

UCH-FC
Biotecnología
T693
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

**“Estudio de la expresión y de la región promotora del gen
VvTMT2 de *Vitis vinifera* en relación al contenido de azúcar
durante el desarrollo del fruto”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

MARÍA ELIZABETH TORRES PACHECO

Dr. Patricio Arce-Johnson
Director de Seminario de Título:

Dr. Michael Handford
Patrocinante de Seminario de Título

Diciembre, 2012
Santiago-Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por la candidata:

MARÍA ELIZABETH TORRES PACHECO

“Estudio de la expresión y de la región promotora del gen *VvTMT2* de *Vitis vinifera* en relación al contenido de azúcar durante el desarrollo del fruto”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dr. Jorge Patricio Arce Jonhson
Director del Seminario de Título

Dr. Michael Handford
Patrocinante



Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Claudia Stange Klein
Presidenta

Dra. Liliana Cardemil Oliva

Santiago de Chile, Diciembre 2012



*Con especial agradecimiento al Dr. Patricio Arce-Johnson, por su confianza y
disposición, y a todo su laboratorio, por ser un gran equipo de trabajo.
Agradecimientos a mi familia, en especial a mis padres Walter Torres y Elizabeth
Pacheco. De no ser por ellos no estaría donde estoy. Y a José Antonio Michell por
su apoyo incondicional.*

ÍNDICE

Índice de Tablas.....	v
Índice de Figuras.....	vi
Lista de Abreviaturas.....	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	x
1. Introducción.....	1
1.1. Desarrollo del fruto de vid.....	1
1.2. Transporte de azúcares en el fruto de vid.....	3
1.3. Transportadores de monosacáridos en <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
1.4. Transportadores de monosacáridos en <i>Vitis vinifera</i>	5
1.5. Expresión de transportadores VvHTs y regulación por azúcares.....	7
1.6. Transportadores de monosacáridos en el tonoplasto (TMTs)	11
1.7. Papel de los azúcares en la regulación de los transportadores TMT.....	14
1.8. Uso de nuevas tecnologías para el análisis de promotores con interés biotecnológico.....	15
Objetivo General.....	17
Objetivos específicos y actividades.....	18
2. Materiales y métodos.....	19
2.1. Material vegetal y medición de contenido de azúcares solubles (°Bx).....	19
2.2. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	20
2.3. Análisis de expresión (qRT-PCR).....	21
2.4. Análisis bioinformático de la secuencia del promotor del gen <i>VvTMT2</i> (pVvTMT2).....	24
2.5. Clonamiento de pVvTMT2 en vector binario <i>pMF1</i>	25

3. Resultados.....	30
3.1. Medición de contenido de azúcares solubles (°Bx).....	30
3.2. Evaluación de la expresión del gen <i>VvTMT2</i> en el desarrollo del fruto.....	31
3.3. Análisis <i>in silico</i> de p <i>VvTMT2</i>	32
3.4. Clonamiento del promotor p <i>VvTMT2</i> en vector binario <i>pMF1</i>	34
4. Discusión y Proyecciones.....	41
4.1. Patrón de expresión de <i>VvTMT2</i> y su relación con los niveles de azúcar (°Bx) en bayas en desarrollo.....	43
4.2. Análisis <i>in silico</i> de p <i>VvTMT2</i>	45
4.3. Clonamiento del promotor de <i>VvTMT2</i> (p <i>VvTMT2</i>).....	48
4.4. Papel de <i>VvTMT2</i> en el desarrollo del fruto de vid.....	51
4.5. Ventajas del uso de una construcción intragénica, vector binario <i>pMF1</i> y <i>VvMybA1</i> como gen reportero.....	54
4.6. Proyecciones y posibles aplicaciones.....	55
5. Conclusiones.....	58
6. Bibliografía.....	60
Anexo.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	22
Tabla 2.....	25
Tabla 3.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	2
Figura 2.....	5
Figura 3.....	8
Figura 4.....	9
Figura 5.....	11
Figura 6.....	12
Figura 7.....	13
Figura 8.....	15
Figura 9.....	26
Figura 10.....	30
Figura 11.....	32
Figura 12.....	33
Figura 13.....	35
Figura 14.....	36
Figura 15.....	37
Figura 16.....	38
Figura 17.....	39
Figura 18.....	40
Figura 19.....	42
Figura 20.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

°Bx	Grados brix
Act	Actina
CaMV35S	Caulliflower Mosaic Virus 35S
cwINV	cell wall Invertase
G3PDH	Gliceraldehído 3-fosfo deshidrogenasa
GFP	Green Fluorescent protein
HTs	Hexose transporters
LB	Lysogeny Broth medium
MFS	Major Facilitator Superfamily
MS/2	Murashige & Skoog /2 medium
MSTs	Monosaccharide transporters
ORFs	Open Reading Frame
STPs	Sugar Transport Protein
TMHMM	TransMembrane prediction using Hidden Markov Models
TMT	Tonoplast Monossacharide Transporter
Ubi	Ubiquitina
WAF	Weeks after flowering

RESUMEN

En *Vitis vinifera*, durante el desarrollo del fruto, sucede una importante acumulación de azúcares en las células del mesocarpo. Ésto principalmente desde la pinta, momento que marca el inicio de la maduración. La sacarosa se transporta vía floema hasta el fruto y es procesada en el apoplasto por invertasas de pared celular. Los monosacáridos obtenidos (glucosa y fructosa) entran a la célula y son en su mayoría almacenados en la vacuola. En este proceso, los transportadores de monosacáridos son esenciales, dado que regulan el transporte desde el apoplasto al citoplasma y posteriormente a la vacuola. En *Vitis* se ha logrado el clonamiento de 6 secuencias que corresponden a putativos transportadores de monosacáridos (*VvHT1-6*). Se ha descrito que la mayoría son del tipo simporter monosacárido/H⁺, localizados en la membrana plasmática. Además, se ha estudiado su expresión durante el desarrollo del fruto y se ha demostrado que el azúcar tiene un efecto dual en la expresión de *VvHT1*. Poco se conoce de transportadores de monosacáridos localizados en la membrana de la vacuola (Tonoplasto). Se encontró que el putativo transportador *VvHT6* tiene gran similitud de secuencia con el transportador vacuolar descrito previamente en *Arabidopsis thaliana* *AtTMT2*, por lo que fue renombrado *VvTMT2*. Mediante técnicas de expresión global, se observó que este transportador posee un máximo de expresión en pinta, lo que se correlaciona con el inicio de la acumulación de azúcares. Entonces, es de esperarse que la expresión de este transportador esté regulada por azúcares. Con estos antecedentes, se planteó el objetivo de corroborar la expresión de este transportador y analizar su promotor en búsqueda de elementos de regulación por azúcar. Para esto, en primer lugar, se tomaron muestras de bayas en tres estadios de desarrollo: inmaduro, pinta y maduro,

se realizó una medición de concentración de azúcares solubles (°Bx) y se evaluó la expresión mediante qRT-PCR. Encontramos que existe un máximo de acumulación de transcrito en el estadio pinta, con una leve disminución de la expresión en estadio maduro. Estos resultados se correlacionan con un aumento en la concentración de azúcares en las bayas analizadas, observándose que concentraciones mayores de azúcar coinciden con una leve disminución de la expresión. Luego, se procedió a realizar un análisis *in silico* de la secuencia del promotor de *VvTMT2*, encontrándose elementos *cis* de regulación por azúcar lo que sugiere un efecto sobre la expresión. Posteriormente, se procedió al clonamiento de 1789pb de la secuencia promotora, la cual contiene todos los sitios de regulación de interés encontrados. Esto se realizó en una construcción intragénica, con el promotor de *VvTMT2* dirigiendo la expresión del gen reportero *VvMybA1*. Con esto se espera, en un futuro realizar experimentos de transformación en *Arabidopsis thaliana* y analizar el efecto de distintas concentraciones de azúcar sobre la expresión de *VvTMT2*. En conclusión, se analizó la secuencia promotora de un gen (*VvTMT2*) que, dados los resultados obtenidos, se regula en presencia de su propio sustrato. Esto, posiblemente, nos permitirá a futuro utilizar este promotor como promotor inducible en aplicaciones en especies de interés comercial.

ABSTRACT

In *Vitis vinifera*, during fruit development, a significant accumulation of sugars takes place in mesocarp cells. This happens mostly at veraison, the beginning of maturity. Sucrose is transported from photosynthetic tissues to the berry through the phloem and is processed in the apoplast by cell wall invertases. The resulting monosaccharides (glucose and fructose) enter the cell and are stored in the vacuole. In this process, monosaccharide transporters are essential as they regulate the transport from the apoplast to the cytoplasm and then to the vacuole. In *Vitis*, the cloning of 6 sequences of putative monosaccharide transporters has been accomplished (*VvHT1-6*). It has been described that most are monosaccharide/H⁺ symporters, localized in the plasma membrane. Furthermore, their expression throughout fruit development has been studied and it has been demonstrated that sugar has a dual effect on the expression of *VvHT1*. Little is known about monosaccharide transporters in the vacuole membrane (tonoplast). It was found that the putative transporter, *VvHT6* has high sequence similarity with the previously described tonoplast transporter of *Arabidopsis thaliana AtTMT2*, so it was renamed *VvTMT2*. Through global expression techniques, it was observed that this transporter has a maximum of expression in veraison, which correlates with the beginning of sugar accumulation. Consequently, it is expected that the expression of this transporter is regulated by sugars. With this background, the objective of this thesis was to corroborate the expression pattern of this transporter and its promoter sequence. In the first place, samples of berries in three different stages of development (immature, veraison and mature) were taken. Then a measurement of soluble sugar concentration and an expression analysis by qRT-PCR were performed. It was found that there is a maximum of transcript accumulation in veraison, with a

minor decrease in the mature stage. These results correlate with an increase in sugar concentration of the berries analyzed. It was observed that high sugar concentrations are related with a minor decrease in expression levels. Then, an *in silico* analysis of the promoter sequence of *VvTMT2* was performed. Several sugar regulated *cis*-elements, were found, which suggests that they may affect gene expression. Subsequently, the cloning of 1789 bp of the promoter sequence that contains all *cis*-elements of interest was performed. This was accomplished in an intragenic construct, with the *VvTMT2* promoter controlling the expression of the reporter gene *VvMybA1*. In the future, it is hoped to perform genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* and investigate the effect of various sugar concentrations on *VvTMT2* expression. In conclusion, the *VvTMT2* promoter sequence, which could be regulated by its own substrate, was studied. Possibly, this could allow us to use this sequence as an inducible promoter in applications of commercial interest.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Desarrollo del fruto de vid (*Vitis vinifera*)

Durante el desarrollo del fruto de vid (*Vitis vinifera*) ocurren una serie de cambios físicos y bioquímicos muy complejos que pueden ser divididos en tres fases (Figura 1A): La etapa inicial (Fase 1) se caracteriza por una rápida división celular, por un establecimiento de las células del fruto en las primeras dos semanas y por un aumento exponencial del tamaño de la baya debido a expansión celular. Además, en esta etapa ocurre gran acumulación de ácidos orgánicos. En la Fase 2, que se conoce como Fase *Lag*, no ocurre crecimiento del fruto, pero sí acumulación de azúcares en la baya hacia el final de ésta etapa, justo antes de la pinta. La maduración (Fase 3) comienza luego de la pinta y se caracteriza por una acumulación masiva de azúcares solubles (especialmente glucosa y fructosa) en las células del mesocarpo (Figura 1B) y un gran aumento en el tamaño del fruto, el cual se duplica hacia el final de la maduración (Deluc y col., 2007). Además, se ha descrito que ocurre síntesis y acumulación de antocianinas, compuestos fenólicos y precursores de aroma, cuya síntesis depende en gran medida de la acumulación de azúcares (Agasse y col., 2009). Para que todo este proceso se lleve a cabo es necesario que exista un transporte sostenido de azúcares, esencialmente de sacarosa, desde las hojas (órgano fuente) hasta el fruto en desarrollo (órgano sumidero).

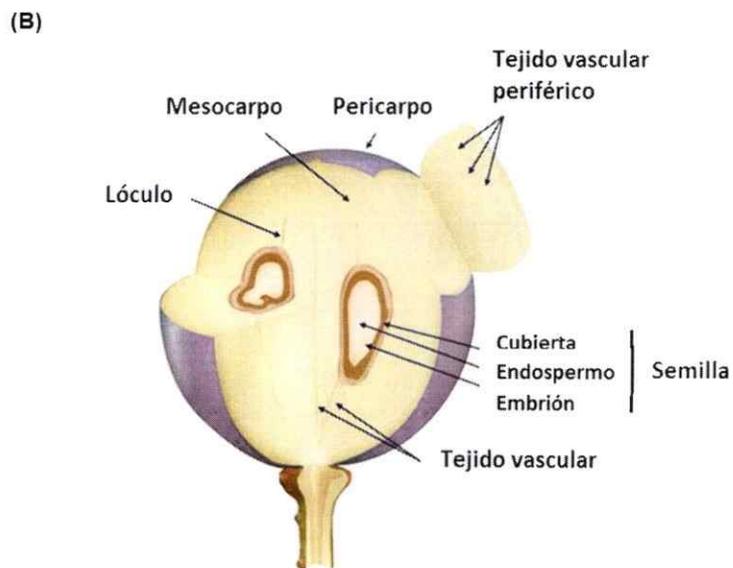
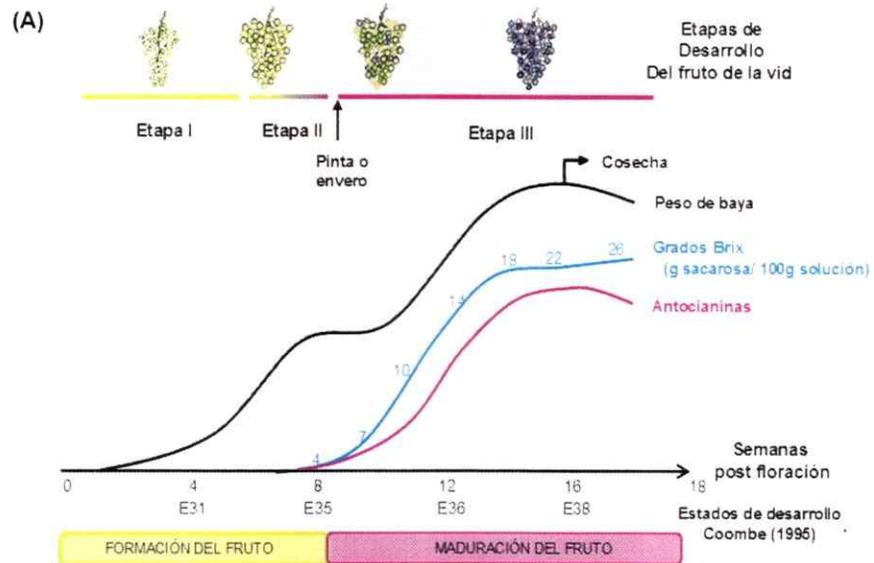


Figura 1. El fruto de vid y su desarrollo. A) Desarrollo del fruto de *Vitis vinifera*. A partir del estadio E-35 (Pinta) se observa un aumento en los Grados Brix y una acumulación de antocianinas, además de un incremento en el peso de la baya (modificado de Coombe y col., 1995) B) Estructura de fruto maduro de vid (Ilustración por Jordan Koutroumanídis, Winetitles).

1.2. Transporte de azúcares en el fruto de la vid.

El fruto en maduración es un importante órgano sumidero que recibe materia seca desde órganos fotosintéticos (Agasse y col., 2009). El principal azúcar de transporte en plantas es la sacarosa, que es menos susceptible a actividad metabólica que la glucosa. Este disacárido se transporta vía floema desde su lugar de síntesis hasta el órgano sumidero donde puede ser descargado por los plasmodesmos hacia el citoplasma de la célula (vía simplástica) o ser descargada al apoplasto (vía apoplástica).

En el apoplasto, la sacarosa puede ser transportada al interior de la célula vegetal mediante transportadores específicos ubicados en la membrana plasmática, o ser hidrolizada por invertasas de pared celular (cwINV). La glucosa y fructosa resultante son finalmente ingresadas a la célula mediante transportadores de monosacáridos (MSTs) (Williams y col., 2000).

En el fruto de vid, durante la pinta, ocurre un cambio de vía de descarga simplástica a apoplástica, acompañado de un aumento en la expresión y actividad de las invertasas cwINV. Como resultado, la concentración de monosacáridos en el apoplasto y la presión osmótica aumentan, lo cual podría provocar el aumento de la absorción de azúcar (Agasse y col., 2009). En consecuencia, ocurre una acumulación de grandes cantidades de monosacáridos, glucosa y fructosa, en las células del mesocarpo, llegando a alrededor de 1M de concentración de cada hexosa. Éstas, en su mayoría, son almacenadas al interior de la vacuola, que es el principal organelo de almacén de la célula vegetal (Agasse y col., 2009).

Por lo tanto, en el proceso de acumulación de azúcares en el fruto de la vid debe existir una expresión coordinada de transportadores de sacarosa, invertasas y

transportadores de monosacáridos (Vignault y col., 2005). Estos últimos cumplen un rol muy importante, tanto en el transporte de azúcares a través de la membrana plasmática, como en el almacenamiento final al interior de la vacuola.

1.3. Transportadores de Monosacáridos en *Arabidopsis thaliana*

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se han identificado 53 secuencias con alta similitud con los MSTs descritos previamente. Estos genes pueden ser clasificados en 7 subfamilias con un origen en común. Todos se caracterizan por poseer 12 dominios transmembrana con extremos N- y C- terminal característicos en todos los transportadores de azúcar pertenecientes a la familia MFS (Major Facilitators Superfamily, Williams y col., 2000) (Figura 2). Entre estos, los mejor caracterizados son los llamados AtSTPs, que corresponden a transportadores de membrana plasmática que catalizan el ingreso de hexosas desde el apoplasto al interior de la célula. El transportador AtSTP1 fue el primero en ser descrito como un simporter H^+ /monosacárido de alta afinidad, ubicado en la membrana plasmática y capaz de transportar un amplio rango de hexosas, excepto fructosa (Büttner, 2007). Desde entonces, varios genes ortólogos han sido identificados en diferentes especies vegetales.

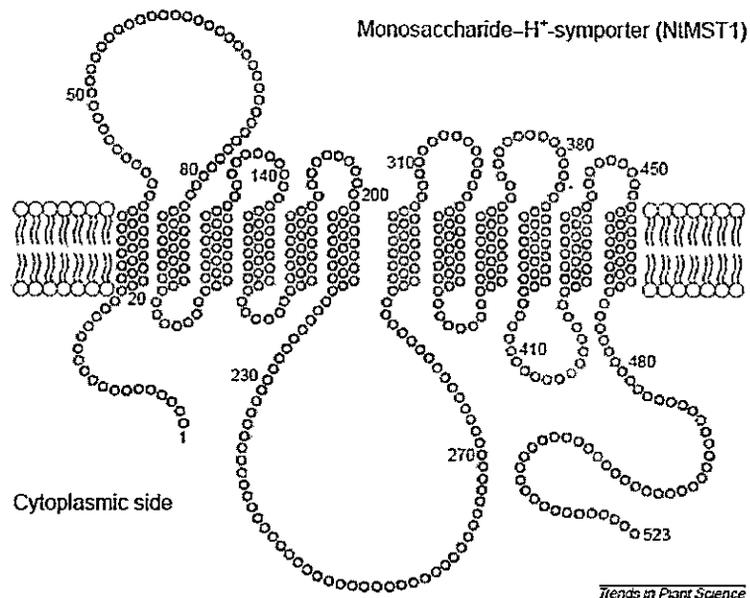


Figura 2. Modelo de la estructura de transportadores simporter monosacáridos-H⁺. Se observa que poseen 12 segmentos transmembrana con un loop entre las hélices 6 y 7 (Williams y col., 2000).

1.4. Transportadores de monosacáridos en *Vitis vinifera*

En *Vitis vinifera*, se han identificado 65 ORFs que codificarían para transportadores de azúcar. Entre éstos, 4 codifican para transportadores de sacarosa previamente descritos (*VvSUC11/VvSUT1*, *VvSUC12*, *VvSUC27* y *VvSUT2*), los otros 61 ORF codificarían para transportadores de monosacáridos (MSTs). En *Vitis vinifera* también se pueden identificar claramente 7 subfamilias de transportadores de monosacáridos. Dentro de estas, se ha descrito una compuesta por 22 ORFs, que posee una alta similitud con los *AtSTP* y han sido llamados *VvHTs* (*Vitis vinifera* Hexose Transporters) (Afoufa-Bastien y col., 2010).

Hasta el momento se han clonado 6 cDNAs completos, los que fueron nombrados *VvHT1-6*. Los *VvHTs* del 1 al 5 corresponden a simporters- H^+ y en su estructura poseen 12 segmentos transmembrana separados por un *loop* hidrofílico central de aproximadamente 60 aminoácidos, similar a lo observado en *Arabidopsis* (Figura 2) (Fillion y col., 1999, Hayes y col., 2007).

El transportador *VvHT1* fue el primero en ser caracterizado (Fillion y col., 1999, Vignault y col., 2005). Éste codifica para un putativo transportador de hexosas que se expresa mayormente en bayas y que posee alta similitud con *AtSTP1* (Fillion y col., 1999), del mismo modo *VvHT3*, *VvHT4* y *VvHT5* poseen una alta similitud con otros *AtSTPs*. Por otra parte, *VvHT2* y *VvHT6* no poseen similitud con ninguno de estos genes (Agasse y col., 2009).

El transportador *VvHT1* permite el transporte de glucosa con alta afinidad en mutantes de levadura (Vignault y col., 2005). Por otro lado, *VvHT4* y *VvHT5* son transportadores funcionales y permiten el transporte de glucosa en mutantes de levadura, pero con menor afinidad que *VvHT1* (Hayes y col., 2007).

Se observó la localización subcelular de *VvHT3* mediante unión a GFP y expresión transitoria en células epidermales de cebolla. En estos experimentos, la fluorescencia se asoció sólo a la periferia lo que sugiere su localización en la membrana plasmática (Hayes y col., 2007). De la misma forma, se logró identificar la localización en la membrana plasmática de *VvHT4* (Hayes y col., 2007), *VvHT5* y *VvHT1*. Esta última mediante inmunolocalización en bayas de vid (Vignault y col., 2005). Hasta el momento, no ha sido posible probar la localización subcelular de los transportadores *VvHT2* y *VvHT6*, sin embargo se ha especulado su ubicación en el Tonoplasto (Agasse y col., 2009).

1.5. Expresión de transportadores VvHTs y regulación por azúcares.

En vides, la expresión de los transportadores de monosacáridos está asociada principalmente a órganos sumidero, siendo en general débil en los órganos fuente como hojas maduras (Agasse y col., 2009).

Durante el desarrollo del fruto, el gen *VvHT1* se expresa en estadios prepinta, para luego decaer durante la maduración, como se muestra en la Figura 3 (Hayes y col., 2007, Deluc y col., 2007, Afoufa-Bastien y col., 2010). Sin embargo, también se ha visto que en anthesis y en pinta se produce la mayor acumulación de transcrito (Fillion y col., 1999). Además, se han encontrado 2 patrones de expresión para *VvHT2*: Mediante RT-PCR se observó que se expresa mayormente en bayas en Fase 1 disminuyendo en Fase *Lag* (Hayes y col., 2007). Sin embargo, por experimentos de macroarreglos se observó expresión durante todo el desarrollo con un máximo en pinta y maduración (Afoufa-Bastien y col., 2010). En cuanto a *VvHT3*, sus niveles de transcritos son mayores en bayas jóvenes, disminuyendo en Fase *Lag* y volviendo a aumentar en fase 3, coincidiendo con la acumulación de azúcar (Hayes y col., 2007, Afoufa-Bastien y col., 2010). *VvHT4* no se expresa mayormente (Hayes y col., 2007, Afoufa-Bastien y col., 2010) y *VvHT5* aumenta hacia el final de la maduración (Hayes y col., 2007) y es predominante en semillas. Además, se ha descrito que puede ser inducido por patógenos (Hayes y col., 2010).

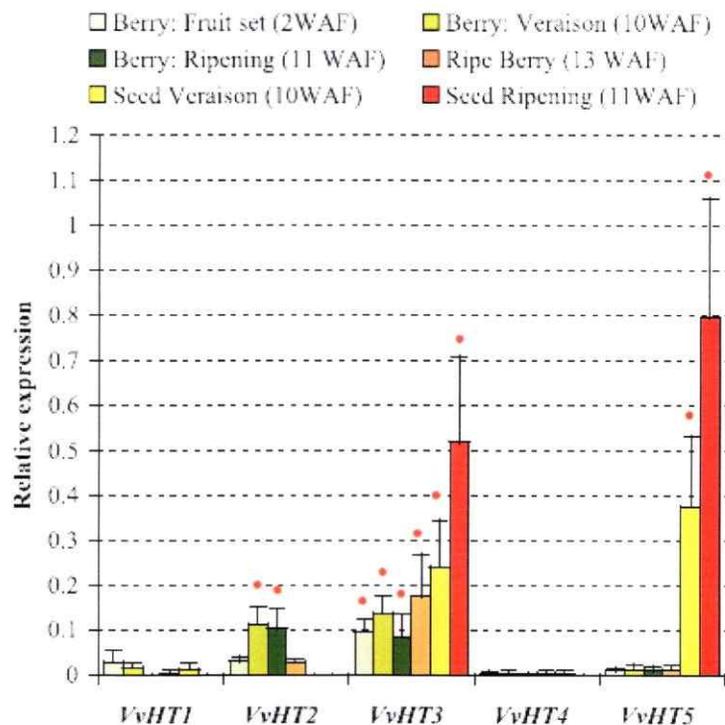


Figura 3. Expresión de los transportadores de monosacáridos conocidos en *Vitis vinifera* (VvHTs) en las distintas etapas del desarrollo del fruto, utilizando la técnica de macroarreglos. WAF: Weeks after flowering (Semanas después de la floración) (Afoufa-Bastien y col., 2010).

En particular, se ha observado mediante macro y microarreglos que *VvHT6* tiene un máximo de abundancia de transcrito cerca del inicio de la pinta, lo que se correlaciona con el inicio de la acumulación de hexosas (Figura 4). Esto nos indica que este transportador podría cumplir un papel significativo en la acumulación de azúcares (Deluc y col., 2007). Además, dado el patrón de expresión característico, la acumulación de transcritos podría estar controlada en parte por su propio sustrato. Hasta el momento, la posible regulación por azúcares de *VvHT6* no ha sido estudiada

en profundidad. Cabe mencionar, que se ha especulado la localización subcelular de VvHT6 en el tonoplasto.

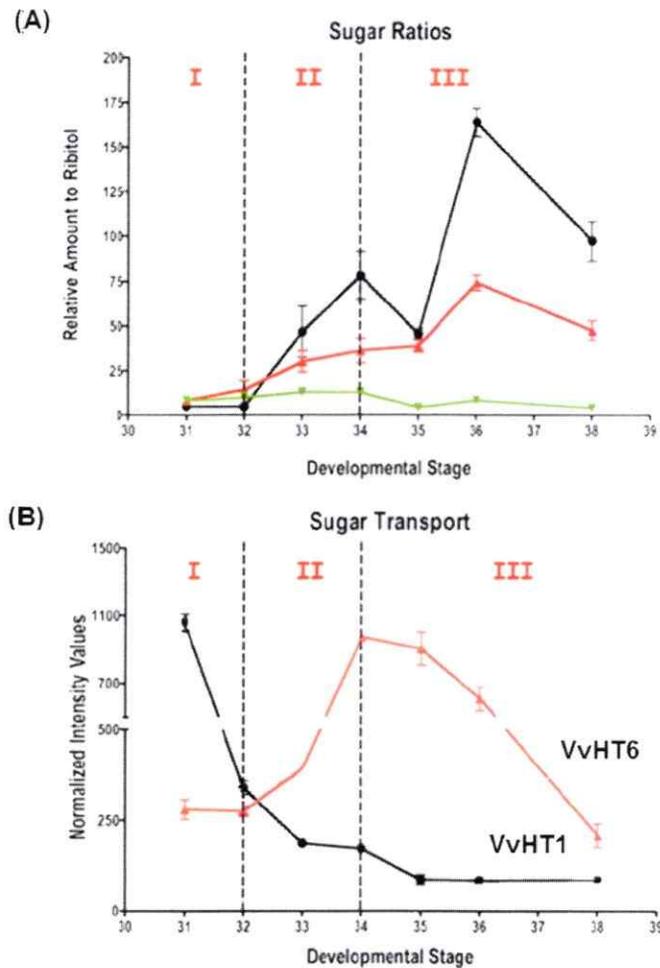


Figura 4. Relación entre acumulación de azúcares en el fruto y la expresión de los transportadores *VvHT1* y *VvHT6* en bayas de vid. A) Proporción de azúcares durante el desarrollo del fruto: fructosa (negro), glucosa (rojo) y sacarosa (verde). B) Acumulación de transcritos de *VvHT6* y *VvHT1*, observada mediante microarreglos. Los números I, II y III indican las fases del desarrollo del fruto. (Modificado de Deluc y col., 2007).

Se han identificado un gran número de genes cuya expresión es regulada por ciertos metabolitos. Algunos se expresan en presencia de un metabolito en particular, mientras otros se expresan cuando las células se encuentran en ausencia de un compuesto específico, como por ejemplo el azúcar. Si bien estos genes pueden compartir elementos río arriba en sus vías de señalización, las vías aparentemente se ramifican en elementos regulatorios que interactúan con secuencias específicas en los promotores de cada gen (Hwang y col., 1998). Así se observó en el promotor de *VvHT1* (Figura 5), cuya expresión se encuentra regulada por azúcar (Atanassova y col., 2003, Conde y col., 2006). Se analizó la secuencia promotora del gen *VvHT1*, encontrándose varios sitios descritos previamente como motivos de regulación por azúcar. Se identificaron 3 repeticiones del elemento SURE1 (Suc-Responsive Element 1), el cual ha sido descrito como prerrequisito para control positivo de genes inducidos por azúcar (Grierson y col., 1994). Se encontraron además 2 repeticiones de Sucbox3 (regulación positiva por azúcar), 2 AMYBOX2 y 1 copia de AMYBOX1. Estos dos últimos sitios corresponden a elementos potenciadores de inanición por azúcar y de regulación negativa por azúcar, respectivamente (Huang y col., 1990).

En estudios para evaluar la actividad del promotor, se fusionaron 3 secuencias de largos distintos (2,4Kb, 0,8Kb y 0,3Kb) al gen reportero β -Glucoronidasa (*uid A* que codifica para GUS) y se analizaron los efectores potenciales del promotor en cultivos celulares de tabaco. Se observó que al utilizar 56mM de glucosa, 58mM de sacarosa y 58mM de palatinosa (isómero de sacarosa no transportable), se dobló la expresión de GUS dada por el promotor de *VvHT1*, mientras que la fructosa no tuvo ningún efecto (Atanassova y col., 2003). Los resultados fueron más fuertes con el promotor de 2,4Kb que contiene todos los elementos de regulación antes mencionados (activadores y represores). El efecto también fue significativo con el promotor de 0,3Kb que posee

sólo elementos activadores, demostrando que la expresión de *VvHT1* se encuentra regulada por azúcares (Atanassova y col., 2003).

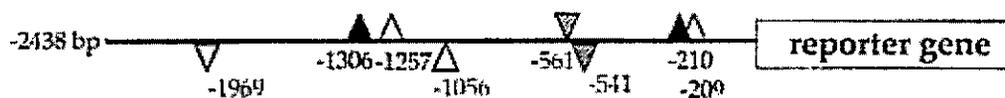


Figura 5. Esquema del promotor de *VvHT1* (2,4 Kb) unido al gen reportero GUS. SURE1 (Triángulo gris), Sucbox 3 (Triángulos negros), AMYBOX1 (Triángulos blancos), AMYBOX 2 (Triángulos tachados).

1.6. Transportadores de monosacáridos en el tonoplasto (TMTs)

Dado que el principal organelo de almacén de azúcares y otros compuestos en las células del mesocarpo es la vacuola, los transportadores de tonoplasto serían esenciales durante la maduración del fruto de vid. Sin embargo, poco se conoce acerca de transportadores de tonoplasto en *Vitis vinifera*. En cuanto a esto, se ha visto que *VvHT6* posee el *loop* central característico de transportadores del tonoplasto de *Arabidopsis thaliana*, aproximadamente 200 aminoácidos más largo que el resto de los *VvHTs* (Wormit y col., 2006). La proteína putativa *VvHT6* comparte una significativa homología de aminoácidos con los HTs a cada lado del *loop* hidrofílico central (Hayes y col., 2007). Sin embargo, ésta es más cercana a la familia de los TMTs de *Arabidopsis thaliana* (Wormit y col., 2006) pues posee una alta similitud con el gen de *AtTMT2*.

En *Arabidopsis*, la familia de los TMTs está formada por 3 isoformas: *AtTMT1-3*. Estas tienen poca similitud con los transportadores de hexosa *AtSTPs*, localizados en membrana plasmática. Los *AtTMTs* se caracterizan por poseer un extenso *loop* hidrofílico ubicado entre los segmentos transmembrana 6 y 7 de aproximadamente 320 residuos aminoacídicos de largo. Se estudió la ubicación subcelular de *AtTMT1* unido a GFP en protoplastos de tabaco y se observó su clara localización en el tonoplasto. Análisis de hibridación por RNA blot revelan que los mayores niveles de *AtTMT1* se encuentran en hojas (jóvenes y maduras) y en tejidos florales, mientras que los transcritos de *AtTMT2* se acumulan mayormente en raíces y tejidos del tallo. El mRNA de *AtTMT3* no fue detectable por esta técnica (Figura 6). Se han encontrado genes homólogos a los *AtTMTs* en otras especies como arroz, medicago, cebada y, recientemente, en vides (Zeng y col., 2010).

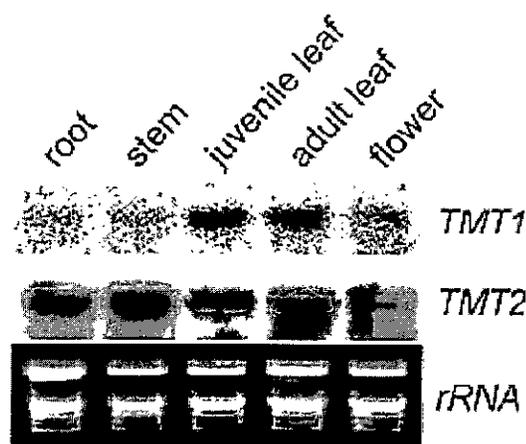


Figura 6. Análisis de hibridación por RNA Blot de la acumulación de transcritos de *TMT1* y *TMT2* en distintos tejidos de *Arabidopsis thaliana*. (Wormit y col., 2006).

En el genoma de *Vitis vinifera* se encontraron 3 secuencias homólogas a los TMTs de *Arabidopsis*. Las anotaciones GSVIVT00019321001, GSVIVT00002919001 y GSVIVT00036283001, en los cromosomas 7, 18 y 3 respectivamente, presentan la mayor homología con los AtTMTs (59-72%), por lo que se nombraron *VvTMT1*, *VvTMT2* (*VvHT6*) y *VvTMT3* respectivamente (Zeng y col., 2010).

A través de un análisis de las secuencias aminoacídicas se encontró que las 3 proteínas putativas poseen 11 segmentos transmembrana con un *loop* hidrofílico central extremadamente largo entre los dominios transmembrana 6 y 7. Así mismo, se evaluó la expresión de *VvTMT1* mediante RT-PCR semicuantitativo, encontrándose transcritos más abundantes en frutos y hojas jóvenes y expresión débil en frutos maduros y hojas adultas (Figura 7). Además, se demostró el decaimiento en la expresión de *VvTMT1* durante el desarrollo del fruto mediante Northern Blot.

Para determinar la posible localización subcelular se fusionó el gen *VvTMT1* a GFP y se expresó de forma transitoria en células epidermales de tabaco, observándose localización de *VvTMT1* en el tonoplasto (Zeng y col., 2010).

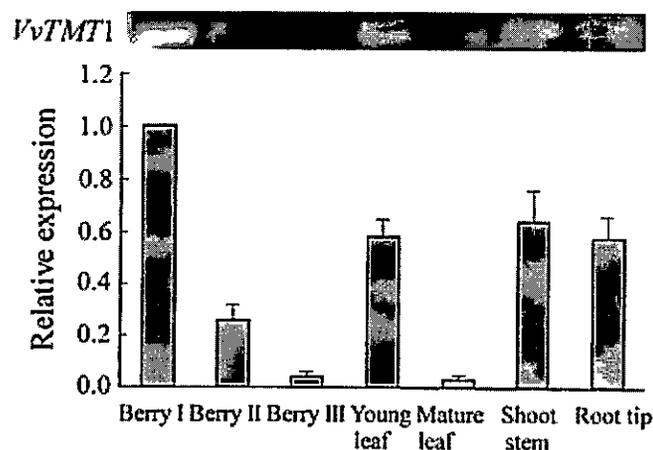


Figura 7. Expresión de *VvTMT1* durante el desarrollo del fruto (Berry I, II y III) y en otros tejidos (Hojas jóvenes, hojas maduras, tallo y raíz). (Zeng y col., 2010).

1.7. Papel de los azúcares en la regulación de los transportadores TMT

Hasta el momento, la regulación de la expresión de los transportadores VvTMT en particular, no ha sido evaluada. Sin embargo, se observó en *Arabidopsis thaliana* que la presencia de altos niveles de azúcar durante el crecimiento en medio líquido afecta los niveles de transcrito de *AtTMT1* y *AtTMT2*. La adición de 5% de glucosa promueve la acumulación de transcritos de *AtTMT1* y *AtTMT2* y la adición de 5% de sacarosa promueve una mayor acumulación de *AtTMT1* que de *AtTMT2*. Por su lado, la fructosa tiene un pequeño efecto en la expresión de *AtTMT2* y ningún efecto en *AtTMT1* (Figura 8A). La expresión de estos genes también se ve afectada por frío, sequía y salinidad (Wormit y col., 2006). De la misma forma, se ha visto que en arroz los niveles de transcrito de los transportadores *OsTMT1* y *OsTMT2* aumentan por tratamiento con sacarosa, glucosa y fructosa (Figura 8B) (Cho y col., 2010). En vides, en cambio se ha evaluado la regulación de la expresión de transportadores de monosacáridos conocidos hasta el momento (*VvHT1-5*), debido a su importante rol en la acumulación de hexosas en la baya, encontrándose efectos significativos del azúcar en la expresión sólo del transportador *VvHT1* (Conde y col., 2006).

Como se mencionó anteriormente, la presencia de sitios de regulación por azúcar en el promotor de los *TMT* podría explicar los cambios en la expresión en respuesta a azúcar. Sin embargo, esto último no ha sido evaluado en ninguno de estos genes, incluyendo los encontrados en *Vitis vinifera*.

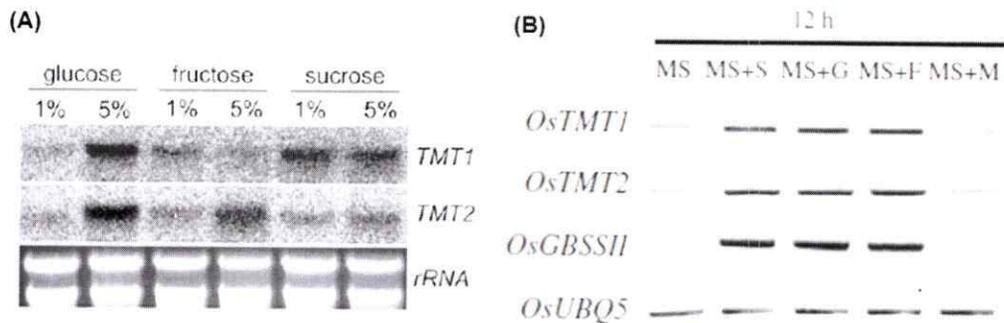


Figura 8. Respuesta a azúcar en TMTs de *Arabidopsis* y arroz (*Oriza sativa*). A) Análisis de Hibridación por RNA blot muestra la acumulación de transcritos de *AtTMT1* y 2 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* en presencia de diferentes azúcares a distintas concentraciones (Wormit y col., 2006). B) Análisis de RT-PCR semicuantitativo que muestra el efecto del azúcar en la expresión de *OsTMT1* y 2 en hojas incubadas en medio Murashige y Skoog (MS) y en sacarosa (S), glucosa (G), fructosa (F) y maltosa (M) (Cho y col., 2010).

1.8. Uso de nuevas tecnologías para el análisis de promotores con interés biotecnológico.

Se ha reportado que la glucosa cumple un rol dual en la expresión del transportador de hexosas de *Vitis vinifera* *VvHT1* (Conde y col., 2006). En cultivos celulares de vid, se induce la acumulación de transcrito de *VvHT1* y la absorción de glucosa en condiciones de déficit de azúcar, pero se reprimen estos parámetros cuando la concentración de azúcar es alta. Se postula que este complejo efecto podría resultar de la coexistencia de varios elementos de regulación positiva (*SURE1* y *Suc box3*) y negativa (*AMYBOX1* y *AMYBOX 2*) encontrados en la secuencia del promotor

de *VvHT1* (Atanassova y col., 2003 y Conde y col., 2006). Asimismo, se han identificado elementos *cis* de regulación por azúcar en otros genes cuya expresión es regulada por estos metabolitos (Agasse y col., 2009). Éstas secuencias promotoras, al activarse o reprimirse en presencia de azúcares podrían ser utilizadas a futuro en aplicaciones de interés para, por ejemplo, inducir la acumulación de algún compuesto específico o reprimir la expresión de un gen en particular.

Éstas secuencias regulatorias, candidatas a ser utilizadas en aplicaciones biotecnológicas, deben ser previamente evaluadas. En cuanto a esto, existen herramientas de uso común para la evaluación de secuencias promotoras (GFP, GUS, etc). Sin embargo, en este último tiempo han surgido tecnologías que permiten evaluar la actividad de un promotor en particular utilizando secuencias propias de la especie de interés. Estas tecnologías se conocen como *cis*génesis e *intragénesis*.

Por definición, la *cis*génesis es la modificación genética de una planta recipiente con un gen presente en la misma especie o una especie sexualmente compatible, flanqueada por su propio promotor y terminador. Por su parte, la *intragénesis* consiste en la transformación genética utilizando un constructo compuesto de secuencias regulatorias y codificantes derivadas de la misma especie o una sexualmente compatible. Un *intragen* se diferencia de un *cisgen* en que el primero contiene nuevas combinaciones de secuencias promotoras, codificantes y terminadores y, por lo tanto, no es una copia perfecta del gen natural (Molesini y col., 2012) Estas tecnologías permiten producir plantas genéticamente modificadas con características deseables en considerablemente menor tiempo que por mejoramiento genético tradicional, puesto que se introduce directamente el gen de interés. Todo esto, sin las desventajas que acarrea la *transgénesis*, cuyos productos son en general poco aceptados por el consumidor. Ante esto, se requiere por lo tanto, buscar secuencias regulatorias que

permitan dirigir la expresión de ciertos genes de interés para ser utilizados en aplicaciones que incluyan las tecnologías de cisgénesis e intragénesis.

Como ya se mencionó anteriormente, mediante técnicas de expresión global se observó que *VvHT6* (*VvTMT2*) se expresaría durante toda la maduración del fruto de vid, lo cual se correlaciona con la acumulación de azúcares en la baya (Deluc y col., 2007). Ésta característica, en conjunto con la presencia de elementos *cis* reguladores, harían del promotor de éste gen una secuencia regulatoria candidata para ser utilizada en cisgenia. Sin embargo, todas estas características deben ser confirmadas y estudiadas en mayor profundidad.

En resumen, dada la relevancia de los transportadores de monosacáridos en el desarrollo del fruto de *Vitis vinifera* y que, entre estos, *VvTMT2* (*VvHT6*) se expresaría fuertemente en la maduración, lo cual se correlaciona con la acumulación de azúcares en la baya. Además, que la expresión de los transportadores *VvTMTs*, descubiertos recientemente, no se ha estudiado hasta la fecha y que existen antecedentes de que la expresión de transportadores de vides (*VvHT1*) y *TMTs* de otras especies están regulados por azúcar, se plantea el siguiente objetivo general:

OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión del gen del transportador *VvHT6* (*VvTMT2*) durante el desarrollo del fruto de *Vitis vinifera*, y la posible correlación con el aumento de azúcares solubles mediante análisis de la secuencia del promotor.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS Y ACTIVIDADES

Objetivo Específico 1: Confirmar la expresión del gen *VvTMT2* en distintos estadios del desarrollo del fruto de *Vitis vinifera*.

1. Actividad 1: Recolección de muestras de fruto de *Vitis vinifera* cv. 'Cabernet Sauvignon' en tres estadios del desarrollo (inmaduro, pinta y maduro) y medición del contenido de azúcares solubles en las bayas a analizar.
2. Actividad 2: Extracción de RNA y síntesis de cDNA.
3. Actividad 3: Análisis de la expresión génica de *VvTMT2* en cDNA de frutos de vid mediante qRT-PCR.

Objetivo Específico 2: Caracterizar y clonar la secuencia de interés del promotor del gen *VvTMT2* mediante la tecnología de intragénesis.

1. Actividad 1: Análisis *in silico* de la secuencia del promotor (*pVvTMT2*)
2. Actividad 2: Clonamiento de la secuencia promotora del gen *VvTMT2* (*pVvTMT2*) en un sistema reportero de expresión en plantas que utiliza la tecnología de intragénesis.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal y medición de contenido azúcares solubles (° Bx).

En primer lugar, se tomaron muestras de frutos de *Vitis vinifera* cv. 'Cabernet Sauvignon' desde el campo experimental del Programa de Mejoramiento Genético de la Vid, ubicado en la comuna de Curacaví (Región Metropolitana, Chile). Se extrajeron racimos completos de 3 plantas distintas (muestras biológicas) en tres estadios del desarrollo: (1) Un estadio inmaduro (E-31) en el cual no ocurre acumulación de azúcares; por el contrario, el azúcar, que en este periodo se descarga en el fruto por vía simplástica, se utiliza principalmente como fuente de energía para las células en división (Agasse y col., 2009); (2) Estadio tinta (E-35), que marca el inicio de la maduración y de la acumulación de azúcares en la vacuola; y (3) un estadio maduro (E-38) en el que se han almacenado importantes cantidades de azúcar en las células del mesocarpo de las bayas de vid, principalmente en forma de monosacáridos. (Coombe y col., 1995).

Los frutos fueron separados del racimo y almacenados en nitrógeno líquido hasta su procesamiento. En el Laboratorio, con el fin de obtener una estimación de la concentración de azúcar en las bayas a analizar, se midieron las concentraciones de azúcares solubles como grados brix (°Bx) en 5 bayas de cada racimo utilizando un refractómetro convencional. A partir de estos datos se obtuvo el promedio de °Bx en cada estadio de desarrollo. Luego, se realizó un análisis estadístico mediante ANOVA y un test de tuckey ($p < 0,05$) con el programa GraphPad Prism 5.0©. Finalmente, se separó la pulpa (mesocarpo) de la piel (pericarpo) y las semillas (Figura 1A). Las muestras de mesocarpo se almacenaron en tubos Falcon de 50mL a -80° C.

2.2. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.

Para la extracción de RNA, se procedió con el método CTAB-Spermidina adaptado para fruto de vid (Gambino y col., 2008). Inicialmente se pulverizaron entre 2 y 3g de tejido del mesocarpo en mortero con nitrógeno líquido y se añadieron a 30mL de Buffer de extracción (CTAB 2%, PVPP 2%, Tris HCL 300mM pH 8.0, EDTA 25mM, NaCl 2M, trihidrocloruro de spermidina 0,05%, β -mercaptoetanol 2% y agua DEPC) precalentado a 65°C. Las muestras se incubaron durante 10 min a 65°C. Luego se añadió 1 volumen de Cloroformo:IAA (24:1) y se centrifugó 15 min a 5500rpm y 4°C. La fase acuosa superior se transfirió a un nuevo tubo falcon enfriado en hielo, se añadió el mismo volumen de Cloroformo:IAA (24:1) y se centrifugó 15 min a 5500rpm y 4°C. Posteriormente, la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo falcon y se centrifugó por 20 min a 9000rpm y 4°C. El sobrenadante resultante se transfirió a un nuevo tubo y se adicionaron 0,3 Vol de NaOAc 3M y 0,6 Vol de Isopropanol. Las muestras se almacenaron a -80°C por 1 hora y luego se centrifugaron durante 30min a 5500rpm y 4°C. El sobrenadante se eliminó y el pellet resultante se disolvió en 500 μ L de Buffer TE pH 7,5 (0,1M Tris HCl 0,5M EDTA). Luego, la mezcla se transfirió a tubos eppendorf de 1,5mL previamente enfriados en hielo. Se añadieron 0,3 Vol de LiCl 8M y se guardaron las muestras a 4°C toda la noche. Al día siguiente, se realizó una centrifugación por 30 min a 14000rpm y 4°C. Se desechó el sobrenadante y se añadieron 500 μ L de Etanol 70% (DEPC) frío. Luego, se centrifugaron a 18000rpm por 10min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Se dejó secar el pellet por 10min para finalmente resuspender en 20 μ L de agua DEPC. La cuantificación del RNA obtenido se realizó en Nanodrop.

A partir de 2 μ g de RNA, se procedió a la síntesis de cDNA. En primer lugar, se realizó un tratamiento con DNasa con el sistema comercial RQ1 RNase-free DNase

(Promega®). Luego, el cDNA se sintetizó utilizando el sistema comercial SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen®). Para verificar la integridad del cDNA, se realizó un PCR convencional utilizando partidores que amplifican un fragmento de 400pb del transcrito que codifica por la enzima Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de *Vitis vinifera* (VvG3PDH) (Tabla 1). El programa de PCR utilizado fue: 95°C 5 min, 30 ciclos de 95°C 30s, 55°C 30s y 72°C 30s, y una extensión final de 10 min a 72°C. El producto de PCR se observó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, a 100mV por 30min. La secuencia de todos los partidores utilizados en este seminario de título, se resumen en la tabla 1.

2.3. Análisis de expresión (qRT-PCR)

Una vez obtenidas todas las muestras de cDNA (3 por cada estadio de desarrollo), se procedió al análisis de la expresión mediante qRT-PCR, que permite estimar la expresión relativa de un transcrito específico en una muestra. En primer lugar, se diseñaron partidores específicos utilizando como templado la secuencia completa del cDNA del gen *VvHT6* (anotación GSVIT00002919001) obtenida a partir del genoma de *Vitis vinifera* cv. Pinot noir 8X, que se encuentra en la base de datos de Genoscope®.

Luego, se construyó una curva de calibración y se midió la eficiencia en la reacción de qRT-PCR. Para esto, se realizó un PCR convencional con los partidores qVvHT6 (Tabla 1), utilizando el siguiente programa: 95°C 5 min, 30 ciclos de 95°C 30s, 56°C 30s y 72°C 30s y 10 min a 72°C. El producto de PCR se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 3%.

Tabla 1. Lista de partidores utilizados en el transcurso de este seminario de título. (*)
 En los partidores pVvTMT2-F y -R se destacan con subrayado los sitios de restricción
Ascl y *PmeI* respectivamente.

Partidor	Secuencia
VvG3PDH-F	5'- CAGGATGCCATGTGGACAA -3'
VvG3PDH-R	5'- GTGTTGCCTTCATTGAATGG -3'
qVvHT6-F	5'- CTGTTCCGGTAGTGTCCATGA -3'
qVvHT6-R	5'- GCTCTCTTCATCCCCTGTT -3'
qVvG3PDH-F	5'- TTGGCATTGTGGAGGGTCTT -3'
qVvG3PDH-R	TTCCACCTCTCCAGTCCTTCA -3'
VvAct-F	5'- ACCAGAATCCAGCACAATC -3'
VvAct-R	5'- ATGGCCGATACTGAAGATAT -3'
pVvTMT2-F (*)	5'- <u>GGCGCGCCT</u> AACTGATCAAGAGGCCAACTC-3'
pVvTMT2-R (*)	5'- <u>GTTTAAACCT</u> CAGATCCAATTGGGTTAGACC-3'
M13-F	5'- GTTTTCCCAGTCACGAC -3'
M13-R	5'- CGAGGAAACAGCTATGAC -3'
VvMybA1-F	5'- ATGGAGAGCTTAGGAGTTAGAAAG -3'
VvMybA1-R	5'- TCAGATCAAATGATTTTCATTGTGT -3'
VvHT6int2-F	5'-CGGTTGATTGAGCTTTTTGGC-3'
VvHT6int2-R	5'-TCCACCACCAAATCCAACGA-3'

A partir de un producto de PCR se realizó una dilución 10^{-2} y luego 5 diluciones seriadas a partir de ésta (A: 10^{-3} , B: 10^{-4} , C: 10^{-5} , D: 10^{-6} , E: 10^{-7}). Se utilizó el equipo Stratagene™ modelo Mx3000P y el sistema comercial Sensimix™ SYBR® Green con tinción de referencia Rox (Bioline), que contiene la enzima *Taq* polimerasa. La mezcla para una reacción fue: 12,5µL de Sensimix SYBR® Green, 0,7µL de partidores y 10µL de H₂O MiliQ. Se agregaron 2µL de cada dilución de producto de PCR, para 25µL totales de reacción. Cada experimento se realizó en triplicado, incluido los controles negativos NTC sin DNA templado. La curva de calibración y la eficiencia de los partidores se obtuvieron mediante el programa Stratagene MxPro QPCR Software. Para esta última, se consideró el porcentaje de eficiencia, entregado por el programa y la pendiente de la curva de calibración.

Con los datos de eficiencia y la curva de calibración es posible proseguir con el experimento de qRT-PCR. Cada experimento se hizo en triplicado y se utilizó el gen constitutivo *VvG3PDH* (qVvG3PDH) como referencia. Se usó la misma reacción mencionada anteriormente. A este se le agregaron 2µL de cDNA (dilución 1/10).

El programa de amplificación para ambos set de partidores (qVvHT6 y qVvG3PDH, ver Tabla 1) fue: 10 min a 95°C, 40 ciclos de 30s a 95°C, 15s de 56°C y 15s de 72°C, 1 min a 95°C, 30s a 56°C y 30s a 95°C. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y Test de Tuckey ($p < 0,05$) utilizando el programa GraphPad Prism 5.0 ©.

2.4. Análisis bioinformático de la secuencia del promotor del gen *VvTMT2* (pVvTMT2).

Mediante herramientas bioinformáticas desarrolladas en el Laboratorio de Genética y Bioquímica Vegetal del Dr. Patricio Arce, ubicado en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, se realizó una búsqueda de elementos *cis* de regulación por azúcar en la región promotora del gen *VvHT6* (*VvTMT2*), cuya anotación es GSVIVG00002919001. Para ello, se obtuvo la secuencia de 2Kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de dicho gen a partir del genoma secuenciado de *Vitis vinifera* cv. Pinot noir y su archivo de formato de característica general, o conocido por sus siglas en inglés GFF (General Feature Format), que contiene principalmente las posiciones de inicio y fin predichas para cada gen. Junto a ello, se generaron 10000 secuencias al azar de 2000pb, considerando la composición del genoma de *Vitis vinifera* (26% A, 14% C, 14% G, 26% T, 20% N). Una vez ingresada la secuencia, el programa entregó como salida los sitios de interés encontrados, con cuantas repeticiones está en la secuencia y cuantas veces se encuentra en el azar. Además, entregó una razón entre los elementos encontrados en la secuencia blanco y los encontrados en promedio en las secuencias generadas al azar. Finalmente, se realizó un análisis estadístico que entrega un p-value, el cual da una estimación de la significancia de los datos obtenidos. Los elementos a buscar, descritos previamente como de regulación por azúcar, se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Elementos *cis* involucrados en la regulación transcripcional por azúcares descritos a la fecha (Afoufa-Bastien y col., 2010).

i) Elementos de respuesta a azúcar	
Nombre	Secuencia
SURE1	AATAGAAAA
SURE2	AATACTAAT
Sucrose Box 3	AAATCA(6N)AA
CGACGOSAMY3	CGACG
CMSR3	TGGACGG
SP8	TACTATT
WBOXHVIS01	TGACT
ii) Secuencias comunes para percepción metabólica (azúcar) y hormonal	
S-box	CACCTCCA
MYBGAHV	TAACAAA
AMYBOX1	TAACA[A/G]A
AMYBOX2	TATCCAT
PYRIMIDINEBOXHVEPB1	TTTTTTCC
PYRIMIDINEBOXOOSRAMY1A	CCTTTT

2.5. Clonamiento de pVvTMT2 en vector binario *pmf1*

Para el clonamiento de la secuencia promotora del gen *VvTMT2* (pVvTMT2) se realizó en primer lugar una extracción de DNA genómico a partir de hojas adultas de plantas de vid cv. 'Cabernet Sauvignon' utilizando el sistema comercial FavorPrep Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen®). La integridad del DNA se verificó mediante la amplificación por PCR de un fragmento de alrededor de 650pb del gen

constituyo que codifica para actina (*VvAct*) (Tabla 1), con el siguiente programa: 95°C 5 min, 35 ciclos de 95°C 30s, 55°C 30s y 72°C 30s, y 10 min a 72°C.

Recientemente, se reportó el uso del gen *MybA1* de *Vitis vinifera* (*VvMybA1*) como gen reportero para el estudio de la regulación de promotores. Específicamente, el producto del gen *VvMybA1* de vid activa la expresión de la UDP-glucosa flavonoid 3-O-glucosyltransferasa (UFGT), que cataliza la transferencia de un motivo glucosyl a un antocianidina, llevando a la formación de antocianinas estables en células no pigmentadas (Li y col., 2010), lo que puede ser utilizado como rasgo cualitativo en eventos de transformación.

En el laboratorio se desarrolló una construcción intragénica que posee, en el vector binario pMF1, el promotor del gen que codifica para la ubiquitina de vid (*VvUbi*) flanqueado por los sitios de restricción *Ascl* y *PmeI*, luego la secuencia codificante del gen *VvMybA1*, y el terminador del mismo gen (*pMF1-pVvUbi::VvMybA1*) (Figura 9).



Figura 9. Construcción para intragenia en vid en el vector binario pMF1 (*pMF1-pVvUbi::VvMybA1*). Los sitios de restricción permiten reemplazar las secuencias originales por secuencias de interés.

Con el fin de que el promotor de *VvTMT2* controle la expresión del gen reportero *VvMybA1* en la construcción intragénica, se diseñaron partidores específicos para la amplificación de 1,8Kb de la secuencia del pVvTMT2 adicionando los sitios de restricción para las enzimas *AscI* (GGCGCGCC) y *PmeI* (GTTTAAAC) en el extremo 5' del partidor directo y reverso respectivamente (Tabla 1). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95°C 5 min, 30 ciclos de 95°C 30s, 57°C 30s y 72°C 2:10 min, y 10 min a 72°C. El producto de PCR se observó mediante electroforesis en geles de agarosa 1,5%.

El producto de PCR fue clonado posteriormente en el vector pGEM-T® Easy (Promega®), resultando la construcción *pGEM-T-pVvTMT2*. La reacción de ligación estándar consistió en 5µL de Buffer de ligación 2x, 1µL de vector pGEM-T® Easy, 3µL de producto de PCR y 1µL de T4 DNA ligasa (3 U/µl). La reacción se incubó toda la noche a 4°C. Luego, se transformaron bacterias *Escherichia coli* cepa DH5-α quimiocompetentes. Para esto, las bacterias se pusieron en hielo y se agregaron 10µL de reacción de ligación. Luego, se dejaron en hielo por 30 min. Una vez transcurrido el tiempo se realizó un shock térmico por 1:30 min a 42°C y se transfirieron las bacterias inmediatamente a hielo. Se agregaron 500µL de medio LB líquido y las bacterias se incubaron a 37°C por 1hr con agitación a 180rpm. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 6000rpm por 3 min, se eliminaron 400µL de sobrenadante y se resuspendió el pellet obtenido. Finalmente, se plaqueó en forma de césped en LB Agar suplementado con Ampicilina (100mg/mL), IPTG y X-Gal (20mg/mL). Las placas se incubaron a 37°C toda la noche.

Para confirmar la presencia del inserto en el vector, se seleccionaron colonias blancas, en las cuales el gen *LacZ* del vector pGEM-T se encuentra interrumpido por el inserto. Luego, estas se crecieron en 3mL de medio LB líquido con antibiótico de

selección (Ampicilina, 100mg/mL) toda la noche a 37°C. Luego, se procedió a aislar el plásmido usando el sistema AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit (AxyGen®). Posteriormente, se realizó una reacción de PCR con los partidores universales M13 (Tabla 1) que flanquean el inserto de interés en el vector pGEM-T® Easy. El programa de PCR fue el siguiente: 95° C por 5min, 35 ciclos de 95°C por 30s, 55°C por 30s y 72°C por 1min y 72°C por 10min. Finalmente, se enviaron 15µL de plásmido a secuenciación, con los partidores universales M13 y un partididor interno: VvHT6int-F: 5'-TGAGGTTTAAGAACCCTAGC-3' a Macrogen Inc© (<http://dna.macrogen.com/eng/>). Las secuencias recibidas se analizaron utilizando el software Vector NTI Advance 11.0 (Invitrogen®), que incluye un programa para la construcción de contigs (ContigExpress) y otro para el alineamiento de secuencias (AlignX).

Una vez confirmada la presencia del inserto por secuenciación, se procedió a la digestión enzimática de la construcción *pGEM-T-pVvTMT2* con las enzimas de restricción *Ascl* y *PmeI*. La digestión se realizó con ambas enzimas de forma simultánea. Así, la mezcla de reacción consistió en: 1µL de cada enzima (*Ascl* y *PmeI*, 10000 U/mL), 2µL de Buffer 10X, 0,5µL de BSA (10mg/mL), 8µL de H₂O MQ y 8µL de vector *pGEM-T-pVvTMT2*, con un volumen total de 20µL. Las muestras se incubaron durante 4 horas a 37°C para luego inactivar la reacción a 65°C por 20min. La digestión se observó en un gel de agarosa al 1,5% y se procedió a aislar la banda del tamaño requerido (2Kb) utilizando el sistema comercial Gel/PCR Purification Mini Kit (Favorgen®).

Posteriormente, se digirió el vector *pMF1-pVvUbi::VvMybA1* con las mismas enzimas y el protocolo previamente mencionado, para luego aislar la banda correspondiente al vector *pMF1* sin el promotor (14100pb). Como el tamaño de la banda es mayor, se utilizó el sistema QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen ®). Una vez

aislados ambos fragmentos, se procedió a su ligación mediante el siguiente protocolo: 5µL de vector *pMF1*, 15µL de fragmento *pVvTMT2*, 3µL de enzima T4 DNA ligasa (3U/mL) (Promega®) 3µL de Buffer 10X (Promega®) y 4µL de H₂O MQ para un total de 30µL. La reacción se dejó a 4°C toda la noche y posteriormente se procedió a la transformación de bacterias *Escherichia coli* DH5-α quimiocompetentes. Las bacterias transformadas se plaquearon en medio LB suplementado con Kanamicina (50mg/mL). Al día siguiente se seleccionaron colonias, las que se cultivaron en 3mL de medio LB líquido, como se mencionó anteriormente. Finalmente, se purificó el plasmidio y se realizó un PCR con los partidores para el gen *VvMybA1* y los partidores internos del promotor *VvHT6int2* (Tabla 1). Las condiciones de PCR en ambos casos fueron: 95°C 5 min, 30 ciclos de 95°C 30s, 56°C 30s y 72°C 1 min, y 10 min a 72°C. El producto de PCR se observó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%. Los plasmidios aislados que resultaron positivos se enviaron a secuenciación en MacroGen Inc. con los partidores *pVvTMT2-F* y *pVvTMT2-R* (tabla 1) y los mismos partidores internos utilizados anteriormente. De la misma forma anterior, el análisis de secuencias se realizó con el programa Vector NTI Advance 11.0 (Invitrogen®).

3. RESULTADOS

3.1. Medición de contenido de azúcares solubles (°Bx).

Se recolectaron muestras de fruto de vid cv. Cabernet Sauvignon en distintos estadios del desarrollo. Se escogieron 3 estadios específicos: Bayas inmaduras (E-31), en pinta (E-35) y maduras (E-38) (Ver Materiales y Métodos). A éstas, se les midió la concentración de azúcares solubles (°Bx). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la concentración de azúcar entre todos los estadios analizados, observándose un aumento progresivo en el tiempo en la presencia de azúcares solubles conforme avanza la maduración (Figura 10). Esto va en concordancia con lo descrito en la literatura (Coombe y col., 1995) donde se muestra que poco antes de la pinta comienza un importante incremento en los niveles de azúcar en el mesocarpo.

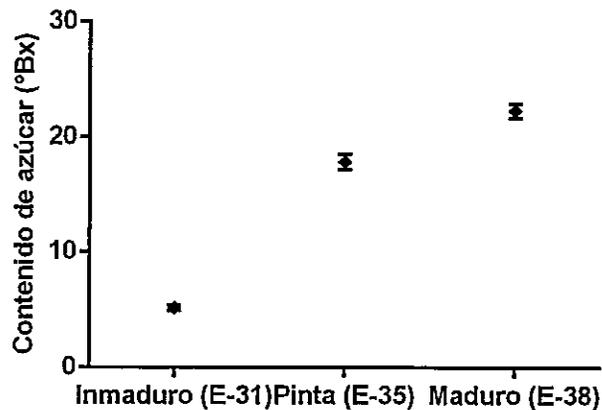


Figura 10. Medición del contenido de azúcares solubles (°Bx) en el mesocarpo de bayas de vid en desarrollo. Se observa un aumento sostenido de la concentración de azúcares solubles en las bayas medidas.

3.2. Evaluación de la expresión del gen *VvTMT2* en el desarrollo del fruto.

Se evaluó la acumulación de transcrito del gen *VvTMT2* en los tres estadios seleccionados del desarrollo del fruto de *Vitis vinifera* cv. 'Cabernet Sauvignon' mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR). La curva de calibración entregó una eficiencia de un 98% y una pendiente de -3,3 para los partidores diseñados (qVvHT6), lo que permite su utilización en la reacción de qRT-PCR (Stratagene ©, 2004).

Se observa un aumento significativo ($p < 0,05$) de la expresión del gen *VvTMT2* comparando el estadio inmaduro con los otros dos estadios del desarrollo, donde el máximo de abundancia de transcrito se observó en pinta y una leve, pero significativa ($p < 0,05$), disminución en estadio maduro (Figura 11). Estos resultados confirman el patrón de expresión de *VvTMT2* descrito en otros trabajos en los que se utilizaron técnicas de expresión global (Macro y microarreglos) (Afoufa-Bastien y col., 2010 y Deluc y col., 2007). Adicionalmente, se observa una concordancia entre el aumento de la expresión y el aumento de la concentración de azúcares solubles en el mesocarpo. Sin embargo, se observa que a altas concentraciones de azúcar (alrededor de 22°Bx), ocurre una leve disminución de la expresión de este gen, como ya se había observado en trabajos anteriores (Deluc y col., 2007) (Figura 10 y 11).

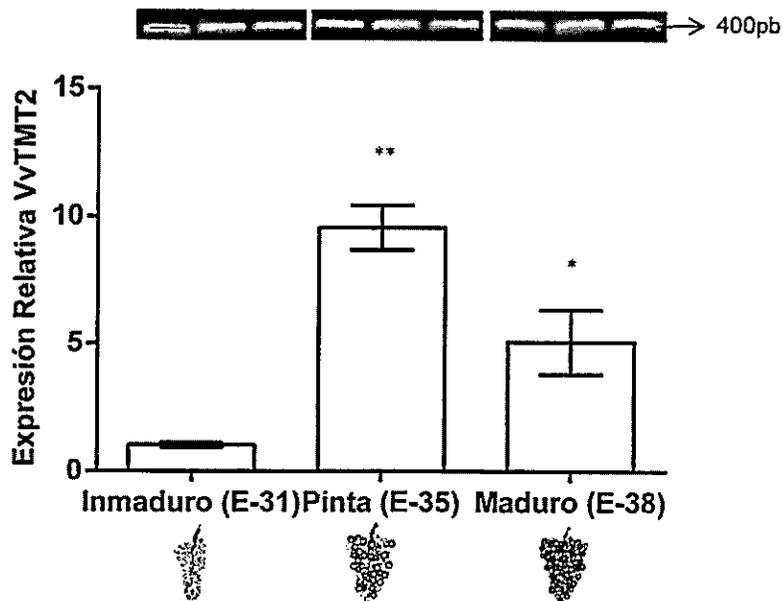
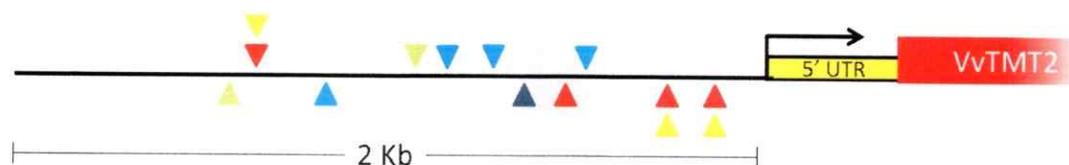


Figura 11. Expresión relativa de *VvTMT2* durante el desarrollo en bayas de vid. Se observa un aumento significativo de la expresión en pinta (E-35). Arriba, se observa el análisis de integridad del cDNA por medio de PCR con los partidores *VvG3PDH*.

3.3. Análisis *in silico* de *pVvTMT2*

Se realizó un análisis *in silico* de la secuencia de 2Kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *VvTMT2*. Esto, mediante herramientas bioinformáticas desarrolladas en nuestro laboratorio (Ver Materiales y métodos). Se encontró que la secuencia promotora del gen *VvTMT2* (*pVvTMT2*) posee varios sitios reconocidos como elementos *cis* de regulación por azúcar (Tabla 2). Asimismo, se observa que muchos de estos se encuentran repetidos varias veces dentro de la secuencia analizada (Figura 12, Tabla 3). Cabe destacar que se encontraron tanto sitios de regulación positiva (SURE1 y Wbox), como sitios de regulación negativa (AMYBOX1, MYBGAHV, PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A) (Atanassova y col., 2003).



- ▲ AMYBOX1 (TAACA[AG]A) Inducción en inanición
- ▲ SURE1 (AATAGAAAA) Inducción por azúcar
- ▲ MYBGAHV (TAACAAA) Represión por azúcar
- ▲ WBOX (TGACT) Inducción por azúcar
- ▲ PYRIMIDINEBOX (CCTTTT) Represión por azúcar

Figura 12. Representación esquemática de los elementos *cis* de regulación por azúcar en los 2Kb de la secuencia promotora del gen *VvTMT2*. Los triángulos representan la posición aproximada de cada sitio.

Tabla 3. Sitios de regulación por azúcar presentes en la secuencia promotora del gen *VvTMT2*. El símbolo (*) Indica cuales de estos sitios son significativos, de acuerdo al análisis estadístico ($p < 0,05$).

Nombre	N° Repeticiones		Razón	p-value	Ubicación en la secuencia <i>pVvTMT2</i>
	<i>pVvTMT2</i>	Secuencias al azar			
AMYBOX1 *	4	0,34	11,76	0,00069	(+) -1312; (-) -476, -205, -133
MYBGAHV *	3	0,17	17,65	0,00042	(+) -1312; (-) -205, -133
SURE1 *	1	0,05	20,00	0,00172	(+) -604
PYRIMIDINEBOX *	4	0,04	100,00	0	(+) -771, -676, -424; (-) -1262
Wbox	2	0,92	2,17	0,28	(+) -879; (-) -1352

3.4. Clonamiento del promotor *pVvTMT2* en vector binario *pMF1*

Posterior al análisis *in silico* se procedió al clonamiento de la secuencia promotora completa del gen *VvTMT2* (*pVvTMT2*). Se buscó ingresar el promotor de interés en una construcción intragénica específica para vides desarrollada en nuestro laboratorio. Ésta contiene originalmente, en el vector binario *pMF1*, el promotor del gen que codifica para la Ubiquitina de vid (*VvUbi*), seguido por la región codificante del gen *VvMybA1* y finalmente el terminador del mismo gen (Figura 9).

Como se mencionó en materiales y métodos, los partidores para el clonamiento de la secuencia *pVvTMT2* deben poseer, en su extremo 5', los sitios de restricción *AscI* y *PmeI* en los partidores directo y reverso respectivamente. Como resultado del diseño óptimo de los partidores, fue posible la amplificación de 1789pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción mediante PCR, utilizando DNA genómico obtenido de hojas adultas de *Vitis vinifera* cv. 'Cabernet Sauvignon' como templado (Figura 13A).

A pesar de que el largo del amplificado es menor al del promotor completo (2Kb) fue posible conservar todos los elementos *cis* de regulación por azúcar de interés (Figura 11), puesto que todos ellos se encuentran ubicados bajo los 1.8Kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción. A partir del producto de PCR, se obtuvieron clones en el vector pGEM-T® Easy (*pGEM-T-pVvTMT2*), los que se analizaron por PCR con los partidores M13 (Figura 13B) y mediante secuenciación (Figura 14).

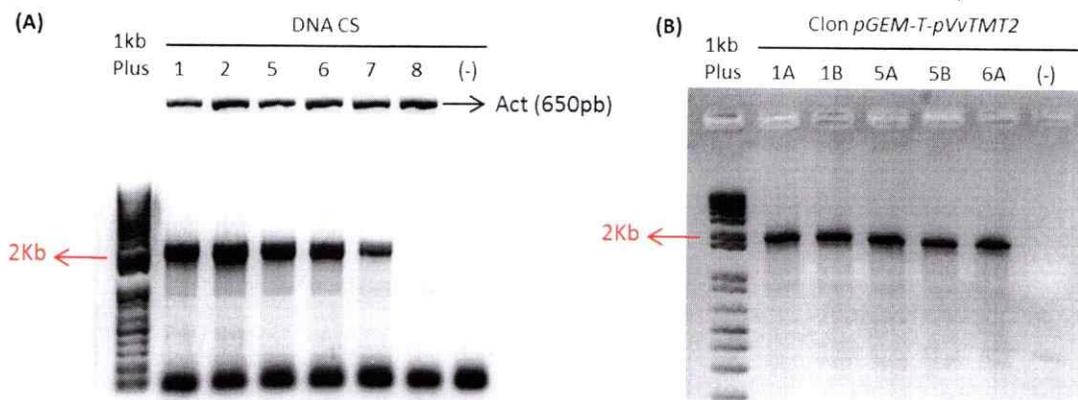


Figura 13. Clonamiento en pGEM-T® Easy. A) Amplificación por PCR de la secuencia *pVvTMT2* con los partidores *pVvTMT2* -F y -R a partir de DNA genómico de vid extraído de hojas (Muestras 1, 2, 5, 6, 7 y 8). Arriba se observa el gel de agarosa correspondiente al análisis de integridad del DNA. B) Análisis de colonias *pGEM-T-pVvTMT2* con partidores universales M13 (Colonias nombradas 1A, 1B, 5A, 5B, 6A). Estos flanquean el inserto *pVvTMT2* en el vector pGEM-T® Easy. El producto esperado tiene un tamaño aproximado de 2Kb.

Finalmente, se obtuvieron 5 clones (*pVvTMT2*-1A, -1B, -5A, -5B y -6A) con alta similitud con la secuencia depositada en la base de datos Genoscope, correspondiente a la de la variedad vinífera 'Pinot noir' ® (alrededor de un 97%). Sólo se aprecian pequeñas diferencias en algunas bases puntuales, presentes en los clones y no en la secuencia de la base de datos, y algunas discordancias entre los mismos clones, producto del proceso de clonamiento (Figura 14). Sin embargo, no se ven afectados los elementos *cis* de regulación por azúcar encontrados por análisis *in silico*. Cabe señalar que los clones 1A y 1B poseen la misma secuencia, por lo que experimentos posteriores se realizaron considerando solo el clon 1A (Ver Anexo 1).

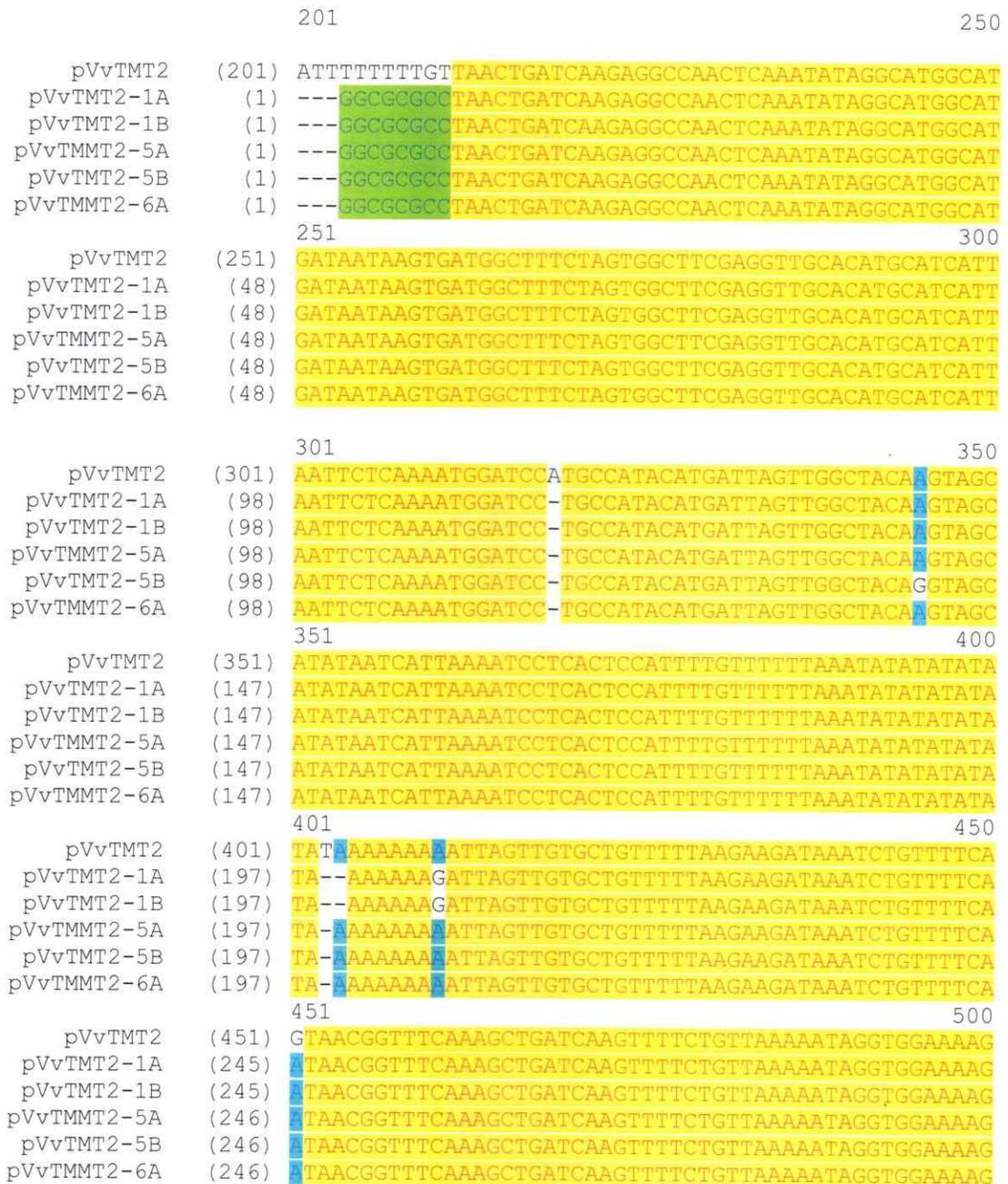


Figura 14. Primeras 200pb del alineamiento de los clones obtenidos y el promotor de la base de datos (pVvTMT2). Se observa el sitio de restricción *AscI* (verde) y las diferencias entre las secuencias (celeste). El alineamiento se realizó con el programa AlignX de Vector NTI 11.0 (Invitrogen®). Ver Anexo 1.

Luego, se procedió con el clonamiento en el Vector binario *pMF1*. Para esto, se realizaron cortes de restricción a los vectores *pGEM-T-pVvTMT2-1A*, *-5A*, *-6A* y *-6B* (Figura 15A) y al vector *pMF1* (Figura 15B) con las enzimas *AscI* y *PmeI*. Se continuó con la ligación y la transformación de bacterias *E. coli* quimiocompetentes (Materiales y Métodos).

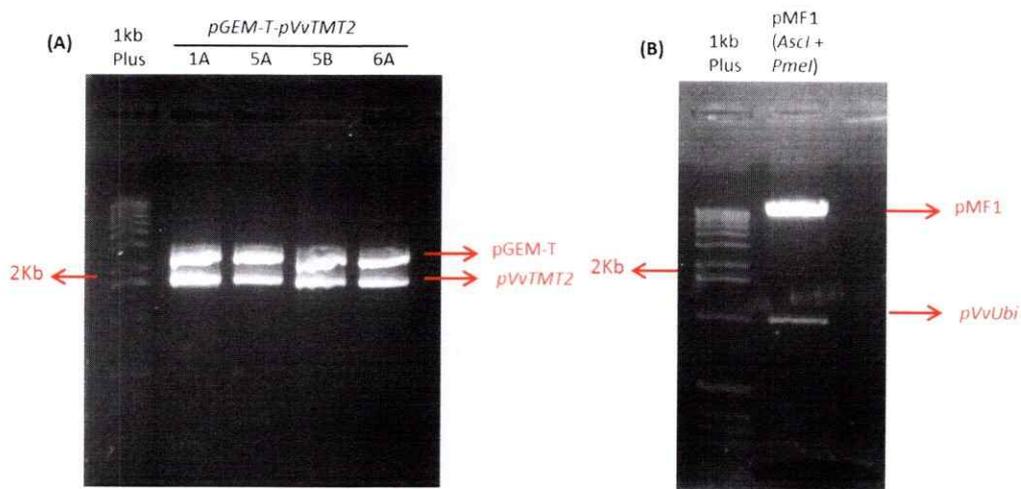


Figura 15. Cortes de restricción con las enzimas *AscI* y *PmeI* a los clones *pGEM-T::pVvTMT2* (A) y al vector *pMF1* con el promotor del gen que codifica para la ubiquitina (*VvUbi*) (B). Posteriormente, se procede al aislamiento de las bandas *pVvTMT2* y *pMF1* y su ligación.

En este procedimiento, sólo fue posible obtener colonias de bacterias transformadas con el constructo *pMF1-pVvTMT2-1A*, las que fueron analizadas mediante PCR y secuenciación. Entre las colonias evaluadas, se encontraron varios clones del promotor con secuencias de distintos largos, entre 1730pb (*pMF1-pVvTMT2-1A* (clon 42)) y 1749pb (*pMF1-pVvTMT2-1A* (clon 34) y *pMF1-pVvTMT2-1A* (clon 36)). Se realizó análisis por PCR con los partidores *VvMybA1* y los partidores

internos VvHT6int2 (Figura 16). En la secuenciación, se observó que el sitio de restricción *AscI* y una cantidad de pares de bases variable se perdieron en todos los clones evaluados (Figura 17). Ante esto, se procedió a evaluar la presencia de los elementos *cis* de regulación de interés en los distintos clones, observándose que ninguno de estos se perdió en el proceso de clonamiento.

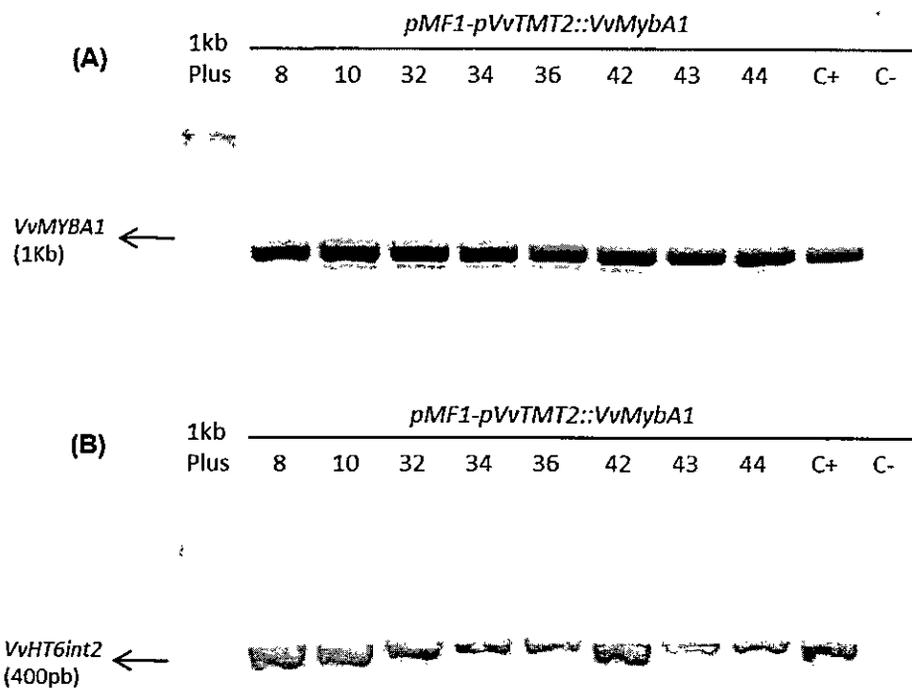


Figura 16. Análisis mediante PCR de construcción final *pMF1-pVvTMT2::VvMybA1* A) Utilizando partidores VvMybA1 (1Kb). B) Utilizando partidores VvHT6int2 (400pb).

		1	40
pVvTMT2-1A	(1)	GGCGCGCC	TAAGTACTGATCAAGAGGCCAACTCAAATATAGGC
PMF:pVvTMT2-1A (36)	(1)	-----	-----
PMF:pVvTMT2-1A (34)	(1)	-----	-----
PMF:pVvTMT2-1A (42)	(1)	-----	-----
PMF:pVvTMT2-1A (43)	(1)	-----	-----
PMF:pVvTMT2-1A (44)	(1)	-----	-----
		41	80
pVvTMT2-1A	(41)	ATGGCATGATA	ATAAGTGATGGCTTTCTAGTGGCTTCGAG
PMF:pVvTMT2-1A (36)	(1)	-----	ATAAGTGATGGCTTTCTAGTGGCTTCGAG
PMF:pVvTMT2-1A (34)	(1)	-----	ATAAGTGATGGCTTTCTAGTGGCTTCGAG
PMF:pVvTMT2-1A (42)	(1)	-----	ATAAGTGATGGCTTTCTAGTGGCTTCGAG
PMF:pVvTMT2-1A (43)	(1)	-----	ATAAGTGATGGCTTTCTAGTGGCTTCGAG
PMF:pVvTMT2-1A (44)	(1)	-----	ATAAGTGATGGCTTTCTAGTGGCTTCGAG
		81	120
pVvTMT2-1A	(81)	GTTGCACATGCA	CATTAATTCCTCAATGGATCCTGCCA
PMF:pVvTMT2-1A (36)	(30)	GTTGCACATGCA	CATTAATTCCTCAATGGATCCTGCCA
PMF:pVvTMT2-1A (34)	(30)	GTTGCACATGCA	CATTAATTCCTCATTTGGATCCTGCCA
PMF:pVvTMT2-1A (42)	(30)	GTTGCACATGCA	CATTAATTCCTATA-TGGATCCTGCCA
PMF:pVvTMT2-1A (43)	(30)	GTTGCACATGCA	CATTAATTCCTATA-TGGATCCTGCCA
PMF:pVvTMT2-1A (44)	(26)	GTTGCACATGCAC	CATTAATTCCTATA-TGGATCCTGCCA
		121	160
pVvTMT2-1A	(121)	TACATGATTAGTTGGCTACAAGTAGCATATAATCATTAAA	
PMF:pVvTMT2-1A (36)	(70)	TACATGATTAGTTGGCTACAAGTAGCATATAATCATTAAA	
PMF:pVvTMT2-1A (34)	(70)	TACATGATTAGTTGGCTACAAGTAGCATATAATCATTAAA	
PMF:pVvTMT2-1A (42)	(69)	TACATGATTAGTTGGCTACAAGTAGCATATAATCATTAAA	
PMF:pVvTMT2-1A (43)	(69)	TACATGATTAGTTGGCTACAAGTAGCATATAATCATTAAA	
PMF:pVvTMT2-1A (44)	(65)	TACATGATTAGTTGGCTACAAGTAGCATATAATCATTAAA	
		161	200
pVvTMT2-1A	(161)	ATCCTCACTCCATTTGTTTTTTAAATATATATATATAAAA	
PMF:pVvTMT2-1A (36)	(110)	ATCCTCACTCCATTTGTTTTTTAAATATATATATATAAAA	
PMF:pVvTMT2-1A (34)	(110)	ATCCTCACTCCATTTGTTTTTTAAATATATATATATAAAA	
PMF:pVvTMT2-1A (42)	(109)	ATCCTCACTCCATTTGTTTTTTAAATATATATATATAAAA	
PMF:pVvTMT2-1A (43)	(109)	ATCCTCACTCCATTTGTTTTTTAAATATATATATATAAAA	
PMF:pVvTMT2-1A (44)	(105)	ATCCTCACTCCATTTGTTTTTTAAATATATATATATAAAA	

Figura 17. Alineamiento de clones *pMF1-pVvTMT2-1A*. En verde se destaca el sitio de restricción *AscI*. La secuencia subrayada corresponde al partidor *pVvTMT2-F*. En todos los clones se pierden aproximadamente 50pb de la secuencia de 1800pb de bases inicial, quedando promotores de 1749pb. En el resto de la secuencia no se observan diferencias con los clones en pGEM-T (Anexo 1).

En consecuencia, se obtuvo el vector *pMF1-pVvTMT2::VvMybA1* (Figura 18) que posee el promotor del gen *VvTMT2* con todos los elementos *cis* de regulación por azúcar encontrados en el análisis *in silico*. Ésta construcción nos permitirá evaluar el efecto de distintas concentraciones de azúcar en la actividad del promotor *pVvTMT2* mediante el efecto en la expresión del reportero *VvMybA1*.

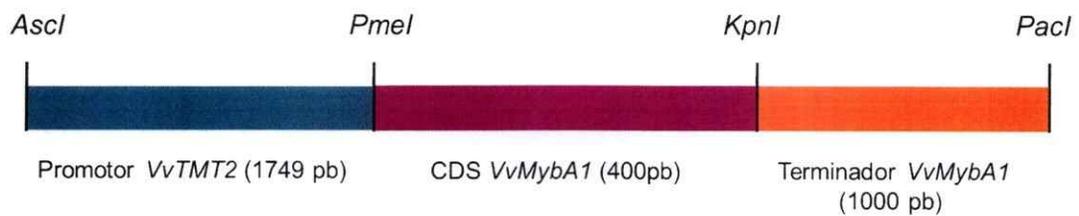


Figura 18. Construcción intragénica *pMF1-pVvTMT2::VvMybA1*. Ésta contiene 1749pb del promotor del gen *VvTMT2* que controlan la expresión del gen *VvMybA1* que se utiliza como gen reportero.

4. DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

El patrón doble sigmoideo característico del desarrollo del fruto de vid resulta de la sucesión de dos periodos de crecimiento vacuolar (Figura 1). En el primer periodo, que ocurre durante la Fase I, las bayas son duras y verdes y acumulan una cantidad considerable de ácidos orgánicos. Luego, en el estadio pinta, cuando las bayas se ablandan y toman color, comienza la síntesis de compuestos aromáticos y la acumulación de azúcar. Esto resulta en un segundo periodo de crecimiento conocido como maduración (Terrier y col., 2005).

En el transcurso de la maduración, los azúcares, principalmente monosacáridos (glucosa y fructosa) resultantes del procesamiento de la sacarosa, se almacenan de forma masiva en la vacuola (Deluc y col., 2007) alcanzando concentraciones de hasta 1M cada uno (Agasse y col., 2009). En este proceso, los transportadores del tonoplasto juegan un rol muy relevante, ya que son los responsables del movimiento de monosacáridos desde el citoplasma al interior de la vacuola (Figura 19). Por lo tanto, el patrón de expresión de estos transportadores durante todo el proceso de desarrollo del fruto nos da una idea de cómo y en qué momento ocurre la acumulación de azúcares al interior de las células del mesocarpo.

Éste patrón de expresión está controlado por la actividad de los promotores de aquellos genes que codifican por transportadores, los que poseen elementos de regulación que activan o reprimen la expresión bajo condiciones específicas. Estos elementos, como los sitios de regulación por azúcares, cumplen un papel no sólo en la regulación de la expresión génica de los transportadores en términos de nivel de actividad, sino que también posiblemente en la respuesta específica vía control combinatorio, en conjunto con otros elementos de regulación (hormonales, proteicos,

etc) (Afoufa-Bastien y col., 2010). Por otra parte, existe clara evidencia de que, además de su rol como fuente de carbono y energía para la planta, los azúcares pueden actuar como moléculas señal reguladoras de la expresión de ciertos genes (Conde y col., 2006).

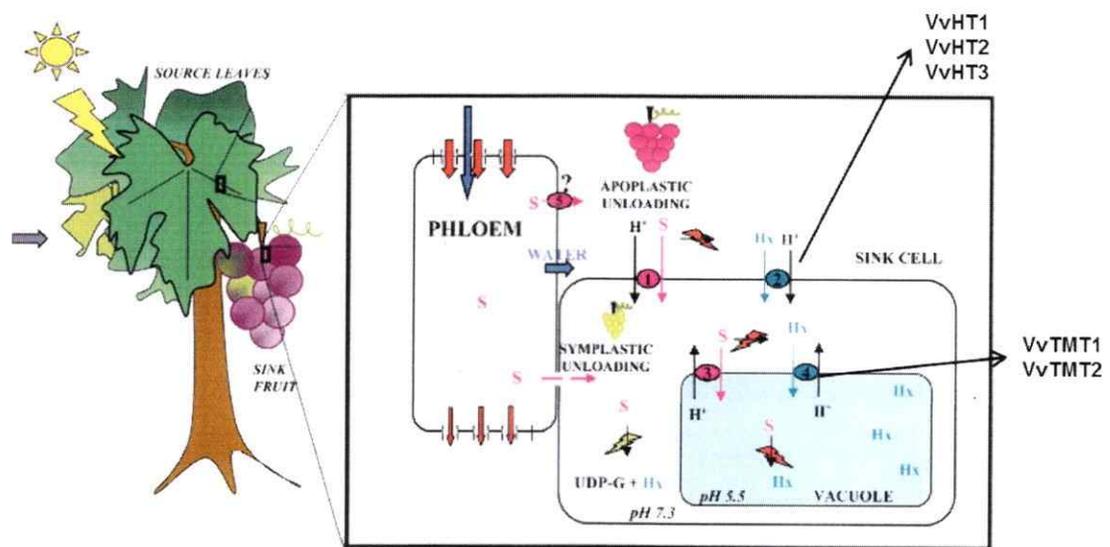


Figura 19. Esquema del transporte de azúcar en células del fruto de vid a través del desarrollo. Se muestran los tipos de descarga (apoplástica y simplástica) y los distintos tipos de transportadores. En rosado, transportadores de sacarosa (S) y en azul, transportadores de hexosas (Hx). Se mencionan los transportadores de hexosa que se expresan en el desarrollo del fruto, tanto en membrana plasmática (VvHTs), como en tonoplasto (VvTMTs) (modificado de Agasse y col., 2009).

4.1. Patrón de expresión de *VvTMT2* y su relación con los niveles de azúcar ([°]Bx) en bayas en desarrollo.

En este Seminario de Título se buscaron y analizaron evidencias sobre la posible regulación por azúcares del putativo transportador de monosacáridos de *Vitis vinifera VvTMT2 (VvHT6)*. Esto, con el fin de confirmar si la expresión de este gen y, por ende, la actividad de su promotor se podría inducir en presencia de azúcares. Este gen posee alta similitud de secuencia con el putativo transportador de monosacáridos *TMT2* descrito recientemente en *Arabidopsis thaliana* (Wormit y col., 2006) y, según estudios de expresión global (Deluc y col., 2007 y Afoufa-Bastien y col., 2010), se expresaría a partir de la pinta y durante toda la maduración del fruto. Además, se presume su localización en el tonoplasto dado la presencia de un péptido señal y un sitio de corte entre los residuos 19 y 20 encontrado mediante SignalP 3.0 (Zeng y col., 2010) y debido a que está comprobado que sus ortólogos en *Arabidopsis* y arroz se ubican en el tonoplasto (Wormit y col., 2006, Cho y col., 2010).

Como primera aproximación, se midió mediante la técnica de qRT-PCR, la expresión del gen del transportador *VvTMT2* durante el desarrollo del fruto de vid. Se analizaron 3 estadios claves del desarrollo: Estadio inmaduro (E-31), en pinta (E-35) y maduro (E-38), los que difieren significativamente en el contenido de azúcar de las células del fruto.

En la Figura 11 se observa que en el estadio pinta hay un máximo de acumulación de transcrito del gen *VvTMT2*, en comparación con el resto de los estadios analizados. Luego, la expresión disminuye levemente en estadio maduro. Con esto, finalmente se corrobora lo descrito en estudios previos de expresión global (Deluc

y col., 2007 y Afoufa-Bastien y col., 2010), en los que se observó que efectivamente la expresión de este gen tiene un máximo en estadio pinta.

Con este primer resultado podemos confirmar lo visto en estudios anteriores (Figura 4, Deluc y col., 2007) con una técnica más precisa como lo es el qRT-PCR, lo que además nos permite verificar las siguientes observaciones: 1) *VvTMT2* cumpliría un papel muy importante al inicio de la maduración (pinta) y a lo largo de toda la fase 3, debido a sus altos niveles de expresión durante este periodo (Agasse y col., 2009); y 2) si correlacionamos esto con la concentración de azúcares solubles encontrada en las bayas analizadas (Figura 10), vemos que el aumento inicial en los grados Brix en bayas en estadio pinta, coincide con el fuerte incremento de la cantidad de transcrito en el mismo estadio. Sin embargo, una mayor concentración de azúcar (°Bx) en estadio maduro coincide con una disminución leve en la expresión del gen en estudio (Deluc y col., 2007). Por otro lado, se ha observado que la expresión de todos los *VvTMTs* es débil en todos los órganos vegetativos, los cuales no acumulan grandes cantidades de azúcar. En cambio, la expresión tanto del gen *VvTMT1* como de *VvTMT2* es alta en el fruto que recibe grandes cantidades de azúcar producto de la fotosíntesis (Afoufa-Bastien y col. 2010). Este antecedente, en conjunto con los resultados obtenidos, permite sugerir que el azúcar cumple un rol activo como molécula señal en la regulación transcripcional de la expresión de este gen.

Como se mencionó anteriormente, se ha observado que el azúcar, además de participar en el metabolismo celular, posee un rol importante como molécula señal, afectando, entre otros, la transcripción de genes mediante vías de señalización que activan o inhiben la actividad del promotor del gen en cuestión (Rolland y col., 2006). Por lo tanto, el posible efecto del azúcar como señal reguladora sobre la expresión de

VvHT6 podría explicarse por la presencia de sitios de regulación por azúcar en la región promotora.

4.2. Análisis *in silico* de pVvTMT2

La presencia de elementos de regulación por azúcar en la secuencia promotora del gen VvTMT2 (pVvTMT2) nos daría una aproximación inicial acerca del posible efecto que tendrían los azúcares sobre su expresión. Ante esto, como siguiente paso se realizó un análisis *in silico* de la secuencia pVvTMT2 utilizando un programa bioinformático desarrollado en nuestro laboratorio.

En general, en el análisis se considera la presencia de la secuencia específica del sitio de regulación de interés (Ver Tabla 2) en comparación con 10000 secuencias generadas al azar. Estas últimas se generan automáticamente considerando la composición del genoma de *Vitis vinifera* depositada en la base de datos de Genoscope®. El p-value final, obtenido mediante análisis estadístico, se obtiene a partir de la Distribución de Poisson.

En Teoría de Probabilidad y Estadística, la Distribución de Poisson es una distribución de probabilidad discreta que expresa la probabilidad de cierto número de eventos en un intervalo de tiempo y/o espacio. Ésta se ha utilizado previamente en el análisis de secuencias de DNA para encontrar la probabilidad de ocurrencia de motivos (o "palabras") en una secuencia dada con baja frecuencia (Schbath, 1995). El p-value nos da una estimación de la significancia de los datos (Pape y col., 2008). Por lo tanto, según el método utilizado, a un p-value menor, existe mayor seguridad de que el sitio encontrado en la secuencia esté lejos de lo

predicho por el azar y en consecuencia corresponda a un sitio cuya presencia en la secuencia analizada es significativa.

En este análisis se encontraron varios sitios descritos previamente como de regulación por azúcar presentes en la secuencia *pVvTMT2* de manera significativa (Tabla 2). Se identificaron sitios que inducen la expresión en presencia de azúcar: SURE 1 (Grierson y col., 1994); un sitio que se activa en condición de inanición de azúcar: AMYBOX1 (Hwang y col., 1998); y sitios que reprimen la expresión en presencia de este sustrato: MYBGHV y PYRIMIDINEBOX 1 (Morita y col., 1998; Mena y col., 2002) (Ver Figura 13 y tabla 3). Estos resultados son coherentes por lo descrito previamente en la literatura (Afoufa-Bastien y col., 2010).

En la publicación de Afoufa-Bastien y col. (2010) se realizó una búsqueda de elementos *cis* de regulación en la secuencia promotora de 29 genes secuenciados pertenecientes a las cuatro familias más estudiadas de genes de transportadores de azúcar (*VvSUC/SUT*, *VvHT*, *VvTMT* y *VvPMT*) usando la base de datos PLACE (PLAnt Cis acting regulatory DNA Elements). Se reportó la presencia de los mismos sitios de regulación por azúcar en el promotor del gen *VvHT6* (*VvTMT2*) que encontramos en nuestro análisis (SURE1, AMYBOX1, MYBGHV, PYRIMIDINEBOX 1 y WBox) (Tabla 3). Sin embargo, se observan diferencias en el número de repeticiones de estos sitios en la secuencia analizada. Estas diferencias se explican, principalmente, por la secuencia considerada para la búsqueda. En el análisis realizado en este seminario de título se consideran 2000pb río arriba a partir del sitio de inicio de la transcripción, mientras que en el análisis realizado en la literatura se consideran 2000 pares de bases a partir del sitio de inicio de la traducción (ATG). Es decir, en el trabajo previo, se considera la

secuencia del 5'UTR. Es por esta razón que los sitios encontrados, y el número de repeticiones de cada uno de ellos, pueden diferir.

Por otro lado, si se realiza el mismo análisis ingresando la secuencia pVvTMT2 considerada en este trabajo, en la base de datos PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) se obtienen los mismos resultados que con el programa utilizado en este estudio. Sin embargo, este último posee la ventaja de que constituye una herramienta específica que considera la composición del genoma de *Vitis vinifera* y que, además entrega los datos utilizando una interfaz mucho más amigable, ilustrativa e informativa. Además, permite filtrar los datos según el objetivo del análisis a realizar. Por ejemplo, se pueden buscar específicamente los elementos reconocidos como de regulación por azúcares, hormonas, luz, etc. De esta forma se evita investigar la función de cada elemento por separado.

Otra gran ventaja del método utilizado es el análisis estadístico que entrega (p-value), análisis que PLACE no realiza. Un importante ejemplo es que, si observamos los resultados de la tabla 3, se aprecia que por ejemplo el sitio W-Box posee un p-value muy alto ($p > 0,05$) en comparación con el resto de los sitios encontrados, por lo que ésta secuencia en particular (TGACT) se encuentra con mayor probabilidad en secuencias generadas al azar, lo que hace que el resultado no sea significativo y sea menos probable que se encuentre en la secuencia analizada (pVvTMT2) por un proceso no azaroso. Mientras, los p-values entregados para los demás sitios encontrados (AMYBOX1, MYBGAHV, PIRYMIDINEBOX, SURE1) son mucho menores (cerca de cero), por lo que la

probabilidad de que estas secuencias no se encuentren por azar en la secuencia analizada es mucho más alta.

Como se mencionó anteriormente, el patrón de expresión de *VvTMT2* observado por qRT-PCR sugiere un efecto de la concentración de azúcar en la acumulación de transcrito. Como era de esperarse, se encontraron secuencias que responden de distinta forma a la presencia o ausencia de azúcares (SURE 1, AMYBOX1, MYBGAHV y PIRYMIDINEBOX). Estos resultados darían un primer acercamiento a la explicación de porqué el aumentar la concentración de azúcares durante la maduración se observa una leve disminución de la expresión. Se postula que estos sitios estarían causando un efecto dual, tal como ocurre con el promotor de *VvHT1*, en el cual altos niveles de glucosa aumentan la transcripción, mientras que bajas concentraciones de este monosacárido, activan la acumulación de transcrito. Sin embargo, los resultados obtenidos en este seminario no son concluyentes. Se deben realizar experimentos más precisos que permitan confirmar que existe un control de la expresión de este transportador por parte de azúcares, ya sea sacarosa, glucosa o fructosa. Ante esto es importante, en primer lugar tener un vector que contenga este promotor, con un tamaño tal que incluya todos los sitios de regulación por azúcares encontrados en el análisis *in silico*.

4.3. Clonamiento del promotor de *VvTMT2* (pVvTMT2)

En el marco de este seminario de título se logró el clonamiento de 1749pb del promotor del gen *VvTMT2* (pVvTMT2), putativo transportador de monosacáridos de *Vitis vinifera*, obteniéndose la construcción final *pMF1-pVvTMT2::VvMybA1* (Figura 19).

En primer lugar, se observaron diferencias puntuales entre la secuencia de los clones obtenidos en pGEM-T (*pGEM-T-pVvTMT2*) y la secuencia de la base de datos (Figura 15, Anexo 1), las que podrían deberse principalmente a los cambios propios entre una variedad y otra (Pinot Noir vs. Cabernet Sauvignon). Sin embargo, los sitios de regulación de interés encontrados mediante el análisis *in silico* se conservan en ambos casos lo que da indicios de la función de estas secuencias, puesto que se sabe que secuencias altamente conservadas cumplirían un rol biológico importante mediante la unión de factores de transcripción (Freeling y col., 2009). Además, esto permite proyectar nuevos experimentos con las construcciones obtenidas, que permitirán probar la función de estos sitios de regulación.

En cuanto al proceso de clonamiento en sí, no se presentaron mayores inconvenientes en las fases iniciales. Aunque en un comienzo el objetivo era clonar íntegramente los 2000pb de la secuencia promotora analizada, se optó por obtener clones de 1789pb (1.8Kb-*pVvTMT2*). Esto principalmente por las características de los partidores diseñados. En particular, el partididor *pVvTMT2-F* presentaría características desfavorables, como bajo contenido GC y una diferencia de T_m mayor a 2°C al partididor *pVvTMT2-R*, si se hubiera diseñado alrededor de la posición -2000 de la secuencia del gen *VvTMT2*. Estas características irían en desmedro de la reacción de PCR y por ende de la obtención del fragmento final. El partididor que finalmente se utilizó (ver Tabla 1) presenta características favorables para el PCR a realizar y no altera la presencia de sitios de regulación de interés, razón por la cual se decidió tomar ésta alternativa.

Mayores dificultades se presentaron al integrar el fragmento 1.8Kb-*pVvTMT2* al vector binario *pMF1*. En primer lugar, al obtener colonias transformantes, muchas resultaron ser falsos positivos. Estos, si bien presentaban resistencia a Kanamicina, no amplificaban el inserto por PCR con los partididores internos *VvHT6int2*, lo que indica

que falló la ligación entre el clon y el vector digerido y este último, probablemente, se cerró sobre sí mismo.

Aquellas colonias que resultaron positivas por PCR fueron enviadas a secuenciación. En las secuencias recibidas se observó que el sitio de restricción *AscI* se perdió en el proceso, junto con aproximadamente 50pb (Ver Figura 18), resultando clones finales de alrededor 1750pb. Esto pudo deberse a un corte ineficiente del sitio de restricción *AscI* al extremo 5' del clon *pGEMT-pVvTMT2* o una ligación inespecífica (Chen y col., 2002). Ante esto, nuevamente se verificó la presencia de los sitios de regulación interés. Si estos se encuentran en la secuencia promotora obtenida, los resultados eventuales en experimentos posteriores no se verían alterados, por lo que el largo final del promotor no es problema mientras estos sitios se conserven.

Adicionalmente, se realizó un corte de restricción con la enzima *PmeI* confirmando la presencia de este sitio en el vector final *pMF1-pVvTMT2::VvMybA1* y además se efectuó un PCR con los partidores *VvHT6int2-F* y *VvMybA1-R*, corroborando que el promotor se encuentra en la posición correcta y seguido de la región codificante *VvMybA1* (datos no mostrados).

En este trabajo se obtuvieron varios clones de la secuencia *pVvTMT2*, los cuales contienen todos los sitios de regulación por azúcar encontrados mediante el análisis *in silico*. Con los resultados obtenidos hasta el momento esperamos que este promotor se active bajo ciertas condiciones. Específicamente, se espera que responda a concentraciones de azúcar específicas, debido a que como observamos, en la maduración, cuando la concentración de azúcar es muy alta, la expresión de *VvTMT2* disminuye levemente. Esto último, implica que el transportador *VvTMT2* cumple un papel importante al inicio de la pinta, que se suma a la tarea de los demás transportadores de monosacáridos descritos hasta el momento en vid.

4.4. Papel de *VvTMT2* en el desarrollo del fruto de vid

Como se mencionó anteriormente, durante el desarrollo del fruto de *Vitis vinifera* se acumulan monosacáridos a partir del estadio pinta, esencialmente en la vacuola. En este proceso existe una acción coordinada de transportadores de monosacáridos, en la membrana plasmática y en la vacuola, tal como se observa al analizar el patrón de expresión del conjunto de transportadores descritos hasta al momento (Figura 20).

Los monosacáridos resultantes de la hidrólisis de la sacarosa entran a las células del fruto en desarrollo especialmente gracias a los transportadores *VvHT1*, *VvHT2* y *VvHT3*. En la vacuola en cambio se ha descrito que durante Fase I y Fase *Lag* se expresa principalmente el gen del transportador *VvTMT1*, lo que sugiere que participa en suplir la demanda de hidratos de carbono de las células en división o en facilitar el subsecuente aumento de hexosas durante la expansión celular (Zeng y col., 2010). Sin embargo, su expresión disminuye gradualmente antes de la maduración, por lo que no mediaría la acumulación masiva de hexosas en la vacuola. Como se confirmó en este Seminario de Título, *VvTMT2* posee un máximo de expresión en el estadio pinta y se expresa durante toda la maduración, lo que lo convierte en uno de los posibles responsables de la acumulación de monosacáridos en la vacuola durante la maduración. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos que permitan confirmar esta conclusión.

Asimismo, el que existan elementos de respuesta a inanición (*AMYBOX1*), de regulación positiva por azúcar (*SURE1*) y de regulación negativa (*PYRIMIDINEBOX* y *MYBGAHV*) en la región promotora de *VvTMT2* (todos estos con una alta significancia) indica que podría existir un efecto dual de la concentración de azúcar, tal como en el caso de *VvHT1*. Sin embargo, no se pueden descartar otros factores que afecten este

gen a nivel transcripcional, como efecto de hormonas, luz, etc, o algún efecto en la actividad del transportador a nivel de proteína. En cuanto a esto, se demostró recientemente en *Arabidopsis thaliana* que el loop central de AtTMT1 interactúa con una proteína quinasa-like MAP triple quinasa (VIK), cuya presencia estimula la entrada de glucosa en vacuolas aisladas (Wingenter y col., 2011). Por lo tanto, no es posible descartar algún tipo adicional de regulación post-traducciona en los TMT de *Vitis vinifera*.

La posible respuesta a la presencia de azúcares debe ser evaluada con el fin de confirmar el rol que cumpliría VvTMT2 en el desarrollo del fruto. Para esto se optó por una aproximación novedosa como lo es una construcción intragénica, específica para vides.

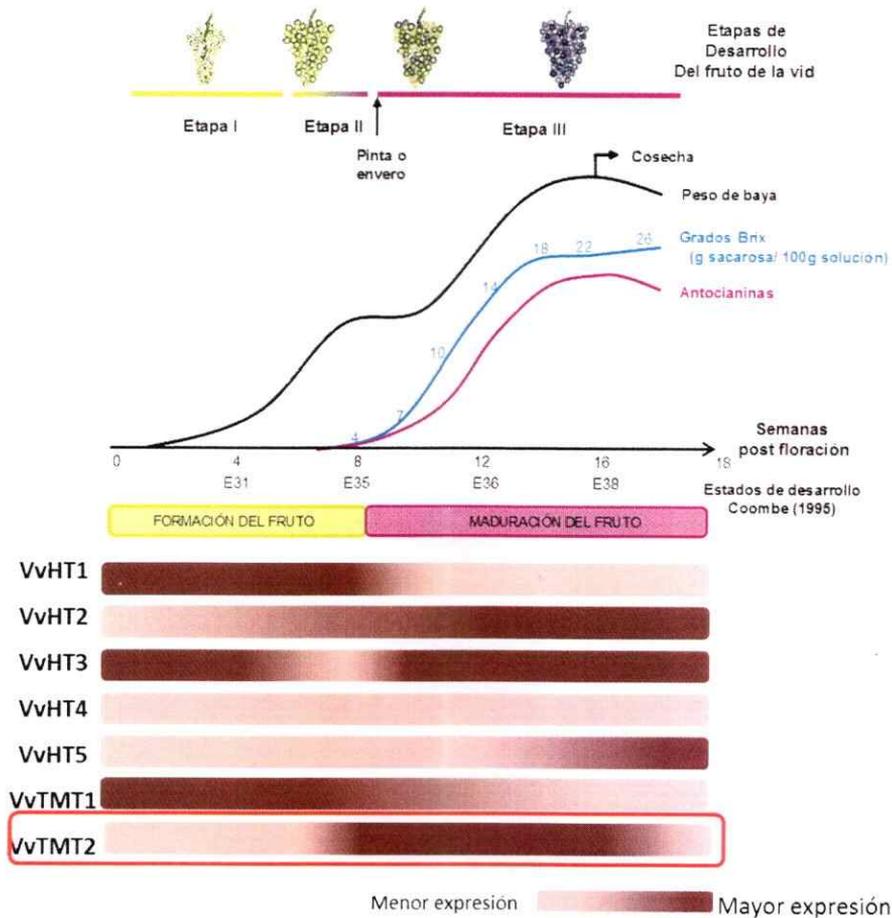


Figura 20. Expresión de transportadores de monosacáridos de membrana plasmática (VvHTs) y de tonoplasto (VvTMTs) durante el desarrollo del fruto de vid. Se muestra de forma simplificada el patrón de expresión de todos los transportadores descritos a la fecha (Modificado de Coombe, 1995; Deluc y col., 2007, Afoufa-Bastien y col., 2010, Agasse y col., 2009).

4.5. Ventajas del uso de una construcción intragénica, vector binario *pMF1* y *VvMybA1* como gen reportero

La cisgénesis e intragénesis son tecnologías que permiten realizar transformaciones genéticas sin alterar el pool genético de la especie recipiente, evitando con esto daños potenciales al medio ambiente y a la salud humana. Al mismo tiempo, este tipo de construcciones carecen de secuencias distintas a las que posee naturalmente la especie o especies sexualmente compatibles, como por ejemplo, la presencia de marcadores de selección.

Se han diseñado vectores binarios para la transformación de plantas en los cuales es posible la remoción efectiva de secuencias de DNA no deseadas desde plantas modificadas genéticamente, como lo es la resistencia a antibióticos. Entre estos vectores se encuentran los vectores *pMF* (Rouwendal y col., 2004). La remoción de genes marcadores de selección puede ser deseable para la producción de cultivos genéticamente modificados con mayor aceptación por parte del consumidor

Con el conocimiento de estas nuevas tecnologías y dada la gran importancia económica de la vid en nuestro país, se hace de suma importancia la búsqueda y obtención de secuencias regulatorias constitutivas o inducibles en condiciones específicas. Esto con el fin de, en un futuro, generar plantas mediante cisgénesis de mejor calidad y con características deseables, como por ejemplo, resistencia a estrés (biótico o abiótico).

Con esto en consideración, en el laboratorio se ha creado inicialmente una construcción que contiene el promotor constitutivo del gen de Ubiquitina (*VvUbi*), seguido de la secuencia codificante del gen *VvMybA1* y del terminador del mismo (*pMF1-pVvUbi::VvMybA1*) (Figura 9). Éste último se utiliza como gen reportero.

El uso del gen *VvMybA1* como reportero tiene múltiples ventajas en comparación con técnicas más tradicionales, como el gen de la β - Glucuronidasa (GUS). Estudios previos han mostrado que la expresión ectópica de *VvMybA1* permite la activación transcripcional de la producción de antocianinas en células no pigmentadas, dándole color a estas últimas y permitiendo el uso de este fenómeno como rasgo cualitativo que revela el éxito de eventos de transformación (Li y col., 2010). Por lo tanto, su utilización como reportero posee grandes ventajas como: la estabilidad química única del producto de expresión, correlatividad cuantitativa y un ensayo fácil y no destructivo de detección.

Por estas razones, se optó por realizar el clonamiento de *pVvTMT2* mediante esta estrategia en vez de una más tradicional como es la unión del promotor al gen reportero GUS (*uid A*), cuyo ensayo de detección es más laborioso y destructivo, puesto que implica la muerte del tejido. Además, con este último puede existir interferencia en la señal por actividad no específica.

4.6. Proyecciones y posibles aplicaciones

En el marco de este Seminario de Título, se ha reemplazado en una construcción para intragénea en *vid* (Figura 12) el promotor constitutivo *VvUbi* por el promotor del gen *VvTMT2*, que como se observó, posee sitios de regulación por azúcar y podría estar regulado por este metabolito, pudiendo ser utilizado como promotor inducible en construcciones intragénicas de interés. Estas podrían ser utilizadas en especies de interés agrícola. Sin embargo, es necesario a futuro realizar experimentos que confirmen esta hipótesis y a la vez nos permitan probar la efectividad de nuestra construcción.

Una primera posibilidad es transformar genéticamente con el constructo *pMF1-pVvTMT2::VvMybA1* plantas de *Arabidopsis thaliana* y evaluar el efecto de concentraciones crecientes de azúcar (sacarosa, glucosa y fructosa) en la expresión del gen reportero *VvMybA1*. Se utilizaría *Arabidopsis* como modelo, puesto que los protocolos de transformación y de regeneración de vides son engorrosos, de gran extensión de tiempo y poco eficientes. Además, existen como antecedente experimentos previos en los que se prueba el efecto de azúcar sobre la acumulación de antocianos en plántulas de *Arabidopsis* utilizando placas de medio MS/2 sólido (Teng y col., 2005).

Otra alternativa más simple y rápida de saber si la expresión del gen *VvTMT2* se encuentra regulada por azúcares es, por ejemplo, tomar discos foliares de vid y exponerlos a un medio MS/2 líquido suplementado con altas concentraciones de azúcar (sacarosa, glucosa y fructosa) y ver finalmente, mediante qRT-PCR, si el tratamiento altera la expresión del gen *VvTMT2*. Este tipo de experimentos se realizó en *Arabidopsis* y en arroz para probar el efecto del azúcar en la expresión de sus respectivos TMTs (Wormit y col., 2006 y Cho y col., 2010). Por otra parte, también sería interesante evaluar el efecto de delecciones en los elementos *cis* encontrados, sobre la expresión de *VvTMT2* o distintos largos del promotor.

Finalmente, con resultados positivos en estos experimentos y con los antecedentes recopilados en este Seminario de Título se confirmaría que estamos en presencia de un promotor que es regulado por la presencia de azúcares y se podría utilizar como promotor inducible en diversas aplicaciones. Utilizando este u otro promotor, mediante la tecnología de intragénesis, se podría alterar la expresión espacial o temporal de un gen nativo de interés y, por lo tanto dirigir o incrementar la síntesis de un producto beneficioso en órganos y momentos específicos (Molesini y

col., 2012), por ejemplo durante la maduración del fruto de vid. De esta forma, se podría utilizar un promotor inducible para regular la expresión de genes de interés durante la maduración del fruto en plantas transformadas mediante intragénesis. Para lo cual, sería necesario en primera instancia, conocer además su expresión en otros tejidos (hojas, raíces, etc). También se podría utilizar para inducir genes de interés en cultivos celulares en que el azúcar actúe como inductor. Estos genes podrían ser, por ejemplo, de síntesis de algún metabolito de interés. De manera similar, este promotor inducible por azúcar se podría utilizar en levaduras u otros hongos para expresión de proteínas, puesto que está demostrado que el azúcar actúa como molécula señal en estos organismos.

5. CONCLUSIONES

Este Seminario de Título corresponde a una primera aproximación al estudio de la regulación por azúcares del transportador VvTMT2, un putativo transportador de monosacáridos ubicado en la membrana vacuolar y que cumple un importante rol durante el desarrollo del fruto, específicamente durante la maduración.

Como conclusión podemos decir que:

- Se evaluó la expresión de VvTMT2 mediante qRT-PCR, observándose un máximo de acumulación de transcrito en el estadio pinta y una leve disminución en maduración. Esto sugiere la participación de este transportador en la acumulación de hexosas en la vacuola, durante la maduración.
- El fuerte aumento en la concentración de azúcares durante la pinta, medida como °Bx, coincide con el máximo de expresión de VvTMT2, mientras que concentraciones mayores de azúcar se correlacionan con una disminución en la expresión.
- Mediante análisis *in silico* se observó la presencia de elementos de regulación por azúcares, tanto positiva y negativa en la secuencia promotora de VvTMT2 (pVvTMT2). Con este resultado y dado el patrón de expresión de este transportador, se espera que su transcripción este controlada por su propio sustrato.
- Se obtuvo un clon de 1749pb de pVvTMT2 (1.8Kb-pVvTMT2) que controla la expresión del reportero VvMybA1 (pMF1-pVvTMT2::VvMybA1). Se espera que éste pueda ser utilizado en experimentos futuros que permitan probar la regulación por azúcares de la expresión de este transportador.

Finalmente, con los resultados obtenidos se logró encontrar los primeros indicios de la regulación por azúcares de la expresión del transportador putativo VvTMT2 y el papel que este cumple en el desarrollo del fruto de vid. Se espera con nuevos experimentos obtener resultados aún más concluyentes y, a futuro, utilizar la secuencia pVvTMT2 como promotor inducible, mediante la tecnología de cisgénea o intragénea, en aplicaciones de interés.

CONGRESOS

- E. Torres, C. Santibáñez-Orellana, P. Arce-Johnson. Studies on the expression regulation of a putative tonoplast monosaccharide transporter VvTMT2 in *Vitis vinifera*. VII Reunión de Biología Vegetal. 30Nov – 2Nov 2011. Pucón, Chile
- C. Espinoza, I. Fredes, D. Herrera, E. Torres, A. Arce, A. Serrano, R Larraín, G. Marchandón, C. Medina, P. Arce-Johnson. Characterization of promoters from grapevine with different expression profiles to develop cisgenic grapes. XXXV Reunión anual SBBMCH. 2-5 Oct. Puerto Varas, Chile.

6. 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 macroarray expression profiling. *BMC Plant Biology*. **10**: 245.
- Agasse A., Vignault C., Kappel C., Conde C., Gerós H., Delrot S. 2009. Sugar transport and sugar sensing in grape. In: Roubelakis-Angelakis KA (ed) *Grapevine molecular physiology and biotechnology*, 2nd ed. pp 105-139. Springer, New York.
- Atanassova R., Leterrier M., Gaillard C., Agasse A., Sagot E., Coutos-Thévenot P., Delrot S. 2003. Sugar-regulated Expression of putative hexose transport gene in grape. *Plant Physiology*. **131**: 326-334.
- Büttner M., 2007. The monosaccharide transporter(-like) gene family in Arabidopsis. *FEBS Letters* **581**: 2318–2324
- Chen B., Janes H. 2002. Cloning PCR products. In: Humana Press (ed). *PCR Cloning Protocols*. 2nd ed. pp 111-120. Totowa, New Jersey.
- Cho J., Burla B., Lee D., Ryoo N., Hong S., Kim H., Eom J., Choi S., Cho M., Bhoo S., Hahn T., Neuhaus H. E., Martinoia E., Jeon J. 2010. Expression analysis and functional characterization of the monosaccharide transporters, OsTMTs, involving vacuolar sugar transport in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist* .**186**: 657–668

- Coombe B. G. 1995. Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1: 100-110
- Conde C., Agasse A., Glissant., Tavares R., Gerós H., Delrot S. 2006. Pathways of Glucose Regulation of Monosaccharide Transport in Grape Cells. *Plant Physiology*. 141: 1563–1577.
- 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.
- 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. *Plant Physiology*. 120: 1083–1093
- Freeling M., Subramaniam S. 2009. Conserved noncoding sequences (CNSs) in higher plants. *Genome Studies and Molecular Genetics*. 12 (2): 126-132.
- Gambino G., Perrone I. and Gribaudo I. 2008. A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochem Anal* 19(6): 520-525.

- Grierson C., Du j., Zabela M, Beggs K., Smith C., Holdsworth M., Bevan M. 1994. Separate cis sequences and trans factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. *The Plant Journal*. **5(6)**: 815-826.
- Hattori T., Nakagawa S., Nakamura K. 1990. High-level expression of tuberous root storage protein genes of sweet potato in stems of plantlets grown in vitro on sucrose medium. *Plant Molecular Biology* **14**: 595-604.
- Hayes M., Davies C., Dry I., 2007. Isolation, functional characterization, and expression analysis of grapevine (*Vitis vinifera*-L.) hexose transporters: differential roles in sink and source tissues. *Journal of experimental Botany*. **58**: 1985-1997.
- Hayes M., Feechan A., Dry I. 2010 Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant Physiology*. **153**: 211-221.
- Huang N., Sutliff T., Litts J., Rodriguez R. 1990. Classification and characterization of the rice alpha-amylase multigene family. *Plant Mol Biol* **14**: 655-668
- Hwang Y., Karrer E., Thomas B., Chen L., Rodriguez R. 1998. Three cis-elements required for rice α -amylase Amy3D expression during sugar starvation. *Plant Molecular Biology*. **36**: 331-341.

- Li Z., Dhekney S., Gray D. 2011. Use of the VvMybA1 gene for non-destructive quantification of promoter activity via color histogram analysis in grapevine (*Vitis vinifera*) and tobacco. *Transgenic Research*. **20**: 5, 1087-1097.
- Mena M., Cejudo F., Isabel-Lamoneda I., Carbonero P. 2002. A Role for the DOF Transcription Factor BPBF in the Regulation of Gibberellin-Responsive Genes in Barley Aleurone. *Plant Physiology*. **130**: 111–119.
- Molesini B., Pii Y., Pandolfini T. 2012. Fruit improvement using intragenesis and artificial microRNA. *Trends in Biotechnology*. **30 (2)**: 80-88.
- Morita A., memura T., Kuroyanagi M, Futsuhara Y., Perata P., Yamaguchi J. 1998. Functional dissection of a sugar-repressed α -amylase gene (RAmy1A) promoter in rice embryos. *FEBS Letters*. **423**: 81-85.
- Rolland F., Baena-Gonzales E., Sheen J. 2006. Sugar Sensing and Signaling in Plants: Conserved and Novel Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**:675–709.
- Rouwendal, Adolph G., Heteren H. 2004. Modification of plant genomes. US2004185567. Filing Date Apr 21, 2004.
- Schouten H., Krens F., Jacobsen E. 2006. Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. *EMBO Reports*. **2**: 750- 753.

- Sun C., Palmqvist S., Olsson H., Borén M., Ahlandsberg S., Jansson C. 2003. A Novel WRKY Transcription Factor, SUSIBA2, Participates in Sugar Signaling in Barley by Binding to the Sugar-Responsive Elements of the *iso1* Promoter. *The Plant Cell* **15**: 2076–2092.
- Teng S., Keurentjes J., Bentsink L., Koornneef M., Smeekens S. 2005. Sucrose-Specific Induction of Anthocyanin Biosynthesis in Arabidopsis Requires the MYB75/PAP1 Gene. *Plant Physiology*. **139**: 1840–1852.
- Terrier N., Glissant D., Grimplet J., Barrieu F., Abbal P., Couture C., Ageorges A., Atanassova R., Le´on c., Renaudin J., De´dalde´champ F., Romieu C., Delrot S., Hamdi S. 2005. Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta* **222**: 832–847.
- Vignault C., Vachaud M., Cakir B., Glissant D., Dédaldé F., Büttner 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 of Experimental Botany*. **56**: 1409–1411.
- Williams L., Lemoine R., Sauer N. 2000. Sugar transporters in higher plants – a diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science Reviews*. **5 (7)**: 283-290.

Wingenter k, Trentmann O., Wünsch i, Imke I. Hörmiller I., Heyer A., Reinders J., Schulz A., Geiger D., Hedrich R., Neuhaus H. 2011. A member of the mitogen-activated protein 3-kinase family is involved in the regulation of plant vacuolar glucose uptake. *The Plant Journal*. **68**: 890–900

Wormit A., Trentmann O., Feifer I., Lohr C., Tjaden J., Meyer S., Schmidt U., Martinoia E., Neuhaus H. E. 2006. Molecular Identification and Physiological Characterization of a Novel Monosaccharide Transporter from Arabidopsis Involved in Vacuolar Sugar Transport. *The Plant Cell*. **18**: 3476–3490.

Zeng L., Wang Z., Vainstein A., Chen A., Ma H. 2010. Cloning, localization and expression analysis of a new tonoplast monosaccharide transporter from *Vitis vinifera* L. *J Plant Growth Regul.* 1-14.

ANEXO

Anexo1: Alineamiento completo de clones pGEM-T-pVvTMT2

	1	50
pVvTMT2	(1)	TTTTCAAACCTTAAGTTCTTAATTTAAGATTTTTTTTGAAGATATATAT
pVvTMT2-1A	(1)	-----
pVvTMT2-1B	(1)	-----
pVvTMMT2-5A	(1)	-----
pVvTMT2-5B	(1)	-----
pVvTMMT2-6A	(1)	-----
	51	100
pVvTMT2	(51)	GAAAACATAATTTTTCTTCAAATTTCAATTAATTTTTTAAAATAATTTA
pVvTMT2-1A	(1)	-----
pVvTMT2-1B	(1)	-----
pVvTMMT2-5A	(1)	-----
pVvTMT2-5B	(1)	-----
pVvTMMT2-6A	(1)	-----
	101	150
pVvTMT2	(101)	TTTTCAAATAAATTTCTAAAAACTATTTTTCTTTTGTAAAAATTAT
pVvTMT2-1A	(1)	-----
pVvTMT2-1B	(1)	-----
pVvTMMT2-5A	(1)	-----
pVvTMT2-5B	(1)	-----
pVvTMMT2-6A	(1)	-----
	151	200
pVvTMT2	(151)	CAACACTATTTTTCACTAAAAATTCATCCAAAGTGTTCCTTCTTCTTT
pVvTMT2-1A	(1)	-----
pVvTMT2-1B	(1)	-----
pVvTMMT2-5A	(1)	-----
pVvTMT2-5B	(1)	-----
pVvTMMT2-6A	(1)	-----
	201	250
pVvTMT2	(201)	ATTTTTTTTTGT TA ACTGATCAAGAGGCCAACTCAAATATAGGCATGGCAT
pVvTMT2-1A	(1)	--- GGCGCGCC TA ACTGATCAAGAGGCCAACTCAAATATAGGCATGGCAT
pVvTMT2-1B	(1)	--- GGCGCGCC TA ACTGATCAAGAGGCCAACTCAAATATAGGCATGGCAT
pVvTMMT2-5A	(1)	--- GGCGCGCC TA ACTGATCAAGAGGCCAACTCAAATATAGGCATGGCAT
pVvTMT2-5B	(1)	--- GGCGCGCC TA ACTGATCAAGAGGCCAACTCAAATATAGGCATGGCAT
pVvTMMT2-6A	(1)	--- GGCGCGCC TA ACTGATCAAGAGGCCAACTCAAATATAGGCATGGCAT
	251	300
pVvTMT2	(251)	GATAATAAGTGATGGCTTCTAGTGGCTTCGAGGTTGCACATGCATCATT
pVvTMT2-1A	(48)	GATAATAAGTGATGGCTTCTAGTGGCTTCGAGGTTGCACATGCATCATT
pVvTMT2-1B	(48)	GATAATAAGTGATGGCTTCTAGTGGCTTCGAGGTTGCACATGCATCATT
pVvTMMT2-5A	(48)	GATAATAAGTGATGGCTTCTAGTGGCTTCGAGGTTGCACATGCATCATT
pVvTMT2-5B	(48)	GATAATAAGTGATGGCTTCTAGTGGCTTCGAGGTTGCACATGCATCATT
pVvTMMT2-6A	(48)	GATAATAAGTGATGGCTTCTAGTGGCTTCGAGGTTGCACATGCATCATT
	301	350
pVvTMT2	(301)	AATTCTCAAATGGATCC ATGCCATACATGATTAGTTGGCTACA GTAGC
pVvTMT2-1A	(98)	AATTCTCAAATGGATCC ATGCCATACATGATTAGTTGGCTACA GTAGC
pVvTMT2-1B	(98)	AATTCTCAAATGGATCC ATGCCATACATGATTAGTTGGCTACA GTAGC
pVvTMMT2-5A	(98)	AATTCTCAAATGGATCC ATGCCATACATGATTAGTTGGCTACA GTAGC
pVvTMT2-5B	(98)	AATTCTCAAATGGATCC ATGCCATACATGATTAGTTGGCTACA GTAGC
pVvTMMT2-6A	(98)	AATTCTCAAATGGATCC ATGCCATACATGATTAGTTGGCTACA GTAGC
	351	400

pVvTMT2 (351) ATATAATCATTAAAAATCCTCACTCCATTTGTTTTTTAAATATATATATA
 pVvTMT2-1A (147) ATATAATCATTAAAAATCCTCACTCCATTTGTTTTTTAAATATATATATA
 pVvTMT2-1B (147) ATATAATCATTAAAAATCCTCACTCCATTTGTTTTTTAAATATATATATA
 pVvTMMT2-5A (147) ATATAATCATTAAAAATCCTCACTCCATTTGTTTTTTAAATATATATATA
 pVvTMT2-5B (147) ATATAATCATTAAAAATCCTCACTCCATTTGTTTTTTAAATATATATATA
 pVvTMMT2-6A (147) ATATAATCATTAAAAATCCTCACTCCATTTGTTTTTTAAATATATATATA
 401 450
 pVvTMT2 (401) TATAAAAAAATTAGTTGTGCTGTTTTAAGAAGATAAAATCTGTTTTCA
 pVvTMT2-1A (197) TA--AAAAAAGATTAGTTGTGCTGTTTTAAGAAGATAAAATCTGTTTTCA
 pVvTMT2-1B (197) TA--AAAAAAGATTAGTTGTGCTGTTTTAAGAAGATAAAATCTGTTTTCA
 pVvTMMT2-5A (197) TA--AAAAAATTAGTTGTGCTGTTTTAAGAAGATAAAATCTGTTTTCA
 pVvTMT2-5B (197) TA--AAAAAATTAGTTGTGCTGTTTTAAGAAGATAAAATCTGTTTTCA
 pVvTMMT2-6A (197) TA--AAAAAATTAGTTGTGCTGTTTTAAGAAGATAAAATCTGTTTTCA
 451 500
 pVvTMT2 (451) GTAACGGTTTCAAAGCTGATCAAGTTTCTGTAAAAATAGGTGGAAAAAG
 pVvTMT2-1A (245) TAACGGTTTCAAAGCTGATCAAGTTTCTGTAAAAATAGGTGGAAAAAG
 pVvTMT2-1B (245) TAACGGTTTCAAAGCTGATCAAGTTTCTGTAAAAATAGGTGGAAAAAG
 pVvTMMT2-5A (246) TAACGGTTTCAAAGCTGATCAAGTTTCTGTAAAAATAGGTGGAAAAAG
 pVvTMT2-5B (246) TAACGGTTTCAAAGCTGATCAAGTTTCTGTAAAAATAGGTGGAAAAAG
 pVvTMMT2-6A (246) TAACGGTTTCAAAGCTGATCAAGTTTCTGTAAAAATAGGTGGAAAAAG
 501 550
 pVvTMT2 (501) ATGATAATATTTATTCTTTTATGTACGGGAAATTCATGGGACTGTCTGT
 pVvTMT2-1A (295) ATGATAATATTTATTCTTTTATGTACGGGAAATTCATGGGACTGTCTGT
 pVvTMT2-1B (295) ATGATAATATTTATTCTTTTATGTACGGGAAATTCATGGGACTGTCTGT
 pVvTMMT2-5A (296) ATGATAATATTTATTCTTTTATGTACGGGAAATTCATGGGACTGTCTGT
 pVvTMT2-5B (296) ATGATAATATTTATTCTTTTATGTACGGGAAATTCATGGGACTGTCTGT
 pVvTMMT2-6A (296) ATGATAATATTTATTCTTTTATGTACGGGAAATTCATGGGACTGTCTGT
 551 600
 pVvTMT2 (551) GAGACAGATGTTTGGTAAGGTTTATTGTTTCATCCATTATGTCAATGGGCT
 pVvTMT2-1A (345) GAGACAGATGTTTGGTAAGGTTTATTGTTTCATCCATTATGTCAATGGGCT
 pVvTMT2-1B (345) GAGACAGATGTTTGGTAAGGTTTATTGTTTCATCCATTATGTCAATGGGCT
 pVvTMMT2-5A (346) GAGACAGATGTTTGGTAAGGTTTATTGTTTCATCCATTATGTCAATGGGCT
 pVvTMT2-5B (346) GAGACAGATGTTTGGTAAGGTTTATTGTTTCATCCATTATGTCAATGGGCT
 pVvTMMT2-6A (346) GAGACAGATGTTTGGTAAGGTTTATTGTTTCATCCATTATGTCAATGGGCT
 601 650
 pVvTMT2 (601) TAAGTTTTTCTATTAAATGATAAATTTGGACCACCCATTTTTGAAGAAAC
 pVvTMT2-1A (395) TAAGTTTTTCTATTAAATGATAAATTTGGACCACCCATTTTTGAAGAAAC
 pVvTMT2-1B (395) TAAGTTTTTCTATTAAATGATAAATTTGGACCACCCATTTTTGAAGAAAC
 pVvTMMT2-5A (396) TAAGTTTTTCTATTAAATGATAAATTTGGACCACCCATTTTTGAAGAAAC
 pVvTMT2-5B (396) TAAGTTTTTCTATTAAATGATAAATTTGGACCACCCATTTTTGAAGAAAC
 pVvTMMT2-6A (396) TAAGTTTTTCTATTAAATGATAAATTTGGACCACCCATTTTTGAAGAAAC
 651 700
 pVvTMT2 (651) TCAATGTTTCATCCGATTTAGATCCCATTAATTAACAAACTGGAGTTGAG
 pVvTMT2-1A (445) TCAATGTTTCATCCGATTTAGATCCCATTAATTAACAAACTGGAGTTGAG
 pVvTMT2-1B (445) TCAATGTTTCATCCGATTTAGATCCCATTAATTAACAAACTGGAGTTGAG
 pVvTMMT2-5A (446) TCAATGTTTCATCCGATTTAGATCCCATTAATTAACAAACTGGAGTTGAG
 pVvTMT2-5B (446) TCAATGTTTCATCCGATTTAGATCCCATTAATTAACAAACTGGAGTTGAG
 pVvTMMT2-6A (446) TCAATGTTTCATCCGATTTAGATCCCATTAATTAACAAACTGGAGTTGAG
 701 750
 pVvTMT2 (701) GTTTAAGAACCCTAGCTACCCAAAACAGCTAAACATTGGTCATGGACACT
 pVvTMT2-1A (495) GTTTAAGAACCCTAGCTACCCAAAACAGCTAAACATTGGTCATGGACACT
 pVvTMT2-1B (495) GTTTAAGAACCCTAGCTACCCAAAACAGCTAAACATTGGTCATGGACACT
 pVvTMMT2-5A (496) GTTTAAGAACCCTAGCTACCCAAAACAGCTAAACATTGGTCATGGACACT
 pVvTMT2-5B (496) GTTTAAGAACCCTAGCTACCCAAAACAGCTAAACATTGGTCATGGACACT

pVvTMMT2-6A (496) GTTTAAGAACCCTAGCTACCCAAAACAGCTAAACATTGGTCATGGACACT
751 800

pVvTMT2 (751) TAAAAAACTCAACTAAGATCAGAATCTCTCAGGGCTGACCAAATTCATGG
pVvTMT2-1A (545) TAAAAAACTCAACTAAGATCAGAATCTCTCAGGGCTGACCAAATTCATGG
pVvTMT2-1B (545) TAAAAAACTCAACTAAGATCAGAATCTCTCAGGGCTGACCAAATTCATGG
pVvTMMT2-5A (546) TAAAAAACTCAACTAAGATCAGAATCTCTCAGGGCTGACCAAATTCATGG
pVvTMT2-5B (546) TAAAAAACTCAACTAAGATCAGAATCTCTCAGGGCTGACCAAATTCATGG
pVvTMMT2-6A (546) TAAAAAACTCAACTAAGATCAGAATCTCTCAGGGCTGACCAAATTCATGG
801 850

pVvTMT2 (801) CAAAGTACTCCTTTGGCCATATGGGTATATGCCAGTTCCTTCATCTCCA
pVvTMT2-1A (595) CAAAGTACTCCTTTGGCCATATGGGTATATGCCAGTTCCTTCATCTCCA
pVvTMT2-1B (595) CAAAGTACTCCTTTGGCCATATGGGTATATGCCAGTTCCTTCATCTCCA
pVvTMMT2-5A (596) CAAAGTACTCCTTTGGCCATATGGGTATATGCCAGTTCCTTCATCTCCA
pVvTMT2-5B (596) CAAAGTACTCCTTTGGCCATATGGGTATATGCCAGTTCCTTCATCTCCA
pVvTMMT2-6A (596) CAAAGTACTCCTTTGGCCATATGGGTATATGCCAGTTCCTTCATCTCCA
851 900

pVvTMT2 (851) AGCTTTCAGCGGATTCAAAGAACACCCCTACAGTGAGGAGCTGTACCTGC
pVvTMT2-1A (645) AGCTTTCAGCGGATTCAAAGAACACCCCTACAGTGAGGAGCTGTACCTGC
pVvTMT2-1B (645) AGCTTTCAGCGGATTCAAAGAACACCCCTACAGTGAGGAGCTGTACCTGC
pVvTMMT2-5A (646) AGCTTTCAGCGGATTCAAAGAACACCCCTACAGTGAGGAGCTGTACCTGC
pVvTMT2-5B (646) AGCTTTCAGCGGATTCAAAGAACACCCCTACAGTGAGGAGCTGTACCTGC
pVvTMMT2-6A (646) AGCTTTCAGCGGATTCAAAGAACACCCCTACAGTGAGGAGCTGTACCTGC
901 950

pVvTMT2 (901) TAATTAATAAATGTAAAAAATGGAGAATTTTAAATTTGGCTTT-AAAAACA
pVvTMT2-1A (695) TAATTAATAAATGTAAAAAATGGAGAATTTTAAATTTGGCTTTAAAAACA
pVvTMT2-1B (695) TAATTAATAAATGTAAAAAATGGAGAATTTTAAATTTGGCTTTAAAAACA
pVvTMMT2-5A (696) TAATTAATAAATGTAAAAAATGGAGAATTTTAAATTTGGCTTTAAAAACA
pVvTMT2-5B (696) TAATTAATAAATGTAAAAAATGGAGAATTTTAAATTTGGCTTTAAAAACA
pVvTMMT2-6A (696) TAATTAATAAATGTAAAAAATGGAGAATTTTAAATTTGGCTTTAAAAACA
951 1000

pVvTMT2 (950) AAGGGTTGCAGAGTGGCATGAAGGTGAGTGTGAGAGTGAGAGTGGGTGAG
pVvTMT2-1A (745) AAGGGTTGCAGAGTGGCATGAAGGTGAGTGTGAGAGTGAGAGTGGGTGAG
pVvTMT2-1B (745) AAGGGTTGCAGAGTGGCATGAAGGTGAGTGTGAGAGTGAGAGTGGGTGAG
pVvTMMT2-5A (746) AAGGGTTGCAGAGTGGCATGAAGGTGAGTGTGAGAGTGAGAGTGGGTGAG
pVvTMT2-5B (746) AAGGGTTGCAGAGTGGCATGAAGGTGAGTGTGAGAGTGAGAGTGGGTGAG
pVvTMMT2-6A (746) AAGGGTTGCAGAGTGGCATGAAGGTGAGTGTGAGAGTGAGAGTGGGTGAG
1001 1050

pVvTMT2 (1000) CTTTCGAAAGTTGAAAGGTAGACGAAAAAACCAATAAATGGAAACATGAT
pVvTMT2-1A (795) CTTTCGAAAGTTGAAAGGTAGACGAAAAAACCAATAAATGGAAACATGAT
pVvTMT2-1B (795) CTTTCGAAAGTTGAAAGGTAGACGAAAAAACCAATAAATGGAAACATGAT
pVvTMMT2-5A (796) CTTTCGAAAGTTGAAAGGTAGACGAAAAAACCAATAAATGGAAACATGAT
pVvTMT2-5B (796) CTTTCGAAAGTTGAAAGGTAGACGAAAAAACCAATAAATGGAAACATGAT
pVvTMMT2-6A (796) CTTTCGAAAGTTGAAAGGTAGACGAAAAAACCAATAAATGGAAACATGAT
1051 1100

pVvTMT2 (1050) GAGA-TGGGTGTTGCCTTTAATTTACAGAGTACTTGTAATTCGGTTGATTG
pVvTMT2-1A (845) GAGA-TGGGTGTTGCCTTTAATTTACAGAGTACTTGTAATTCGGTTGATTG
pVvTMT2-1B (845) GAGA-TGGGTGTTGCCTTTAATTTACAGAGTACTTGTAATTCGGTTGATTG
pVvTMMT2-5A (846) GAGA-TGGGTGTTGCCTTTAATTTACAGAGTACTTGTAATTCGGTTGATTG
pVvTMT2-5B (846) GAGA-TGGGTGTTGCCTTTAATTTACAGAGTACTTGTAATTCGGTTGATTG
pVvTMMT2-6A (846) GAGAA-TGGGTGTTGCCTTTAATTTACAGAGTACTTGTAATTCGGTTGATTG
1101 1150

pVvTMT2 (1099) AGCTTTTTGGCTGAATGTATGACTTCTGGGATTGAATCTCATTACCTAAT
pVvTMT2-1A (894) AGCTTTTTGGCTGAATGTATGACTTCTGGGATTGAATCTCATTACCTAAT
pVvTMT2-1B (894) AGCTTTTTGGCTGAATGTATGACTTCTGGGATTGAATCTCATTACCTAAT

pVvTMMT2-5A	(895)	AGCTTTTGGCTGAATGTATGACTTCTGGGATTGAATCTCATTACCTAAT
pVvTMT2-5B	(895)	AGCTTTTGGCTGAATGTATGACTTCTGGGATTGAATCTCATTACCTAAT
pVvTMMT2-6A	(896)	AGCTTTTGGCTGAATGTATGACTTCTGGGATTGAATCTCATTACCTAAT
		1151 1200
pVvTMT2	(1149)	AGTCTTCATGAATCCTTCTTCATCTATCCTCTTCTCTGAAGGGTAGATTC
pVvTMT2-1A	(944)	AGTCTTCATGAATCCTTCTTCATCTATCCTCTTCTCTGAAGGGTAGATTC
pVvTMT2-1B	(944)	AGTCTTCATGAATCCTTCTTCATCTATCCTCTTCTCTGAAGGGTAGATTC
pVvTMMT2-5A	(945)	AGTCTTCATGAATCCTTCTTCATCTATCCTCTTCTCTGAAGGGTAGATTC
pVvTMT2-5B	(945)	AGTCTTCATGAATCCTTCTTCATCTATCCTCTTCTCTGAAGGGTAGATTC
pVvTMMT2-6A	(946)	AGTCTTCATGAATCCTTCTTCATCTATCCTCTTCTCTGAAGGGTAGATTC
		1201 1250
pVvTMT2	(1199)	TCATCATCACAGCCAACCTTCTCAACTCCTTTTTTTTTTAGTCTTCTGATG
pVvTMT2-1A	(994)	TCATCATCACAGCCAACCTTCTCAACTCCTTTTTTTTTTAGTCTTCTGATG
pVvTMT2-1B	(994)	TCATCATCACAGCCAACCTTCTCAACTCCTTTTTTTTTTAGTCTTCTGATG
pVvTMMT2-5A	(995)	TCATCATCACAGCCAACCTTCTCAACTCCTTTTTTTTTTAGTCTTCTGATG
pVvTMT2-5B	(995)	TCATCATCACAGCCAACCTTCTCAACTCCTTTTTTTTTTAGTCTTCTGATG
pVvTMMT2-6A	(996)	TCATCATCACAGCCAACCTTCTCAACTCCTTTTTTTTTTAGTCTTCTGATG
		1251 1300
pVvTMT2	(1249)	AGACTCCAAGATCTTAAAAGGTTTTTCTTTCTATGGATTCCATGGTGGGA
pVvTMT2-1A	(1043)	AGACTCCAAGATCTTAAAAGGTTTTTCTTTCTATGGATTCCATGGTGGGA
pVvTMT2-1B	(1043)	AGACTCCAAGATCTTAAAAGGTTTTTCTTTCTATGGATTCCATGGTGGGA
pVvTMMT2-5A	(1044)	AGACTCCAAGATCTTAAAAGGTTTTTCTTTCTATGGATTCCATGGTGGGA
pVvTMT2-5B	(1044)	AGACTCCAAGATCTTAAAAGGTTTTTCTTTCTATGGATTCCATGGTGGGA
pVvTMMT2-6A	(1045)	AGACTCCAAGATCTTAAAAGGTTTTTCTTTCTATGGATTCCATGGTGGGA
		1301 1350
pVvTMT2	(1299)	AATTACACTTTGGTGTAAGACCCTTTTAGTTTTTCGCAACTTTTCAATTT
pVvTMT2-1A	(1093)	AATTACACTTTGGTGTAAGACCCTTTTAGTTTTTCGCAACTTTTCAATTT
pVvTMT2-1B	(1093)	AATTACACTTTGGTGTAAGACCCTTTTAGTTTTTCGCAACTTTTCAATTT
pVvTMMT2-5A	(1094)	AATTACACTTTGGTGTAAGACCCTTTTAGTTTTTCGCAACTTTTCAATTT
pVvTMT2-5B	(1094)	AATTACACTTTGGTGTAAGACCCTTTTAGTTTTTCGCAACTTTTCAATTT
pVvTMMT2-6A	(1095)	AATTACACTTTGGTGTAAGACCCTTTTAGTTTTTCGCAACTTTTCAATTT
		1351 1400
pVvTMT2	(1349)	TGAAAAGTCATAAAAAGTAGTAATCATGCAGCTTTTTTCTGAAGATATTTA
pVvTMT2-1A	(1143)	TGAAAAGTCATAAAAAGTAGTAATCATGCAGCTTTTTTCTGAAGATATTTA
pVvTMT2-1B	(1143)	TGAAAAGTCATAAAAAGTAGTAATCATGCAGCTTTTTTCTGAAGATATTTA
pVvTMMT2-5A	(1144)	TGAAAAGTCATAAAAAGTAGTAATCATGCAGCTTTTTTCTGAAGATATTTA
pVvTMT2-5B	(1144)	TGAAAAGTCATAAAAAGTAGTAATCATGCAGCTTTTTTCTGAAGATATTTA
pVvTMMT2-6A	(1145)	TGAAAAGTCATAAAAAGTAGTAATCATGCAGCTTTTTTCTGAAGATATTTA
		1401 1450
pVvTMT2	(1399)	TCATCACTGTTTTTTATTACTTTGATTGCATCTAACAATTCTAATTT
pVvTMT2-1A	(1193)	TCATCACTGTTTTTTATTACTTTGATTGCATCTAACAATTCTAATTT
pVvTMT2-1B	(1193)	TCATCACTGTTTTTTATTACTTTGATTGCATCTAACAATTCTAATTT
pVvTMMT2-5A	(1194)	TCATCACTGTTTTTTATTACTTTGATTGCATCTAACAATTCTAATTT
pVvTMT2-5B	(1194)	TCATCACTGTTTTTTATTACTTTGATTGCATCTAACAATTCTAATTT
pVvTMMT2-6A	(1195)	TCATCACTGTTTTTTATTACTTTGATTGCATCTAACAATTCTAATTT
		1451 1500
pVvTMT2	(1449)	TTAGAATGTAAATTTATAAAATAAATAAAAAACGAAGGTTGATTTAATCTG
pVvTMT2-1A	(1243)	TTAGAATGTAAATTTATAAAATAAATAAAAAACGAAGGTTGATTTAATCTG
pVvTMT2-1B	(1243)	TTAGAATGTAAATTTATAAAATAAATAAAAAACGAAGGTTGATTTAATCTG
pVvTMMT2-5A	(1244)	TTAGAATGTAAATTTATAAAATAAATAAAAAACGAAGGTTGATTTAATCTG
pVvTMT2-5B	(1244)	TTAGAATGTAAATTTATAAAATAAATAAAAAACGAAGGTTGATTTAATCTG
pVvTMMT2-6A	(1245)	TTAGAATGTAAATTTATAAAATAAATAAAAAACGAAGGTTGATTTAATCTG

			1550
1501			
pVvTMT2	(1499)	GGAAAATTATACATATTAGGATTTTAGGAGGGTTTTCTGAATCAAACAG	
pVvTMT2-1A	(1292)	GGAAAATTATACATATTAGGATTTTAGGAGGGTTTTCTGAATCAAACA	
pVvTMT2-1B	(1292)	GGAAAATTATACATATTAGGATTTTAGGAGGGTTTTCTGAATCAAACA	
pVvTMMT2-5A	(1294)	GGAAAATTATACATATTAGGATTTTAGGAGGGTTTTCTGAATCAAACA	
pVvTMT2-5B	(1294)	GGAAAATTATACATATTAGGATTTTAGGAGGGTTTTCTGAATCAAACA	
pVvTMMT2-6A	(1295)	GGAAAATTATACATATTAGGATTTTAGGAGGGTTTTCTGAATCAAACA	
		1551	1600
pVvTMT2	(1549)	GGAGATTTACTCGGGATTCGTGCCCTTTTCTCGTTGGATTTTGGTAGTGG	
pVvTMT2-1A	(1342)	GGAGATTTACTCGGGATTCGTGCCCTTTTCTCGTTGGATTTTGGTAGTGG	
pVvTMT2-1B	(1342)	GGAGATTTACTCGGGATTCGTGCCCTTTTCTCGTTGGATTTTGGTAGTGG	
pVvTMMT2-5A	(1344)	GGAGATTTACTCGGGATTCGTGCCCTTTTCTCGTTGGATTTTGGTAGTGG	
pVvTMT2-5B	(1344)	GGAGATTTACTCGGGATTCGTGCCCTTTTCTCGTTGGATTTTGGTAGTGG	
pVvTMMT2-6A	(1345)	GGAGATTTACTCGGGATTCGTGCCCTTTTCTCGTTGGATTTTGGTAGTGG	
		1601	1650
pVvTMT2	(1599)	ATTTTCTCTTGCTTCAAACAATAGAACTGGACTGACCAAAGGGACAAC	
pVvTMT2-1A	(1392)	ATTTTCTCTTGCTTCAAACAATAGAACTGGACTGACCAAAGGGACAAC	
pVvTMT2-1B	(1392)	ATTTTCTCTTGCTTCAAACAATAGAACTGGACTGACCAAAGGGACAAC	
pVvTMMT2-5A	(1394)	ATTTTCTCTTGCTTCAAACAATAGAACTGGACTGACCAAAGGGACAAC	
pVvTMT2-5B	(1394)	ATTTTCTCTTGCTTCAAACAATAGAACTGGACTGACCAAAGGGACAAC	
pVvTMMT2-6A	(1395)	ATTTTCTCTTGCTTCAAACAATAGAACTGGACTGACCAAAGGGACAAC	
		1651	1700
pVvTMT2	(1649)	CAGGTCTCTTATTTAAAAACCGGGCAAAAAAATAGAAAAACAAAAAGA	
pVvTMT2-1A	(1442)	CAGGTCTCTTATTTAAAAACCGGGCAAAAAAATAGAAAAACAAAAAGA	
pVvTMT2-1B	(1442)	CAGGTCTCTTATTTAAAAACCGGGCAAAAAAATAGAAAAACAAAAAGA	
pVvTMMT2-5A	(1444)	CAGGTCTCTTATTTAAAAACCGGGCAAAAAAATAGAAAAACAAAAAGA	
pVvTMT2-5B	(1444)	CAGGTCTCTTATTTAAAAACCGGGCAAAAAAATAGAAAAACAAAAAGA	
pVvTMMT2-6A	(1445)	CAGGTCTCTTATTTAAAAACCGGGCAAAAAAATAGAAAAACAAAAAGA	
		1701	1750
pVvTMT2	(1699)	AAAAAAGGAGAAAAAAACAAGGGTCGTTGTCCATTCTGATTTCTGAAGGG	
pVvTMT2-1A	(1492)	AAAAAAGGAGAAAAAAACAAGGGTCGTTGTCCATTCTGATTTCTGAAGGG	
pVvTMT2-1B	(1492)	AAAAAAGGAGAAAAAAACAAGGGTCGTTGTCCATTCTGATTTCTGAAGGG	
pVvTMMT2-5A	(1494)	AAAAAAGGAGAAAAAAACAAGGGTCGTTGTCCATTCTGATTTCTGAAGGG	
pVvTMT2-5B	(1494)	AAAAAAGGAGAAAAAAACAAGGGTCGTTGTCCATTCTGATTTCTGAAGGG	
pVvTMMT2-6A	(1495)	AAAAAAGGAGAAAAAAACAAGGGTCGTTGTCCATTCTGATTTCTGAAGGG	
		1751	1800
pVvTMT2	(1749)	TAGAAAATGAAAAATCTACAGACCAAGTACAGTGTTCACCGACTTCTTCT	
pVvTMT2-1A	(1542)	TAGAAAATGAAAAATCTACAGACCAAGTACAGTGTTCACCGACTTCTTCT	
pVvTMT2-1B	(1542)	TAGAAAATGAAAAATCTACAGACCAAGTACAGTGTTCACCGACTTCTTCT	
pVvTMMT2-5A	(1544)	TAGAAAATGAAAAATCTACAGACCAAGTACAGTGTTCACCGACTTCTTCT	
pVvTMT2-5B	(1544)	TAGAAAATGAAAAATCTACAGACCAAGTACAGTGTTCACCGACTTCTTCT	
pVvTMMT2-6A	(1545)	TAGAAAATGAAAAATCTACAGACCAAGTACAGTGTTCACCGACTTCTTCT	
		1801	1850
pVvTMT2	(1799)	ATATATTATTCAGGATTAATAAATGGAAAAAGTAAAAAAATGGTGGT	
pVvTMT2-1A	(1592)	ATATATTATTCAGGATTAATAAATGGAAAAAGTAAAAAAATGGTGGT	
pVvTMT2-1B	(1592)	ATATATTATTCAGGATTAATAAATGGAAAAAGTAAAAAAATGGTGGT	
pVvTMMT2-5A	(1594)	ATATATTATTCAGGATTAATAAATGGAAAAAGTAAAAAAATGGTGGT	
pVvTMT2-5B	(1594)	ATATATTATTCAGGATTAATAAATGGAAAAAGTAAAAAAATGGTGGT	
pVvTMMT2-6A	(1595)	ATATATTATTCAGGATTAATAAATGGAAAAAGTAAAAAAATGGTGGT	

	1851		1900
pVvTMT2	(1848)	ACTGTTTGTTTTGGTTTGGTTGGACCGTTTGGAAACTTAAGATTAGTAGG	
pVvTMT2-1A	(1642)	ACTGTTTGTTTTGGTTTGGTTGGACCGTTTGGAAACTTAAGATTAGTAGG	
pVvTMT2-1B	(1642)	ACTGTTTGTTTTGGTTTGGTTGGACCGTTTGGAAACTTAAGATTAGTAGG	
pVvTMMT2-5A	(1644)	ACTGTTTGTTTTGGTTTGGTTGGACCGTTTGGAAACTTAAGATTAGTAGG	
pVvTMT2-5B	(1644)	ACTGTTTGTTTTGGTTTGGTTGGACCGTTTGGAAACTTAAGATTAGTAGG	
pVvTMMT2-6A	(1645)	ACTGTTTGTTTTGGTTTGGTTGGACCGTTTGGAAACTTAAGATTAGTAGG	
		1901	1950
pVvTMT2	(1898)	TTTCAGGTTTAATTAATTAATTTTTTATTCCTTGAATTTTTTATTTATG	
pVvTMT2-1A	(1692)	TTTCAGGTTTAATTAATTAATTTTTTATTCCTTGAATTTTTTATTTATG	
pVvTMT2-1B	(1692)	TTTCAGGTTTAATTAATTAATTTTTTATTCCTTGAATTTTTTATTTATG	
pVvTMMT2-5A	(1694)	TTTCAGGTTTAATTAATTAATTTTTTATTCCTTGAATTTTTTATTTATG	
pVvTMT2-5B	(1694)	TTTCAGGTTTAATTAATTAATTTTTTATTCCTTGAATTTTTTATTTATG	
pVvTMMT2-6A	(1695)	TTTCAGGTTTAATTAATTAATTTTTTATTCCTTGAATTTTTTATTTATG	
		1951	2000
pVvTMT2	(1948)	GGTTTGAGGATTCTGAGATTGGGATTTCTGGGTCTAACCCAATTGGATCT	
pVvTMT2-1A	(1742)	GGTTTGAGGATTCTGAGATTGGGATTTCTGGGTCTAACCCAATTGGATCT	
pVvTMT2-1B	(1742)	GGTTTGAGGATTCTGAGATTGGGATTTCTGGGTCTAACCCAATTGGATCT	
pVvTMMT2-5A	(1744)	GGTTTGAGGATTCTGAGATTGGGATTTCTGGGTCTAACCCAATTGGATCT	
pVvTMT2-5B	(1744)	GGTTTGAGGATTCTGAGATTGGGATTTCTGGGTCTAACCCAATTGGATCT	
pVvTMMT2-6A	(1745)	GGTTTGAGGATTCTGAGATTGGGATTTCTGGGTCTAACCCAATTGGATCT	
		2001	2011
pVvTMT2	(1998)	GAG-----	
pVvTMT2-1A	(1792)	GAGGTTTAAAC	
pVvTMT2-1B	(1792)	GAGGTTTAAAC	
pVvTMMT2-5A	(1794)	GAGGTTTAAAC	
pVvTMT2-5B	(1794)	GAGGTTTAAAC	
pVvTMMT2-6A	(1795)	GAGGTTTAAAC	