre-pinta (EL-31) fueron tratados durante cuatro días con las siguientes soluciones: glucosa 100mM, NPA 40 μ M o glucosa 100mM + NPA 40 μ M. Se utilizó NPA debido a que se ha visto que funciona como un inhibidor específico del transporte polar de auxinas en *Solanum lycopersicum* (Koenig D. y cols. 2009; Serrani J.C y cols. 2010), por lo que su uso permitirá realizar comparaciones con los efectos producidos por los tratamientos realizados con glucosa. Los resultados muestran que los frutos tratados con glucosa presentan similar porcentaje de transporte polar de auxina que los frutos tratados con NPA, valores casi 100% menores que los encontrados en los frutos tratados sólo con agua (figura 18). Sin embargo, a pesar de que tanto el tratamiento con glucosa y con NPA disminuye el transporte polar de auxina, al tratar frutos con ambas soluciones al mismo tiempo, los resultados no mostraron un efecto sinérgico generado por los tratamientos. Por otro lado, debido a que los tratamientos con glucosa inhiben el transporte polar de auxina de igual manera como lo hace NPA, se analizó el estado fenotípico de los frutos a distintos tiempos después de haber sido realizados los tratamientos. La figura 18 muestra fotografías de los frutos luego de 4 días post-tratamiento (parte superior) y luego de 14 días post-tratamiento (parte inferior). En el caso de los tratamientos con glucosa, los resultados observados fueron similares a los obtenidos en los objetivos 1 y 2, debido que a los 4DPT en los racimos tratados con

glucosa aparecieron algunos frutos coloreados, mientras que a los 14 DPT los racimos ya se encontraban en estado de pinta. Por otro lado, los frutos tratados con NPA sufrieron los mismos efectos que aquellos tratados con glucosa. Sin embargo, al analizar las fotografías se puede ver que tanto a los 4 como a los 14 DPT los efectos causados por el tratamientos con glucosa + NPA fueron similares a los efectos causados por glucosa y NPA por separado.

Adicionalmente, la figura 19 muestra que si frutos en estado de pre-pinta se tratan con una solución de glucosa 100mM + IAA 1 μ M, estos presentan un porcentaje de transporte polar de auxina similar a los frutos tratados con agua, es decir auxina restaura los niveles de transporte polar de auxina disminuidos por glucosa, lo que a su vez se refleja en que los frutos a los 4 DPT no presentan frutos coloreados como sí los frutos tratados con glucosa (figura 19).

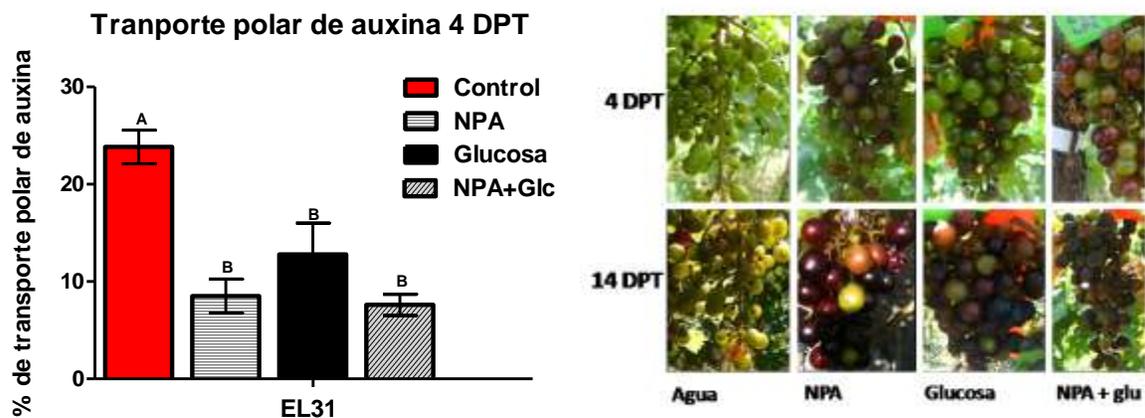


Figura 18: Transporte polar de auxina y fotografías de los racimos tratados con agua glucosa, NPA o glucosa + NPA.

La figura muestra el porcentaje de transporte polar de auxina de racimos en estado de pre-pinta tratados con glucosa, NPA, glucosa + NPA o agua a los 4 días post-tratamiento y fotografías de los racimos a los 4 y a los 14 días post-tratamiento. Para cada tratamiento se utilizaron 3 racimos (3 réplicas biológicas) y para los análisis se utilizaron frutos de cada racimo escogidos al azar. La cuantificación del transporte polar de auxinas se realizó de acuerdo a lo descrito en métodos. Letras indican diferencias significativas entre las condiciones analizadas mediante ANDEVA y test de Tukey ($p \leq 0,05$).

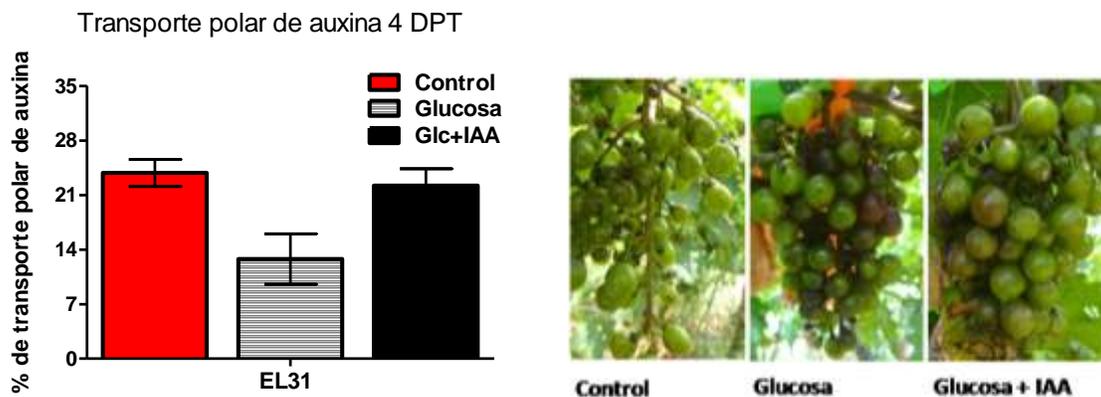


Figura 19: Transporte polar de auxina y fotografías de los racimos tratados con agua, glucosa o glucosa + IAA.

La figura muestra el porcentaje de transporte polar de auxina y fotografías de los racimos tratados con glucosa, NPA o glucosa + IAA a los 4 días post tratamientos (4DPT). Para cada tratamiento se utilizaron 3 racimos (3 réplicas biológicas) y para los análisis se utilizaron frutos de cada racimo escogidos al azar. La cuantificación del transporte polar de auxinas se realizó de acuerdo a lo descrito en métodos. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones analizadas mediante ANDEVA y test de Tukey ($p \leq 0,05$).

5. DISCUSIÓN

5.1 Evaluación de la participación de glucosa y/o fructosa en el proceso de maduración del fruto de *Vitis vinifera*.

La mayoría de los estudios que se han realizado con el fin de comprender el proceso de maduración de los frutos, se han desarrollado en frutos climatéricos, para los cuales la señal que induce la maduración es bastante conocida. Este tipo de frutos se caracteriza por tener un incremento en la tasa de respiración y en la síntesis de etileno justo en el momento en que comienzan a madurar, lo cual se ha demostrado que es de total importancia para que este proceso comience (Graham B. y cols. 1993; Giovannoni J. 2001). Por otro lado, debido a que muy pocos estudios han sido derivados a partir de análisis de frutos no climatéricos, el conocimiento que existe acerca del proceso de maduración en estos frutos es bastante reducido, por lo que el mecanismo que induce el inicio de la maduración y posteriormente regula este proceso permanece siendo una incógnita (Graham B. y cols. 1993).

El fruto de vid es un fruto no climatérico (Coombe B.G. y Hale R. 1973) cuyo desarrollo puede dividirse en tres etapas, durante las cuales se acumulan una gran variedad de metabolitos con distintas funciones y que otorgan a las bayas distintas características (Kennedy J.A. 2002). Dentro de estos metabolitos, glucosa y fructosa, principales azúcares que forman parte del fruto, son los primeros que comienzan a acumularse al iniciarse el periodo de pinta y posteriormente continúan aumentando a lo largo de toda la maduración. A pesar de la importante función estructural y energética que estos monosacáridos tienen, el rol fisiológico y/o bioquímico que cumplen durante el proceso de maduración no ha sido del todo determinado. Se ha demostrado que en plantas, el azúcar además tener una función

energética y estructural, también tiene la capacidad de actuar como molécula señal y regular directa o indirectamente un amplio rango de procesos, tales como fotosíntesis, captación de nitrógeno, balance hormonal, etc. (Smeekens y cols. 2010). De esta manera durante la maduración del fruto de vid, glucosa y fructosa podrían actuar como moléculas señal y regular etapas iniciales o intermedios de este proceso. Por lo tanto, en este trabajo investigamos la importancia de la acumulación de estos monosacáridos a lo largo de la maduración del fruto de vid y su efecto sobre la regulación de dos procesos que ocurren al inicio de esta etapa. La síntesis de antocianinas y la disminución del transporte polar de auxina.

Los resultados obtenidos permiten sugerir que durante el desarrollo del fruto de vid glucosa regula etapas iniciales del proceso de maduración, debido a que frutos asperjados con una solución de glucosa 100mM parecen madurar antes que los frutos control. Tal como se observa en la figura 6 los frutos tratados con este monosacárido entran en periodo de pinta 20 días antes que los frutos tratados con manitol y agua. Manitol es un polialcohol que no tiene la capacidad de ingresar al interior de las células del fruto, por lo que es un importante inductor de estrés osmótico. De esta manera, los resultados obtenidos permiten sugerir que los efectos causados por los tratamientos con glucosa, probablemente no se deben al estrés osmótico que podría generar el exceso de soluto, sino que más bien, a una posible respuesta a la señal que glucosa podría estar generando.

Adicionalmente, la figura 6 muestra que los frutos tratados con manosa, un análogo de glucosa que ha sido ampliamente considerado como no metabolizable a través de la glicólisis (Vitrac X. y cols. 2000), también parecen madurar de manera más temprana que los frutos control. Sin embargo, a pesar de que tratamientos a cultivos celulares de fruto de vid con 2-deoxyglucosa, otro análogo de glucosa no metabolizable a través de la glicólisis,

genera toxicidad en las células (Vitrac X. y cols. 2000), lo cual puede deberse a distintos efectos de la forforilación de este metabolito (Klein D. y cols. 1998); a lo largo del desarrollo de este trabajo, manosa no pareció generar toxicidad en los frutos, lo que podría deberse a que esta hexosa luego de ser fosforilada por una hexokinasa para producir manosa-6-fosfato, sea isomerizada a fructosa-6-fosfato, tal como ha sido reportado para *Galdieria sulphuraria* (Heilmann I. y cols. 1997) y para semillas de plantas leguminosas (MacCleary B.V. y cols. 1976). Sin embargo, la capacidad de metabolizar esta hexosa no ha sido demostrada en la vid.

Por otro lado y de manera bastante sorprendente, se puede ver a partir de la figura 6 que los tratamientos con fructosa no tuvieron efectos cualitativos sobre la maduración del fruto. Sin embargo, esta fotografía permite analizar solamente los cambios en la coloración de los frutos, por lo que otros procesos relacionados con maduración fueron de igual manera analizados con el fin de descifrar el posible rol de esta hexosa durante este periodo.

Estos resultados sugieren que durante el desarrollo del fruto de vid, posiblemente glucosa participa en el proceso de maduración, sin embargo esto debió ser demostrado a partir de posteriores análisis.

De esta manera, los resultados observados a partir de los tratamientos permitieron sugerir que glucosa y a su vez manosa, probablemente al ser agregadas de manera exógena al fruto entren a las células de los distintos tejidos a través de transportadores específicos ubicados a nivel de la membrana plasmática (Fillion L. y cols. 1999; Vignault C. y cols. 2005; Conde C. y Cols. 2006; Hayes M. y cols. 2007; Afoufa-Bastien D. y cols. 2010) Por su parte, la cuantificación del contenido total de sólidos solubles (Figura 7), lo cual representa el contenido total de carbohidratos que componen el fruto (Coombe B.G. y McCarthy M.G. 2000) mostró que los racimos tratados con glucosa y manosa presentaban mayor contenido

total de sólidos solubles que los racimos control (manitol y agua) e incluso que los racimos tratados con fructosa. En este último caso, esto puede deberse a que probablemente los transportadores de hexosas activos durante el estadio en el cual fueron realizados los tratamientos tienen mayor afinidad por glucosa y manosa (al ser éste un análogo de glucosa) que por fructosa. Sin embargo, esto sólo ha sido demostrado para *VvHT1*, el cual participa en estadios tempranos del desarrollo (Vignault C. y cols. 2005) y para *VvHT4*, cuya expresión del gen que codifica para éste no se encuentra en hojas pero no en frutos. (Hayes M. y cols. 2007; Afoufa-Bastien D. y cols. 2010).

Al cuantificar los niveles de transcritos de *VvHT2* y *VvHT3* (Figura 7), los cuales codifican para transportadores de hexosas de membrana plasmática (Hayes M. y cols. 2007; Afoufa-Bastien D. y cols. 2010), se observó que estos en T20 se encuentran más altos en los frutos tratados con glucosa y manosa que en los frutos control, lo que podría culminar con una mayor actividad de los transportadores. Por su parte, en este mismo tiempo, los frutos tratados con fructosa presentaron altos niveles de transcritos de *VvHT3* pero no de *VvHT2*, lo que podría ser la explicación del menor contenido total de sólidos solubles que se encuentran en estos frutos en comparación con los frutos tratados con glucosa y manosa. Sin embargo, en los tiempos T20 y T30, en los frutos tratados con fructosa los niveles de transcritos de *VvHT2* y *VvHT3* se comportan igual que en los frutos control, lo cual puede deberse al comienzo del transporte de azúcares endógenas de la planta, lo que ocurre justo en pinta (Coombe B.G, McCarthy M.G. 2000). En el caso de los transcritos de *VvHT6*, los cuales codifican para un transportador de hexosas ubicados a nivel de tonoplasto (Conde C. y cols. 2006; Afoufa-Bastien D. y cols. 2010), estos sólo mostraron diferencias entre los distintos tratamientos en T10, por lo tanto, los monosacáridos que entran a la célula podrían no ser constantemente almacenados en la vacuola, si no que ser utilizados de manera

inmediata como fuente de energía, moléculas estructurales o moléculas señal, provocando de esta última manera un aumento de la coloración de los frutos (Figura 6) al igual como se ha demostrado que lo hacen en cultivos celulares (Larronde y cols. 1998; Vitrac X. y cols. 2000).

Luego de ser transportada hacia el interior de las células, se ha demostrado en plantas que el azúcar es reconocida por un receptor específico que permite gatillar una señal de transducción en la que participan distintos efectores y que puede culminar con la regulación y coordinación del crecimiento y desarrollo de la planta (Jang J.C. y cols 1997; Moore B y cols. 2003; Claeysen E. y cols. 2007; Granot y cols. 2007; Rolland F y cols. 2006). De esta manera, en el fruto de vid, una vez que las azúcares utilizadas en los distintos tratamientos entran a la célula, podrían actuar como moléculas señal y gatillar distintos procesos asociados a la maduración, de los cuales, el aumento del tamaño de los frutos podría ser uno de ellos. Tal como se observa en la figura 8, los frutos tratados con manosa presentaron mayor volumen a lo largo del tiempo que los frutos tratados con agua, manitol, fructosa e incluso glucosa. Si bien es cierto, los resultados anteriores mostraron que probablemente glucosa y manosa entran en similares cantidades a los frutos, debido a que estos poseen similar contenido de sólidos solubles y un comportamiento parecido de los transcritos que codifican para transportadores de hexosas, glucosa al entrar a la célula puede ser utilizada no sólo como molécula señal, sino que también como fuente de energía, por el contrario manosa, podría estar actuando únicamente como molécula señal y por ello tener mayores efectos sobre el volumen de los frutos que glucosa. Sin embargo, al analizar los niveles de transcritos que codifican para la enzima expansina 1, la cual regula la interacción de la red de celulosa-hemicelulosa y permite la relajación de la pared celular, otorgando mayor capacidad de expansión a las células y con ello el aumento del tamaño de los frutos

(Brummell D. y cols. 2001, Cantu D. y cols. 2008), se puede ver que estos tienen similar comportamiento en ambos tratamientos, siendo significativamente más altos que en los frutos control y los frutos tratados con fructosa a los 20 DPT. En el caso de los frutos tratados con fructosa, los niveles de transcritos aumentaron a los 30 DPT, poco tiempo antes de que aumente el volumen de los frutos. Por otro lado, los niveles de transcritos del gen que codifica para celulosa sintasa varían entre los distintos tratamientos sólo en T20, momento en el cual aquellos frutos tratados con glucosa, manosa e incluso fructosa presentan niveles de transcritos más altos que los frutos control.

Todas estas variaciones que se observan tanto en el tamaño de los frutos como en los niveles de transcritos de los genes que codifican para enzimas relacionadas con expansión celular, generan diferencias a nivel de la integridad de la pared de las células que forman parte del fruto, debido a que tanto el aumento del tamaño como el ablandamiento de los tejidos de este, dependen en gran medida de las modificaciones que se realizan a nivel de la estructura de la pared celular, lo que provoca una mayor disgregación de esta y con ello una mayor elasticidad y movilidad de las células (Brady C.J. 1987; Brummell D. y cols. 2001; Chervin C. y cols. 2008). De esta manera en la figura 9 se observa el nivel de disgregación de la pared celular de los frutos expuestos a los distintos tratamientos a los 20 DPT. Se puede ver que los frutos tratados con glucosa, al igual que los tratados con manosa, presentan mayor disgregación de la pared celular que los frutos control y los tratados con fructosa, lo que puede deberse claramente a que en ese momento sólo los frutos tratados con glucosa y manosa aumentaron de tamaño.

En conjunto, todos estos resultados sugieren fuertemente que glucosa participa en la regulación del proceso de maduración del fruto de *Vitis vinifera*, debido a que tratamientos con este monosacárido afectaron de manera considerable características propias de la

maduración, tales como el aumento de la coloración y del tamaño de los frutos, así como también los niveles de transcritos de genes asociados a estos procesos.

5.2 Evaluación de la regulación de la biosíntesis de antocianinas mediada por glucosa y/o fructosa durante la maduración del fruto de *Vitis vinifera*

Las antocianinas son metabolitos secundarios que pertenecen al grupo de los flavonoides y otorgan coloración a los frutos de vid de variedades tinta (Shimazaki M. 2011). Se ha demostrado que en cultivos celulares de fruto de vid la acumulación de estos metabolitos es fuertemente inducida por sacarosa, glucosa y débilmente por fructosa (Larronde F. y cols. 2008; Vitrac X y cols. 2000). Sin embargo, no hay evidencias que demuestren que esto también ocurre a nivel del fruto.

Durante el desarrollo del fruto de vid, el incremento de la concentración de glucosa y fructosa comienza de manera paralela al inicio de la síntesis de antocianinas (Boss P. y cols. 1996), lo que sugiere que la síntesis de estos metabolitos podría ser regulada por estos monosacáridos.

Los resultados obtenidos a partir de la figura 6 concuerdan con esta hipótesis, debido a que desde los 20 DPT en adelante los frutos que fueron asperjados con glucosa y también con manosa, presentaron mayor coloración que los frutos control (manitol y agua) y que los tratados con fructosa, lo que probablemente es el reflejo de un aumento del contenido de las antocianinas. Sin embargo, esto no puede ser afirmado sin antes haber cuantificado estos metabolitos. Debido a que a partir de la figura 6 la mayor diferencia en la coloración entre los frutos expuestos a los distintos tratamientos se observa a los 20 DPT, se cuantificó el contenido total de antocianinas en ese tiempo de muestreo y también a los 40 DPT, con el

fin de demostrar diferencias en el grado de madurez de los frutos. Los resultados nuevamente sugieren que tanto glucosa como manosa entran hacia el interior de las células del fruto, debido a que se ha demostrado en cultivos celulares de fruto de vid, que la inducción de la acumulación de antocianinas requiere que una vez que la molécula de azúcar entra a la célula, sea reconocida y fosforilada por hexoquinasas (Vitrac X. y cols. 2000). Posteriormente esta fosforilación gatilla una vía de señalización específica que culmina con la acumulación de las antocianinas. Tratamientos a cultivos celulares de fruto de vid con 3-O-metilglucosa, un análogo de glucosa que es transportado hacia el interior de la célula pero no es fosforilado por hexoquinasas no induce la acumulación de estos metabolitos (Vitrac X. y cols. 2000). De esta manera, los resultados que se muestran en la figura 10, en donde se observa un aumento del contenido total de antocianinas en los frutos tratados con glucosa y con manosa tanto a los 20 como a los 40 DPT, en comparación con los frutos tratados con manitol, sugieren fuertemente que estas azúcares entran a la célula y de esa manera generan los distintos efectos mencionados a lo largo de este trabajo. Por otro lado, los niveles de transcritos del gen *MybA1*, el cual codifica para un factor de transcripción esencial para que ocurra la síntesis de antocianinas (Kobayashi S. y cols. 2002; Kobayashi S. y cols. 2004; Walker A. y cols. 2007) también se vieron afectados por los tratamientos con glucosa y manosa, debido a que en estos frutos fueron siempre más altos que en los frutos control y los tratados con fructosa, a lo largo de todas las fechas de muestreo (Figura 11). Sin embargo, los transcritos del gen *UFGT*, los cuales codifican para la enzima UDP-glucosa flavonoide 3-O-glucosiltransferasa, que media el último paso de la ruta de biosíntesis de antocianinas (Kobayashi S. y cols. 2002), mostraron mayores niveles con glucosa y manosa sólo a los 20 y 30 DPT. Posterior a eso no hubo diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

Los resultados obtenidos en este trabajo, en conjunto con la bibliografía, la cual muestra que durante el desarrollo del fruto de vid los transcritos que codifican para el factor de transcripción MYBA1 se detectan recién en pinta, periodo del desarrollo en el cual comienza el aumento de glucosa y fructosa (Kobayashi S. y cols. 2002, Vega A. y cols. 2011), permiten sugerir que este gen es regulado transcripcionalmente por glucosa y que probablemente esta hexosa induce la acumulación de antocianinas a través de la regulación de este gen. En este trabajo se demostró que en frutos en estado de pre-pinta, los niveles de transcritos del gen *MybA1* se inducen en presencia de glucosa 100 y 150mM, sin embargo, manitol 150mM también tuvo un pequeño efecto sobre el aumento de los transcritos, por lo que probablemente en concentraciones más altas que 100mM la inducción de la síntesis de antocianinas mediada por glucosa o manosa, no se debe sólo a la señalización específica gatillada por estas moléculas, sino que también al estrés osmótico que en concentraciones altas podrían estar produciendo. Debido a que se sabe que el estrés osmótico es un importante inductor de la acumulación de ABA (Galbiati M. y cols. 2011; Tattersall E.A. y cols. 2007) y a su vez este también tiene la capacidad de inducir la síntesis de antocianinas (Wheeler S. y cols 2009), lo más probable es que durante el desarrollo del fruto la síntesis de antocianinas inicialmente sea inducida por la ruta de señalización gatillada por glucosa, la cual ha sido estudiada en cultivos celulares de fruto de vid (Vitrac X. y cols. 2000) y posteriormente, cuando las concentraciones tanto de glucosa como de fructosa son más altas, se genere un estrés osmótico capaz de inducir la síntesis de ABA, el cual podría aumentar aun más el contenido de antocianinas. Esto concuerda bastante con lo que ha sido descrito en la literatura, debido a que tratamientos exógenos con ABA a frutos de vid en estado de pre-pinta han demostrado que esta hormona tiene la capacidad de inducir la acumulación de antocianinas (Wheeler S. y cols 2009), sin embargo, durante el desarrollo

del fruto, los niveles de ABA aumentan después de que el fruto ha entrado en proceso de pinta (Liang Sun y cols. 2010), justamente cuando los niveles de glucosa y fructosa son bastante más altos que en el momento en que comenzaron a sintetizarse estos metabolitos. Por otro lado, los niveles de transcritos del gen *MybA1* no se vieron inducidos cuando los tratamientos fueron realizados a frutos en estado de pinta (figura 14), probablemente debido a que el azúcar endógena en esa etapa del desarrollo es mayor que la utilizada en los tratamientos. Además, los transcritos del gen *UFGT* no se vieron afectados por los tratamientos realizados en discos de frutos pero sí en los tratamientos realizados en cultivos celulares de frutos de vid (figura 15) debido a que estos fueron expuestos durante más tiempo a glucosa y el aumento de los transcritos de *UFGT* se observó recién a las 6 horas de tratamiento, 2 horas después que el aumento de los transcritos de *MybA1* (figura 15).

Finalmente se demostró que existe una alta probabilidad de que el gen *MybA1* sea regulado transcripcionalmente por glucosa, debido a que las hojas transformadas con un vector que llevaba 1Kb del promotor del gen *MybA1* e incubadas durante 48 horas en una solución con glucosa 100mM, mostraron actividad GUS, a diferencia de las hojas incubadas con fructosa o transformadas con el vector vacío e incubadas en la misma solución con glucosa.

5.3 Participación de glucosa en la regulación del transporte polar de auxina durante la maduración del fruto de *Vitis vinifera*

Las hormonas son importantes reguladores de una gran diversidad de procesos en plantas, lo que permite que exista un amplio número de estos metabolitos y que cada uno cumpla funciones específicas a lo largo del desarrollo (Kalliopi A. y cols.2009). Durante el desarrollo del fruto de vid diversas hormonas participan en la regulación del proceso de

maduración, influyendo de manera positiva o negativa sobre este. Dentro de las hormonas que regulan negativamente este proceso, auxina, la cual participa activamente en los estadios iniciales del desarrollo del fruto, se sabe que retarda la maduración, debido a que tratamientos exógenos con esta hormona a frutos en estado de pre-pinta impiden que el fruto se desarrolle completamente (Davies C y cols. 1997; Bottcher C. y cols. 2010) debido a que parámetros como la coloración, tamaño y grado de acidez de los frutos se afectan negativamente.

Si se analizan los niveles de IAA en el fruto de vid, se observa que estos varían considerablemente a lo largo del desarrollo, debido a que son altos en estadios tempranos y muy bajos desde pinta en adelante (Zhan X.R. y cols. 2003). Adicionalmente, en este trabajo se determinó que el transporte polar de esta hormona, el cual permite generar gradientes de auxina capaces de regular diversas funciones a lo largo del desarrollo de las plantas (Ljung K. 2013), es alto en estadios tempranos del desarrollo y bajo desde pinta en adelante (Figura 17), es decir disminuye paralelamente al aumento de la concentración de glucosa y fructosa en el fruto (Figura 17). Por otro lado, en el año 2009 un estudio realizado en *Arabidopsis* demostró que distintos genes relacionados con el metabolismo de auxina son regulados por glucosa (Mishra B. y cols. 2009), lo que en conjunto con los resultados de este trabajo permite sugerir que probablemente durante el desarrollo del fruto de *Vitis vinifera*, glucosa, la cual se acumula desde que el fruto entra en estado de pinta, regula el transporte polar de auxina disminuyendo sus niveles tanto en pinta como a lo largo de toda la maduración.

Se ha demostrado que en estadios tempranos del desarrollo del fruto de vid, el transporte polar de auxina incrementa la sensibilidad a etileno y de esta manera regula el grado de abscisión de los frutos, debido a que etileno regula positivamente este mecanismo (Taylor

J.E. y cols. 2001). Esto puede deberse a que el transporte polar de auxina permite generar gradientes de esta hormona capaces de forjar señales y regular una diversidad de procesos (Friml J y cols. 2003; Blilou I y cols. 2005; Benková E y cols. 2009). De esta manera, durante el proceso de maduración, es decir, desde que el fruto entra en estado de pinta en adelante, la disminución del transporte polar de auxina analizado en este trabajo, podría ser regulado por glucosa y a través de esto, podría aumentar la sensibilidad al pequeño incremento de etileno que ocurre justo antes de que el fruto entre en estado de pinta (Sun L. y cols. 2010), regulando con ello etapas iniciales del proceso de maduración. Es así como la idea de que glucosa regula la disminución del transporte polar de auxina durante el desarrollo del fruto de vid, fue corroborada mediante tratamientos con glucosa y NPA, un inhibidor del transporte polar de auxina (Koenig D. y cols. 2009; Serrani J.C y cols. 2010), a frutos de *Vitis vinifera* en estado de pre-pinta. La figura 18 muestra que los frutos tratados con glucosa 100mM presentaron menor porcentaje de transporte polar de auxina que los frutos control, y al mismo tiempo los valores fueron bastante similares en los frutos tratados con NPA, lo que permite sugerir que probablemente glucosa inhibe el transporte polar de auxina durante la maduración del fruto de vid. Por otro lado, debido a que la disminución del transporte polar de auxina no fue mayor al tratar los frutos con glucosa y NPA al mismo tiempo, se podría pensar que ambos compuestos regulan la disminución del transporte a través de un único mecanismo, debido a que si así no fuera, se esperaría encontrar niveles de disminución más altos en los frutos doblemente tratados que en aquellos tratados con un único compuesto. Adicionalmente la figura 18 permite demostrar que la disminución del transporte polar de auxina acelera el proceso de maduración del fruto de vid, debido a que tanto los frutos tratados con glucosa como con NPA pintaron antes que los frutos control, lo que podría deberse al aumento de la sensibilidad a etileno

que ha sido reportado (Taylor J.E y cols. 2001). Por otro lado, al agregar IAA de manera exógena a los frutos tratados con glucosa, el transporte polar aumenta, lo que impide la coloración adelantada de los frutos.

Todos estos resultados mostraron que NPA aparentemente acelera el proceso de maduración del fruto de vid de igual manera como lo hace glucosa, lo que sugiere que probablemente la disminución del transporte polar de auxina es un factor importante para que el fruto madure, por lo que durante el desarrollo del fruto, glucosa, al aumentar justo cuando el fruto entra en pinta, podría regular el transporte polar de auxina, regulando así etapas iniciales del proceso de maduración.

6. CONCLUSIONES

- Tratamientos con glucosa y manosa a frutos de *Vitis vinifera* de plantas crecidas en campo provocaron cambios significativos en parámetros característicos de maduración, tales como un aumento del contenido de sólidos solubles, aumento del volumen, mayor grado de disgregación de la pared celular y mayor coloración debido al incremento del contenido de antocianinas. Todo esto en conjunto provocó un adelantamiento del proceso de maduración y con ello una disminución del tiempo de desarrollo.
- Frutos tratados con fructosa no mostraron diferencias significativas en comparación con los frutos control.
- Ensayos preliminares en los cuales se transformaron hojas de vides con la región promotora del gen *MybA1* fusionado al gen *uidA*, el cual codifica para la proteína GUS, permiten sugerir que glucosa regula transcripcionalmente la expresión del gen *MybA1*.
- El transporte polar de auxina disminuye a lo largo del desarrollo del fruto de vid, siendo alto en estadios tempranos del desarrollo y bajo durante pinta y maduración, justamente cuando los niveles de glucosa son altos en el fruto.
- Frutos de vid tratados con glucosa presentaron una disminución del transporte polar de auxina en comparación con frutos control. Así mismo NPA un inhibidor del transporte polar de auxina provocó un aumento de la coloración de los frutos al igual que glucosa.
- Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo permiten sugerir que durante el desarrollo del fruto de *Vitis vinifera* glucosa regula parámetros iniciales del proceso de maduración, tales como la síntesis de antocianinas y el transporte polar de auxinas, y que además a lo largo del proceso de maduración podría regular otros parámetros tales como el aumento del tamaño del fruto y disgregación de la pared celular.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Afoufa-Bastien D, Medici A, Jeauffre J, Coutos-Thévenot P, Lemoine R, Atanassova R, Laloi M. 2010. The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family: phylogenetic overview and microarray expression profiling. *BMC Plant Biology*. 10:245.
- Agasse A, Vignault C, Glissant D, Conde C, Gerós H, Delrot S. 2007. Molecular aspects of sugar transport and its regulation during grape berry ripening. *Macromolecules and Secondary Metabolites of Grapevine and Wine*. Intercept, Lavoisier, France.
- Atanassova R, Leterrier M, Gaillard C, Agasse A, Sagot E, Coutos-The´venot P, Delrot S. 2003. Sugar-Regulated Expression of a Putative Hexose Transport Gene in Grape. *Plant Physiology*. 131:326–334.
- Belhadj A, Telef N, Saigne C, Cluzet C, Barrieu F, Hamdi S, Mérillon JM. (2008). Effect of methyljasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46:493–499.
- Benková E, Ivanchenko M.G, Friml J, Shishkova S, Dubrovsky J.G. (2009). A morphogenetic trigger: is there an emerging concept in plant developmental biology? *Trends Plant Science*. 14, 189-193.
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433, 39-44.
- Bogs J, Jaffe F, Takos A, Walker A y Robinson S. (2007). The Grapevine Transcription Factor VvMYBPA1 Regulates Proanthocyanidin Synthesis during Fruit Development. *Plant Physiology*. 143:1347–1361.
- Boss P, Davies C, Robinson P. (1996). Analysis of the Expression of Anthocyanin Pathway Genes in Developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz Grape Berries and the Implications for Pathway Regulation. *Plant Physiol* 111: 1059-1066.
- Bottcher C, Keyzers R, Boss P, 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*. 61:3615–3625.
- Boutte Y, Ikeda Y, Grebe M (2007) Mechanisms of auxin-dependent cell and tissue polarity. *Current Opinion in Plant Biology*. 10:616-623

- Brady C.J. (1987). Fruit ripening. *Annual Review of Plant Physiology*. 38:155-178.
- Brummell D, Harpster M. (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*. 47:311–340.
- Cantu D, Vicente A.R, Greve L.C, Dewey F.M, Bennett A.B, Labavitch J.M, Powell A.L.T. (2008). *PNAS*. 105: 859–864.
- Cheng Y.F, Dai XH, Zhao YD (2007) Auxin synthesized by the YUCCA flavin Monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 19:2430-2439.
- Chervin C, El-Kereamy A, Roustan J.P, Latche A, Lamon J, Bouzayen M. (2004). Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Science*. 167:1301–1305.
- Chervin C, Tira-umphon A, Terrier N, Zouine M, Severac D, Roustan J.P. (2008). Stimulation of the grape berry expansion by ethylene and effects on related gene transcripts, over the ripening phase. *Physiologia Plantarum*. 134:534-546.
- Cho Y.H, Yoo S.D, Sheen J. 2006. Regulatory Functions of Nuclear Hexokinase1 Complex in Glucose Signaling. *Cell* 127: 579–589.
- Christie J.M, Jenkins G.I. (1996). Distinct UV-B and UV-A/blue light signal transduction pathways induce chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* cells. *The Plant Cell*. 8:1555-1567.
- Claeysen E, Rivoal J. (2007). Isozymes of plant hexokinase: occurrence, properties and functions. *Phytochemistry* 68:709-731.
- Coombe B.G, Hale R. (1973). The Hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments. *Plant Physiology* 51: 629-634.
- Coombe B.G. (1987) Distribution of solutes within the developing grape berry in relation to its morphology. *Am J Enol Vitic* 38: 120-7
- Coombe B.G. (1995). Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 1:100-110.
- Coombe B.G, McCarthy M.G. (2000). Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Grape berry growth and ripening*. 6:131-135.
- Conde C, Agasse A, Glissant D, Tavares R, Gerós H, Delrot S. (2006). Pathways of Glucose Regulation of Monosaccharide Transport in Grape Cells. 141: 1563–1577.

- Coutos-Thévenot P, Goebel-Tourand I, Mauro MC, Jouanneau JP, Boulay M, Deloire A, Guern J (1992a) Somatic embryogenesis from grapevine cells. I. Improvement of embryo development by changes in culture conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 29:125–133
- Coutos-Thévenot P, Maës O, Jouenne T, Mauro MC, Boulay M, Deloire A, Guern J (1992b) Extracellular protein patterns of grapevine cell suspensions in embryogenic and non-embryogenic situations. *Plant Science*. 86: 137–145
- Costenaro-da-Silva D, Passaia G, Henriques J.A.P, Margis R, Pasquali G, Revers L. (2010). Identification and expression analysis of genes associated with the early berry development in the seedless grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivar Sultanine. *Plant Science*. 179:510–519.
- Cutanada M, Ageorges A, Gomez C, Vialet S, Terrier N, Romieu C y Torregrosa L. (2009). Ectopic expression of *VlmybA1* in grapevine activates a narrow set of genes involved in anthocyanin synthesis and transport. *Plant Mol Biol.*, 69:633–648.
- Czemplin S, Stracke R, Weisshaar B, Cordon N, Harris N, Walker A, Robinson Simon P, y Bogs J. (2009). The Grapevine R2R3-MYB Transcription Factor VvMYB1 Regulates Flavonol Synthesis in Developing Grape Berries. *Plant Physiology*. 151:1513–1530
- Davies C, Boss PK, Robinson SP. (1997). Treatment of grape berries, a nonclimacteric fruit with a synthetic auxin, rewards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. *Plant Physiology* 115:1155-1161.
- De Smet I, Jurgens G. (2007). Patterning the axis in plants-auxin in control. *Current Opinion in Genetics and Development*. 17:337-343.
- Delker C, Raschke A, Quint M. (2008). Auxin dynamics: the dazzling complexity of a small molecule's message. *Planta* 227:929-941
- Deluc L, Barrieu F, Marchive C, Lauvergeat V, Decendit A, Richard T, Carde J.P, Merillon J.M y Hamdi S. (2006). Characterization of a Grapevine R2R3-MYB Transcription Factor That Regulates the Phenylpropanoid Pathway. *Plant Physiology*. 140: 499–511
- Deluc L, Grimplet J, Wheatley M, Tillett R, Quilici D, Osborne C, Schooley D, Schlauch K, Cushman J, Cramer G. (2007). Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC Genomics* 8:429.
- Deluc L, Bogs J, Walker A, Ferrier T, Decendit A, Merillon J.M., Robinson S. y Barrieu F. (2008). The transcription factor VvMYB5b contributes to the regulation of

anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries. *Plant Physiology*. 147:2041–2053.

- Dijkwel P.P, Huijser C, Weisbeek P.J, Chua N.H, Smeekens S.C. 1997. Sucrose control of phytochrome A signaling in *Arabidopsis*. *Plant cell* 9: 583-595.
- Dijkwel P.P, Kock PAM, Bezemer R, Weisbeek P.J, Smeekens S.C. (1995). Sucrose Represses the Developmentally Controlled Transient Activation of the Plastocyanin Gene in *Arabidopsis thaliana* Seedlings. *Plant Physiology* 110: 455-463.
- Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C y Lepiniec L. (2010). MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Science*. 15:573–581.
- Else MA, Stankiewicz-Davies AP, Crisp CM, Atkinson CJ. (2004). The role of polar auxin transport through pedicels of *Prunus avium* L. in relation to fruit development and retention. *Journal of Experimental Botany* 55, 2099–109.
- Epstein M.A, Holt S.J. (1963). Electron Microscope Observation on the Surface Adenosine Triphosphatase-Like Enzyme of Hela Cells Infected with Herpes Virus. *Journal of Cell Biology*. 19:337-347.
- Ferri M, Righetti L, Tassoni A. 2011. Increasing sucrose concentrations promote phenylpropanoid biosynthesis in grapevine cell cultures. *Journal of Plant Physiology*. 168:189–195.
- Fillion L, Ageorges A, Picaud S, Coutos-The´venot P, Lemoine R, Romieu C, Delrot S. (1999). Cloning and Expression of a Hexose Transporter Gene Expressed during the Ripening of Grape Berry. 120: 1083–1093.
- Fontes N, Geros H, Delrot S. (2011). Grape berry vacuole: a complex and heterogeneous membrane system specialized in the accumulation of solutes. *American Journal of Enology and Viticulture* 62: 270–278.
- Friml J, Vieten A, Sauer, M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jürgens G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426:147-153.
- Frohnmeyer H, Bowler C, Schafer E. (1997). Evidence for some signal transduction elements involved in UV-light-dependent responses in parsley protoplast. *Journal of Experimental Botany*. 48:739-750.
- Galbiati M, Matus JT, Francia P, Rusconi F, Cañón P, Medina C, Conti L, Cominelli E, Tonelli C, Arce-Johnson P. (2011). The grapevine guard cell-related VvMYB60 transcription factor is involved in the regulation of stomatal activity and is

differentially expressed in response to ABA and osmotic stress. *BMC Plant Biology*. 11:142.

- Geekiyanage S, Takase T, Ogura Y, y Kiyosue Tomohiro. (2007). Anthocyanin production by over-expression of grape transcription factor gene *VlmybA2* in transgenic tobacco and Arabidopsis. *Plant Biotechnology Reports*. 1:11–18.
- Geros H, Chaves M, Delrot S. (2012). *The Biochemistry of the Grape Berry*. Bentham Science Publishers.
- Giovannoni J. (2001). Molecular Biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 725-749.
- Gil G. (2007). *Fundamentos para optimizar producción y calidad*. Viticultura. Ediciones Universidad Católica de Chile.
- Gollop R, Farhi S, Perl A. (2001). Regulation of the leucoanthocyanidin dioxygenase gene expression. *Plant Science*. 161: 579–588.
- Gollop R, Even S, Colova-Tsolova V, Perl A. (2002). Expression of the grape dihydroflavonol reductase gene and analysis of its promoter region. *Journal of Experimental Botany*. 53:1397-1409.
- Graham B. Seymour, Jane E. Taylor, Gregory A. Tucker. (1993). *Biochemistry of Fruit Ripening*. Chapman and Hall, London.
- Granot D. (2007). Role of tomato hexose kinases. *Functional Plant Biology* 34:564-570.
- Hayes M, Davies C, y Dry I. (2007). Isolation, functional characterization, and expression analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) hexose transporters: differential roles in sink and source tissues. *Journal Experimental Botany* 58:1985–1997.
- Heilmann I, Schnarrenberger C, Gross W. (1997). Mannose metabolizing enzymes from the red alga *Galdieria sulphuraria*. 45:903-906.
- He F, Mu L, Yan G.L, Liang N.N, Pan Q.H, Wang J, Reeves M.J, Duan C.Q. (2010). Biosynthesis of Anthocyanins and Their Regulation in Colored Grapes. *Molecules*. 15:9057-9091.
- Hurley B.A, Tran H, Marty N, Park J, Snedden W.A, Mullen R.T y Plaxton W.C. (2010). The Dual-targeted Purple Acid Phosphatase Isozyme AtPAP26 is Essential for Efficient Acclimation of Arabidopsis thaliana to Nutritional Phosphate Deprivation. *Plant Physiology*. 153:1112–1122.

- Jang J.C, Jen S. (1997). Sugar sensing in higher plants. Trends Plant Science 2:208-214.
- Jefferson R. (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system, Plant Molecular Biology. 5:387-405.
- Kalliopi A. (2009). Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology. LIBRO VID
- Kennedy J.A. Understanding berry development. Pract Winery Vineyard. (2002), 14–23.
- Kennedy J.A, Troup G.J, Pilbrow J.R, Hutton D.R, Hewitt C.A, Hunter R, Ristic P.G, Jones G.P. 2000. Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. Australian Journal of Grape and Wine Research. 6:244-254.
- Klein D, Stitt M. (1998). Effects of 2-deoxyglucose on the expression of *rbcS* and the metabolism of *Chenopodium rubrum* cell-suspension cultures. Planta. 205: 223±234.
- Kobayashi S, Ishimaru M, Hiraoka K, Honda C. (2002). Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. Planta. 215: 924–933.
- Kobayashi S, Yamamoto N.G, Hirochika H. (2004). Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. Science. 14: 304(5673):982.
- Koch K. (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. Current Opinion in Plant Biology. 7:235–246.
- Koenig D, Bayer E, Kang J, Kuhlemeier C, Sinha N. (2009). Auxin patterns *Solanum lycopersicum* leaf morphogenesis. Development. 136, 2997-3006
- Lamb C.J, Lawton M.A, Dron M, Dixon R.A. (1989). Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. Cell. 56:215-224.
- Larronde F, Krisa S, Decendit A, Chèze C, Deffieux G, Méryllon J. M. (1998). Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars. Plant Cell Reports 17: 946–950.
- Lartey R, Ghoshroy S, Ho J, Citovsky V. (1997). Movement and subcellular localization of a tovamovirus in *Arabidopsis*. Plant Journal. 12:537-545.
- Liu X, Cohen JD, Gardner G. (2011). Low-fluence red light increases the transport and biosynthesis of auxin. Plant Physiology 157, 891–904.

- Ljung K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140:943-950.
- Martin T, Hellmann H, Schmidt R, Willmitzer Lothar, Frommer W. (1997). Identification of mutants in metabolically regulated gene expression. *The plant Journal* 11: 53–62.
- Matus J.T. Aquea F y Arce-Johnson P. 2008. Analysis of the grape MYB R2R3 subfamily reveals expanded wine quality-related clades and conserved gene structure organization across *Vitis* and *Arabidopsis* genomes. *BMC Plant Biology*. 8:83.
- Matus J.T, Loyola R, Vega A. Peña-Neira A, Bordeu E, Arce-Johnson P, Alcalde J.A. 2009. Post- veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanins and flavonol synthesis in berry skins of *Vitis vinifera*. *Journal Experimental Botany*. 60:853-867.
- McCleary B.V, Matheson N.K, Small D. (1976). Galactomannans and a galactoglucomannan in legume seed endosperms: Structural requirements for β -mannanase hydrolysis. 15:1111-1117.
- Mishra B, Singh M, Aggrawal P, Laxmi A. (2008). Glucose and Auxin Signaling Interaction in Controlling *Arabidopsis thaliana* Seedlings Root Growth and Development. *Plos One*. 4:2.
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng W, Liu Y, Hwang I, Jones T. Jen S. (2003). Role of the *Arabidopsis* Glucose Sensor HXK1 in Nutrient, Light, and Hormonal Signaling. *Science* 300: 332-336.
- Reid K, Olsson N, Schlosser J, Peng F, T 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 E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*. 17:208-212.
- Rolland F, Moore B, Jen S. 2002. Sugar Sensing and Signaling in Plants. *The Plant Cell* 14:185-205.
- Rolland F, Gonzalez E, Jen S. 2006. Sugar Sensing and Signaling in Plants: Conserved and Novel Mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 57:675–709.
- Serrani J.C, Carrera E, Ruiz-Rivero O, Gallego-Giraldo L, Pereira-Peres L.E, García-Martínez J.L. (2010). Inhibition of Auxin Transport from the Ovary or from the Apical Shoot Induces Parthenocarpic Fruit-Set in Tomato Mediated by Gibberellins. *Plant Physiology*. 10:1104.

- Shirley B. 1996. Flavonoid biosynthesis: “new” functions for an “old” pathway. *Trends in Plant Science*. 1:377-382.
- Shimazaki M, Fujita K, Kobayashi H, Suzuki S. (2011). Pink-Colored Grape Berry Is the Result of Short Insertion in Intron of Color Regulatory Gene. 10:137.
- Symons G, Davies C, Shavrukov Y, Dry I.B, Reid J.B, Thomas M.R. Grapes on steroids. brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiology*. 140:150–158,
- Smeeckens S, Ma J, Hanson J, Rolland F. (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Plant Biology*. 13:274–279.
- Sun L, Zhang M, Ren J, Qi J, Zhang G, Leng P. (2010). Reciprocity between abscisic acid and ethylene at the onset of berry ripening and after harvest. *BMC Plant Biology*. 10:257.
- Tattersall E.A, Grimplet J, DeLuc L, Wheatley MD, Vincent D, Osborne C, Ergül A, Lomen E, Blank R.R, Schlauch K.A, Cushman J.C, Cramer G.R. (2007). Transcript abundance profiles reveal larger and more complex responses of grapevine to chilling compared to osmotic and salinity stress. *Functional and Integrative Genomics*. 4:317-333.
- Taylor J.E, Whitelaw CA (2001) Signals in abscission. *New Phytologist*. 151:323–39.
- Terrier N, Torregrosa L, Ageorges A, Vialet S, Verries C, Cheynier V, Romieu C. (2009). Ectopic expression of *VvMybPA2* promotes proanthocyanidin biosynthesis in grapevine and suggests additional targets in the pathway. *Plant Physiology*. 149: 1028–1041.
- Van Tunen A.J, Koes R.E, Spelt C.E, Krol A.R, J.N.M. (1998). Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes, *THE EMBO JOURNAL*. 7:1257–1263.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology 3 research program*. 0034.1-0034.11
- Vega A, Gutiérrez R, Peña-Neira A, Cramer G y Arce-Johnson P. (2011). Compatible GLRaV-3 viral infections affect berry ripening decreasing sugar accumulation and anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera*. *Plant Mol Biol*. 77: 261-274

- Venecie C, Uveira M.N, Guet S. (1997). Maturité polyphénolique du raisin mise en place d'une méthode d'analyse de routine. *Revue Francaise d'Oenologie*. 167:36-41.
- Vignault C, Vachaud M, Cakir B, Glissant D, Dedaldechamp F, Buttner M, Atanassova R, Fleurat-Lessard P, Lemoine R, Delrot S. (2005). VvHT1 encodes a monosaccharide transporter expressed in the conducting complex of the grape berry phloem. *Journal Experimental Botany* 56:1409-1418.
- Vitrac X, Larronde F, Krisa S, Decendit A, De eux G, MeÂrillon J.M. 2000. Sugar sensing and Ca²⁺ calmodulin requirement in *Vitis vinifera* cells producing anthocyanins. *Phytochemistry*. 53:659-665.
- Walker A, Lee E. y Robinson S. (2006). Two new grape cultivars, bud sports of Cabernet Sauvignon bearing pale-coloured berries, are the result of deletion of two regulatory genes of the berry colour locus. *Plant Mol Biol*. 62: 623–635.
- Walker A, Lee E, Bogs J, McDavid D, Thomas R. y Robinson S. (2007). White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *The Plant Journal*. 49: 772–785.
- Wheeler S, Loveys B, Ford C, 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.
- Yamakawa T, Kato S, Ishida K, Kodama T, Monoda Y. (1983). Production of anthocyanin by *Vitis* cells in suspension culture. *Agricultural and Biological Chemistry*. 47:2185-2191.
- Zeng L, Wang Z, Vainstein A, Chen S, Ma H. (2010). Cloning, Localization, and Expression Analysis of a New Tonoplast Monosaccharide Transporter from *Vitis vinifera* L. *Journal Plant of Growth Regulation*. 10:1007.
- Zhang X.R, Luo G.G, Wang R.H, Wang J, Himelrick DG. (2003). Growth and developmental responses of seeded and seedless grape berries to shoot girdling. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences* 128, 316–323.
- Ziliotto F, Corso M, Rizzini F.M, Rasori A, Botton A. Grape Berry ripening delay induced by a pre-véraison NAA treatment is paralleled by a shift in the expression pattern of auxin-and ethylene-related genes. 2012.