

# Expresión de genes de acuaporinas en la baya de vid cv. Sultanina.

## **Analía Antonella Espinoza Contreras**

Memoria para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo Mención: Fruticultura

PROFESORES GUÍAS Manuel Pinto Contreras Ing. Agr. Mg. Sc. Dr. Ing Patricio Hinrichsen Ramírez Bioquímico Dr. Cs. Biológicas PROFESORES CONSEJEROS

Thomas Fichet Lagos Ing. Agr. Dr. Herman Silva Robledo Biólogo Ms. Sc. Dr.

COLABORADOR Alejandro Riquelme Escobar Bioquímico

**Santiago, Chile. 2006**



..	1
<b>FINANCIAMIENTO .</b>	<b>3</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .</b>	<b>5</b>
<b>RESUMEN .</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .</b>	<b>9</b>
<b>Introducción .</b>	<b>11</b>
<b>Objetivo general .</b>	<b>15</b>
<b>Objetivos específicos .</b>	<b>15</b>
<b>MATERIALES Y METODOS .</b>	<b>17</b>
<b>Lugar del estudio .</b>	<b>17</b>
<b>Tratamientos y diseño del ensayo .</b>	<b>17</b>
<b>Desarrollo de las bayas .</b>	<b>18</b>
<b>Extracción y purificación de DNA .</b>	<b>19</b>
<b>Cuantificación y determinación de la calidad del DNA .</b>	<b>19</b>
<b>Preparación de sondas . .</b>	<b>20</b>
<b>Diseño de Partidores . .</b>	<b>20</b>
<b>Amplificación por PCR de fragmentos de acuaporinas . .</b>	<b>20</b>
<b>Clonamiento y secuenciación de fragmentos de acuaporinas obtenidos por PCR . .</b>	<b>20</b>
<b>Ligación de los fragmentos de acuaporinas y transformación de bacterias competentes . .</b>	<b>21</b>
<b>Confirmación por PCR de la presencia del fragmento del gen de acuaporina .</b>	<b>21</b>
<b>Extracción de plasmidios .</b>	<b>21</b>
<b>Secuenciación y alineación de secuencias .</b>	<b>22</b>
<b>Análisis de secuencias .</b>	<b>22</b>
<b>Southern blot . .</b>	<b>22</b>
<b>Marcación de Sondas .</b>	<b>22</b>

Hibridaciones . . .	23
Revelado . . .	23
Preparaciones de RNA .	23
Extracción y purificación de RNA .	23
Cuantificación de RNA y determinación de su calidad .	24
Northern blot .	24
Análisis estadístico . .	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .	27
Efecto del GA <sub>3</sub> en el crecimiento y transporte de agua hacia las bayas .	27
Identificación y clonación de genes de acuaporinas .	31
Análisis de secuencias de acuaporina para el diseño de partidores . .	31
Análisis de secuencias de las acuaporinas obtenidas. . .	33
Determinación de la expresión de genes de acuaporina .	36
Diseño de sondas para genes de la familia PIP .	36
Diseño de sondas para genes de la familia TIP1 .	37
Determinación del número de copias de los genes de acuaporinas .	38
Caracterización de los perfiles transcripcionales de los genes PIP1 y TIP1 .	40
Conclusiones .	45
LITERATURA CITADA .	47

---

*Dedicada al esfuerzo de mis Padres*



## FINANCIAMIENTO

Tesis financiada por el Programa Genoma-Chile: Plataforma Científica - Tecnológica para el desarrollo de la Genómica Vegetal en Chile. Etapa 1: Genómica Funcional en VID. (FONDEF G02P1002).





## AGRADECIMIENTOS

Al comenzar escribir estas palabras se pasan por mi mente muchos nombres de personas muy importante en mi desarrollo personal, el que influencio de gran modo mi desarrollo académico e intelectual, sin ellos no hubiese llegado a estas instancias, por lo cual le pido miles de disculpas por no estar plasmados sus nombres en el papel pero quiero que sepan que a todos los llevo a todos en mi corazón, y muchas gracias por el tiempo compartido.

Quiero comenzar a agradecer por su confianza Manuel Pinto y Alejandro Riquelme por dar la instancia de desarrollar un tema en biotecnología. A Patricio Hinrichsen por su gran confianza y acogida sin prejuicio sobre mi desarrollo en el laboratorio. A Ramón Pérez quiero agradecerse infinita paciencia para iniciarme en el desarrollo de la tesis y por su amistad. A Carlos Aguirre, aunque nos costo terminamos siendo un gran equipo de trabajo junto a Ramón. A Marcelo Orellana por su ayuda en el campo. A Álvaro Castro por enseñarme todos los datos rosa en el laboratorio, siempre útiles. A Humberto Prieto por las demostrarme que se puede tener pasión a la investigación y vivir de esto. A Marlene rosales por su preocupación desinteresada por mi trabajo. A Fernando Reyes por su numerosa ayuda en el desarrollo de técnicas y Análisis estadístico. Y por su amistad y hacer mas agradable mi estadía en la Platina a Erich Palma, Luz, m<sup>a</sup> Herminia, M<sup>a</sup> Antonieta, Erica y Yanina, esta de más decir que las personas antes nombradas hicieron gran aporte en este sentido.

Seria un crimen no nombrar a la gente del laboratorio de Microbiología donde hice mi practica profesional a Rodrigo Herrera, Rodrigo Reyes, Miguel Bravo, la Sra. Lula y el Profesor Jaime Montealegre, donde cultive una gran amistad.

Además no quiero dejar pasar esta instancia sin nombrar a la plana ejecutiva que hizo lo suyo en los vaivenes de esta carrera, por todas las noches de estudio, practicas, salida a terreno, carretes, pelás de cable, etc.

A Patricia Arévalo por darme la idea de postular agronomía cuando no tenia ni idea de que hacer mi vida y ser mi gran amiga de siempre.

A mi prima Lali, Laura Cabellos por su preocupación y su cariño a quien le dedico en parte mi tesis por su labor en la Universidad.

Y para terminar quiero agradecer a mi Esposo que lo amo con todo mi corazón, y a mi hijo la Luz de mi vida, Gustavo. A mis Padres por todo, no tengo como pagarles y a Dios por dame todo esto y más.



---

## RESUMEN

Durante el crecimiento de las bayas de la vid se observa una marcada acumulación de azúcares y agua después del envero. Este incremento en el contenido de agua de la baya, involucraría un sistema de transporte a través del floema del raquis del racimo dado que el xilema colapsaría, al inicio del envero. Por lo tanto, el transporte de agua por el floema forzosamente implicaría un transporte a través de membranas. Al mismo tiempo se ha observado que la aplicación de giberelinas aumenta la acumulación de agua en la baya. En variedades de uva viníferas, en bayas cercanas al envero aumentan la expresión de acuaporinas, proteínas que forman canales de agua en la membrana plasmática y en el tonoplasto. Por otra parte, estudios realizados en otras especies indicarían que, probablemente, algunas fitohormonas podrían estar implicadas en la expresión de estas proteínas.

En consideración con lo señalado, esta investigación postula como hipótesis, que la aplicación de giberelinas aumenta el contenido de agua en la baya dado que afecta la expresión de las acuaporinas en las bayas y con ello el transporte de agua a través de membranas. El objetivo central fue analizar la expresión de las acuaporinas durante el crecimiento de bayas de vid var. Sultanina y determinar el efecto de la aplicación de ácido giberélico en la expresión de los genes que las codifican. Para ello, se diseñaron partidores adecuados usando la información disponible en bases de datos de libre acceso. Se clonaron fragmentos de genes integrantes de la Familia PIP1, PIP2 y TIP1. En estos fragmentos se identificaron secuencias codificantes e intrones, y se diseñaron sondas que hibridaron sólo con segmentos de los exones. Con estas sondas se realizaron en primer lugar ensayos de Southern blot, para evaluar el número de copias de cada gen en estudio. En condiciones de menor a mayor estrictez, los tres genes presentaron una banda única aunque esto no fue claramente resuelto en el caso de PIP2. Para lograr la expresión de estos genes mediante Northern blot se obtuvieron muestras cada semana desde el estado de botón floral hasta una semana después del colapso del xilema, fenómeno que se confirmó mediante evaluación de la funcionalidad de los vasos xilemáticos. Los análisis se efectuaron en muestras de bayas obtenidas de racimos tratados con GA<sub>3</sub> (dosis comercial, 165 ppm) y muestreados luego de 24 y 72 horas de la aplicación, y racimos de plantas sin aplicación de GA<sub>3</sub>, control. Los resultados mostraron que los genes cambian su expresión a medida que progresa el desarrollo y aumenta el tamaño de las bayas

Palabras claves: *Vitis vinifera* L, acuaporinas, transporte de agua, canales de agua, proteínas intrínsecas a la membrana plasmática, proteínas intrínsecas al tonoplasto.



## ABSTRACT

In grapevines there is a pronounced accumulation of sugar and water just after the veraison. This increase in the water content of the berry, would involve the participation of an active membrane transport system of transport across the phloem of the rachis, provided that the xylem would collapse by the beginning of the veraison. At the same time has been observed that the application of gibberellins increases the water accumulation in the berry. In wine varieties of grape, increase the expression of aquaporins in berries near to the veraison, that proteins form water channels in the plasmatic membrane and in the tonoplast. On the other hand, studies realized in other species would indicate that, probably, some phytohormones might be involved in the expression of these proteins.

This investigation postulates as hypothesis, exogenous application of gibberellins acid affects the expression of the aquaporins in the berries and increases the water content in the berry with it the transport waters down to slant membranes. There was analyzed the expression of the aquaporins during the berries development of grapevine var. Sultanina and in response to exogenous application of the phytohormone in different stages of the berries. For it, were designed primers using the available information in bases of information of free access. Cloned fragments of integral genes of the Family PIP1, PIP2 and TIP1. In these fragments sequences were identified codings and introns, by what probes were designed that hybridization only with the exons. With these probes essays of Southern blot were realized first, to evaluate the number of copies of every gene in study. In minor's conditions to major primness, three genes presented the only band though this was not clearly solved in case of PIP2. For it achieves the expression of these genes by means of Northern blot samples were obtained every week from the state of flower bud up to one week after the collapse of the xylem, phenomenon that was confirmed by means of evaluation of the functionality of the xylems glasses. The analyses were carried out in samples of obtained berries of bunches treated with GA<sub>3</sub> (commercial dose, 165 ppm) and sampling after 24 and 72 hours of the application, and bunches of plants without application of GA<sub>3</sub>, as control. The results show that the genes decrease his expression as it increases the size of the berries.

Keywords: *Vitis vinifera*, aquaporins, water transport, water channel, plasma membrane intrinsic protein, tonoplast intrinsic protein.



# Introducción

La uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) variedad Sultanina es la más cultivada en Chile (Gámez, 2005). Para obtener un tamaño de bayas adecuado para su comercialización, requiere de aplicaciones exógenas de ácido giberélico ( $GA_3$ ) para alcanzar un diámetro comercial, debido a que es una variedad estenoespermocárpica (Weaber, 1958).

El crecimiento de la baya de la vid presenta tres etapas, conformando una curva doble sigmoidea. La primera etapa de desarrollo sucede a la floración y a la fertilización de los óvulos y en ella se observa una activa división celular seguida por un marcado crecimiento de las vacuolas, debido a la acumulación de ácidos orgánicos (ácidos tartárico y málico). La baya es fotosintéticamente activa y sus estomas son funcionales, y se conecta principalmente vía vasos xilemáticos para la importación de agua y solutos. La entrada al segundo período, comienza con la maduración de las semillas, luego del envero, aproximadamente 60 días después de plena floración (ddpf). En la tercera fase, el crecimiento aumenta debido a la expansión celular en ausencia de división celular, mostrando una gran acumulación de azúcares, iones minerales y una disminución de los ácidos orgánicos, esencialmente debido a la degradación del malato, lo que depende funcionalmente del floema (Figura 1)(Coombe, 1992).

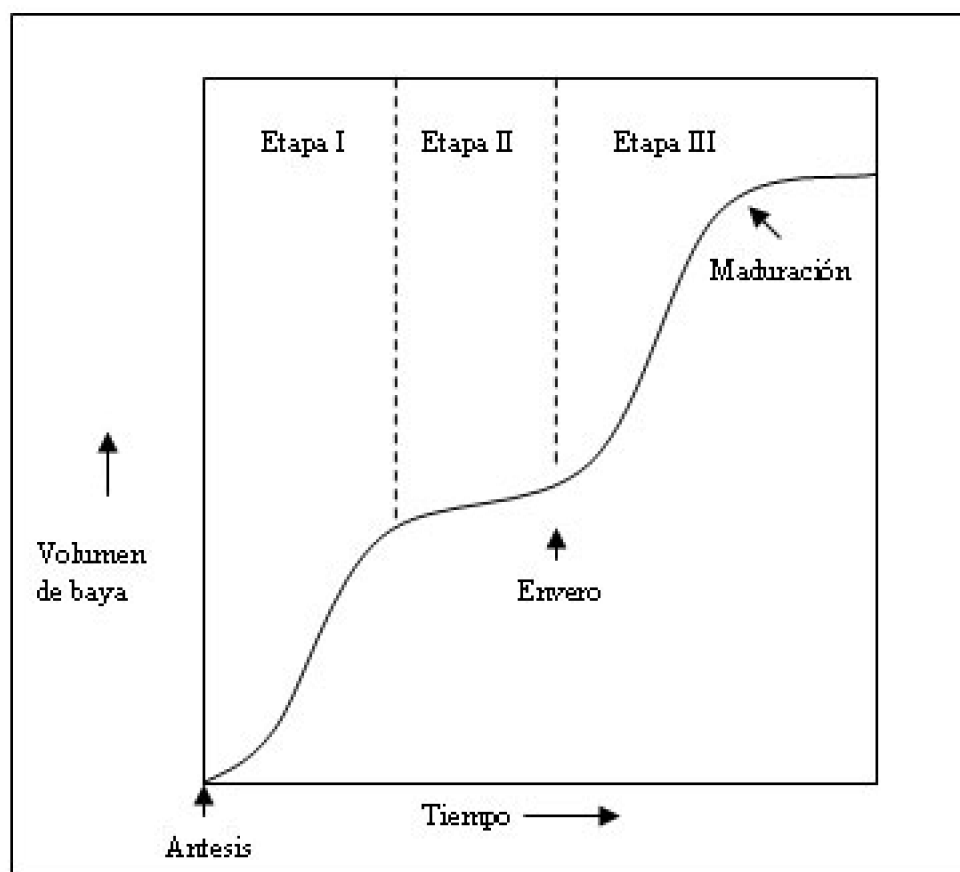


Figura 1. Etapas del desarrollo de la baya de vid. Adaptado de Coombe (1992)

A la maduración, el agua representa el 90% del peso de la baya, por lo que es un factor preponderante para obtener fruta de buen calibre. El transporte de agua en los tejidos vegetales normalmente es realizado por el xilema y escasamente por el floema. Sin embargo, en la baya, luego del envero el xilema en la baya sufre una interrupción, disminuyendo el transporte de agua por esta ruta, por lo cual aumentaría el paso del agua vía floema (Lang y Torpe, 1989). El transporte floemático es a través de células vivas, lo que implica transporte a través de membranas y, por lo tanto, la posible participación de canales de agua formados por proteínas específicas, como las acuaporinas.

Las acuaporinas son proteínas presentes en todos los organismos vivos. Su función es incrementar la conductividad hidráulica a través de las membranas celulares con bajo gasto de energía (Agre *et al.*, 1993; Maurel y Chrispeels, 2001; Tyerman *et al.*, 2002). Estas proteínas pertenecen a una gran familia llamada *Major Intrinsic Proteins* (MIP), las que de acuerdo a su ubicación y función, han sido descritas en plantas por numerosos autores desde su descubrimiento en 1992 (Preston *et al.*, 1992; Chrispeels y Maurel, 1994; Maurel y Chrispeels 2001; Johanson *et al.*, 2001; Tyerman *et al.*, 2002). Comparadas con otros transportadores y canales iónicos, las acuaporinas son muy abundantes en la membrana plasmática y en el tonoplasto. Estos canales de agua jugarían un papel importante en la respuesta de las plantas a la sequía, ajuste osmótico y adaptación a estrés hídrico de la membrana plasmática y tonoplástica. Esto debido a que las acuaporinas incrementarían la permeabilidad de membrana, acelerando el transporte



de agua (Kjellbom *et al.*, 1999). Esto se ha demostrado gracias a ensayos *in vivo* realizados con oocitos de *Xenopus laevis*, los cuales al ser inyectados con cRNA de acuaporinas incrementan su volumen (Maurel, 1997).

En plantas, las MIPs se han clasificado de acuerdo a niveles de homología a determinadas secuencias de aminoácidos, y de acuerdo a los genes que se han identificado en el genoma de *Arabidopsis thaliana*. Dos subfamilias de MIPs han recibido su nombre de acuerdo a su localización en la célula: Proteínas intrínsecas de la membrana plasmática (*Plasma membrane Intrinsic Proteins*, PIPs), y proteínas intrínsecas del tonoplasto (*Tonoplast Intrinsic Proteins*, TIPs) (Johanson *et al.*, 2001).

Las acuaporinas presentan una estructura que contiene seis dominios de transmembrana en  $\alpha$ -hélice, con los extremos amino y carboxilo del lado citoplasmático. Entre los bucles B y E se presenta un motivo conservado que contiene aspargina–prolina–alanina (NPA) (Maurel y Chrispeels, 2001), como muestra la Figura 2.

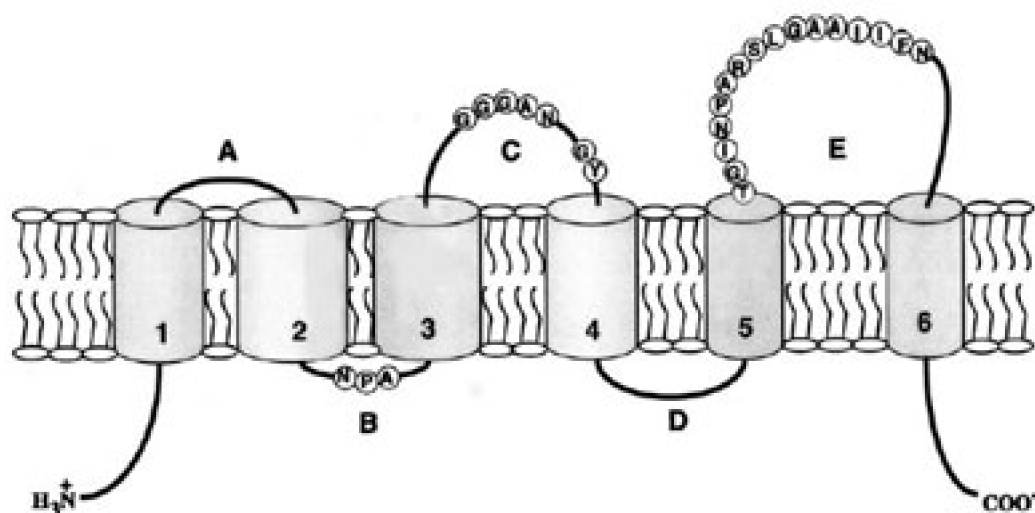


Figura 2. Esquema representativo de una acuaporina. 1-6 dominios de transmembrana A-E bucles o vueltas presentes en las acuaporinas, (Barone *et al.*, 1997).

Un número considerable de genes de esta familia han sido secuenciados y varios miembros han sido estudiados por cristalografía y microscopía electrónica, para determinar la estructura tridimensional de estas moléculas (Heymann y Engel., 2000). En *Arabidopsis thaliana* se han descrito 35 acuaporinas, entre las cuales hay 13 PIP y 10 TIP (Johanson *et al.*, 2001, Quigley *et al.*, 2001). En maíz se han descrito 31 genes que codifican para acuaporinas pertenecientes a cuatro subfamilias (Chaumont *et al.*, 2001), un grupo localizado en los tonoplastos (Chaumont *et al.*, 1998) y otro en la membrana plasmática (PIPs). Estos últimos, se separan a su vez en dos grupos, dependiendo de la alta (PIP2) o baja (PIP1) permeabilidad de los canales de agua formados (Chaumont *et al.*, 2000).

Se ha visto que durante el desarrollo de órganos vegetales, algunas acuaporinas cambian su nivel de expresión, por ejemplo en flores de maíz, luego de la fertilización de los óvulos, durante el desarrollo del pistilo y posterior desarrollo de los granos, se ha observado un aumento de la expresión de acuaporina tipo TIP1, (Barrieu *et al.*, 1998).

Ello confirma que en general, esta proteína aumenta su expresión en tejidos con alta división y elongación celular, como raíces, hojas y tejido reproductivo (Chaumont *et al.*, 1998).

Estudios realizados en tabaco transgénico, para analizar la función de genes acuaporina PIP1 de *Arabidopsis thaliana*, demostraron que bajo condiciones favorables para el crecimiento, en estas plantas la expresión de esta proteína aumenta y además se incrementan los estomas y el consumo de agua. Esta expresión no sería positiva en condiciones de estrés, ya que aceleraría la marchitez de las plantas (Aarón *et al.*, 2003).

En el patrón Richter-110 (*Vitis berlandieri* P. x *Vitis rupestris* S.) se caracterizó la secuencia de aminoácidos de las acuaporinas PIP1 y TIP1, observándose, además, una alta expresión de todas ellas en tejidos jóvenes y raíces, y una disminución en tallos y hojas (Baiges *et al.*, 2001).

Picaud *et al.*, (2003) clonaron dos acuaporinas de la membrana plasmática expresadas durante la maduración de bayas de la vid de tres cepas de vid para vinificación (Chardonnay, Pinot meunier y Ugni blanc), encontrando que PIP1 es principalmente expresada en bayas después del envero, cuando el xilema pierde su continuidad, por lo que sugieren que estas proteínas estarían involucradas en los cambios del equilibrio hídrico que acompaña la maduración de las bayas y la acumulación de azúcares.

Aplicaciones exógenas de ácido giberélico ( $GA_3$ ) promueven la elongación, proliferación y diferenciación celular, además de otros procesos fisiológicos (Yang *et al.*, 2003) Por ejemplo en raíces de rábano se ha informado que los niveles de PIP2 están regulados por fitohormonas, ya que al aplicar  $GA_3$  disminuye la expresión de este gen. En contraste con acuaporinas PIP1 y TIP1 que presentan expresión constitutiva (Schuurmans *et al.*, 2003). En *Arabidopsis thaliana* la expresión de una acuaporina TIP muestra un aumento regulado por  $GA_3$  (Yang *et al.*, 2003).

Considerando estos antecedentes, se clonaron genes de PIP y TIP de uva de mesa cv. Sultanina y se estudió su expresión en bayas de plantas con y sin aplicación de  $GA_3$ , para detectar una posible relación entre el aumento del tamaño de las bayas causado por la aplicación de ácido giberélico y la expresión de las acuaporinas, así como para verificar si algunas de estas acuaporinas presentaban expresión constitutiva independiente de la aplicación de  $GA_3$ .

En base a lo anterior la hipótesis de este estudio fue la siguiente:

En vid el aumento en la incorporación de agua en la baya después del envero, cuando los vasos xilemáticos han perdido su funcionalidad, está mediado por transportadores específicos de tipo acuaporinas ubicados en las membranas floemáticas y cuyos genes aumentan su expresión antes o durante este proceso. Por otra parte, el contenido de agua aumenta en bayas tratadas con ácido giberélico respecto del contenido de bayas no tratadas. Esto indicaría que las giberelinas tendrían un papel importante en el control de la expresión de genes de algunas acuaporinas.

## Objetivo general

Evaluar los niveles de expresión de genes de acuaporinas en diferentes etapas del desarrollo de bayas del cultivar Sultanina tratadas y no tratadas con ácido giberélico.

## Objetivos específicos

---

- - Identificar genes homólogos (de vid) y heterólogos (de otras especies) para diseñar partidores de PCR que reconozcan genes de acuaporinas de vid, cv. Sultanina.
- - Obtener sondas de cDNA de acuaporinas de vid para experimentos de Southern y Northern blot.
- - Determinar el número de copias de cada uno de los genes clonados mediante Southern blotting
- - Evaluar los niveles de expresión de genes de acuaporinas hojas y racimos de vid tratados y no tratados con ácido giberélico.
- - Evaluar los niveles de expresión de genes de acuaporina en las diferentes etapas del desarrollo de la baya de vid considerando etapas tempranas y el período cercano al envero.



# MATERIALES Y METODOS

## Lugar del estudio

Esta investigación se realizó en el parrón experimental, de siete años de edad de la variedad Sultanina, del Laboratorio de Bioquímica, de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile y en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Experimental La Platina, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA.

## Tratamientos y diseño del ensayo

Los tratamientos de ácido giberélico ( $GA_3$ ) (Cuadro1). Fueron: el primer tratamiento (T1) consistió en aplicaciones de  $GA_3$  para elongación de escobajo, raleo de flores en dosis de 15 ppm cada uno y para crecimiento de baya en tres oportunidades de 40 ppm cada una. El segundo tratamiento (T2) no recibió ninguna aplicación de  $GA_3$ .

Las muestras se recolectaron entre los meses de octubre del 2003 y enero del 2004 y los diferentes análisis se realizaron desde la fecha de recolección hasta septiembre del 2005. Muestras de hojas y bayas de vid, se colectaron luego de la aplicación de  $GA_3$

para elongación de escobajo como de cada aplicación para el crecimiento de las bayas. En cada oportunidad los racimos fueron muestreados 24 y 72 horas después de la aplicación del GA<sub>3</sub>. En el caso del tratamiento sin aplicación de GA<sub>3</sub> (T2) el muestreo se efectuó luego de 24 horas de la aplicación de GA<sub>3</sub> a T1. Además se recolectó material una semana antes, durante y una semana después del envero en ambos tratamientos.

Cuadro 1. Aplicaciones de GA<sub>3</sub> y muestreos de los tratamientos en uva variedad Sultanina.

Nº	Etapas de aplicación de GA <sub>3</sub>	Concentración de GA <sub>3</sub>	Muestreo T1 y T2
1	Elongación de escobajo	15 ppm	X
2	5% de flor	15 ppm	
3	85% de flor	15 ppm	
4	4 mm ø de baya	40 ppm	X
5	6 mm ø de baya	40 ppm	X
6	8 mm ø de baya	40 ppm	X
7	1 semana antes del envero	0	X
8	Envero	0	X
9	1 semana después del envero	0	X

## Desarrollo de las bayas

Para determinar el estado fenológico en que se expresa el mRNA de acuaporinas en las bayas, se midieron durante todo el desarrollo del ensayo, parámetros como: evolución del volumen de las bayas, evolución del peso fresco y seco; evolución de sólidos solubles y contenido de agua, y el momento en que se produjo el colapso del xilema y el envero.

El volumen de las bayas se determinó por el desplazamiento de agua que se generó al introducir 10 bayas en una probeta graduada. Esta medición se repitió durante todo el período de crecimiento.

Para la determinación del peso fresco y peso seco, al igual que en las mediciones anteriores, se extrajeron 10 bayas por cada repetición. Las bayas se pesaron inmediatamente, para evitar la deshidratación. Luego estas bayas se secaron en una estufa a 75° C hasta alcanzar un peso constante. Cada dato fue registrado para finalmente obtener el contenido de agua al hacer diferencia entre los pesos.

La evolución del diámetro ecuatorial y polar de las bayas, durante todo su crecimiento fue medida *in situ* y se utilizaron las mismas bayas para medir sólidos solubles mediante reflectometría.

El momento del colapso del xilema o inicio del envero se determinó con el método de absorción de tinta descrito por Rogiers *et al.*, (2001), quien determinó que para la variedad Sultanina el colapso del xilema ocurre 60 días después de plena flor. Para este ensayo se extrajeron hombros de racimos con aproximadamente cinco bayas cada uno, las que fueron desprendidas con su pedicelo bajo el agua para evitar la embolia del

xilema. Las bayas se colocaron con su pedicelo inmerso en una solución de negro amida al 0,15%. Con el fin de favorecer la transpiración y la absorción de tinta, el ensayo se efectuó en un ambiente con movimiento de aire, lo cual se logró con un ventilador. Luego de 20 minutos se evaluó a la lupa el número de haces vasculares que estaban teñidos, haciendo cortes a nivel medio de la baya para lo cual estas se disectaron en la zona ecuatorial. Todo haz teñido con la solución se consideró funcional. El número de haces funcionales de xilema se determinó hasta el envero.

## Extracción y purificación de DNA

El DNA fue aislado por el protocolo descrito por Steenkamp *et al.*, (1994) donde hojas nuevas de vid (1,5 g) fueron molidas hasta polvo fino en presencia de nitrógeno líquido. Luego se transfirió el tejido a un tubo falcon<sup>®</sup> de 50 ml, para adicionar 7,5 ml de tampón de extracción (CTAB 3% p/v; Tris-HCl 1M pH 8; NaCl 1,4 M; y EDTA 20 mM), 15  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol y una punta de espátula de PVP. Se incubó por 30 minutos a 60°C moviendo esporádicamente. Luego se extrajo con igual volumen de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, mezclando durante 10 minutos por inversión, centrifugándose a continuación a 7.500 rpm por 40 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa en un nuevo tubo y se adicionó 2/3 volúmenes de isopropanol frío (0–4°C), moviéndose lentamente hasta que precipitó el DNA. Este se recuperó con una pipeta Pasteur y se transfirió a un tubo que contenía 20 ml de tampón de lavado (etanol 76% v/v NH<sub>4</sub>Ac 10 mM). Se lavó en esta solución hasta que el precipitado cambió a color blanco. Posteriormente se retiró el sobrenadante con una micropipeta, evitando tomar el precipitado y se dejó secar a temperatura ambiente. El DNA fue disuelto en 1 ml de ddH<sub>2</sub>O y 10  $\mu$ L de RNasa (concentración final, 10  $\mu$ g/ml), e incubado a 37 °C por 30 minutos. A esta mezcla se agregó 2 volúmenes de ddH<sub>2</sub>O, 1/10 de volumen de NH<sub>4</sub>Ac 7,5 M y 2 volúmenes de etanol frío. Finalmente después de que el DNA precipitó, se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, se seco el pellet en baño seco y se resuspendió en 1 ml de ddH<sub>2</sub>O.

## Cuantificación y determinación de la calidad del DNA

La calidad del DNA se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (p/v). La electroforesis se realizó en solución amortiguadora TAE 1X (Tris-HCl 40 mM, pH 7.4, acetato de sodio 20 mM, EDTA 1 mM) (Sambrook *et al.*, 1989) a 100 V. El DNA se visualizó por tinción con bromuro de etidio y exposición a luz UV. Posteriormente se cuantificó el DNA obtenido por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm (relación DNA/proteínas), utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-160.

## Preparación de sondas

### Diseño de Partidores

---

Con el fin de diseñar partidores que amplifiquen fragmentos de genes de acuaporinas, se buscaron secuencias de éstos en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Estas secuencias posteriormente fueron alineadas mediante el programa OMIGA 2.0 (Rainbow Technologies, Oxford Molecular Ltd.), para determinar regiones conservadas en distintas especies.

Aprovechando la conservación de estas regiones a lo largo de distintas especies, se diseñaron los partidores según los siguientes criterios: porcentaje de citosina (C) y guanina (G), largo de cada partidor y extremo 3' terminado en C o G.

### Amplificación por PCR de fragmentos de acuaporinas

---

Para cada gen se diseñaron distintos partidores directos y reversos, probándose cada par en distintas condiciones de amplificación, las cuales incluyeron concentración de  $Mg^{+2}$  (1,0, 1,5 y 2,0 mM), gradiente de temperatura entre 50°C y 60°C y distintas diluciones de DNA. Además, se usaron distintas concentraciones de partidores, considerando que el número de degeneraciones requería de hasta 100 veces para alcanzar la concentración efectiva de cada secuencia que compone la mezcla sintetizada. Luego de encontrar el par apropiado para cada gen y su concentración mínima, las reacciones de PCR para la clonación se realizaron conforme al siguiente ciclo térmico: 5 minutos a 94°C, luego 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 58°C ( $\pm$  3°C) por 1 minuto y 72°C por 70 segundos, y finalmente 10 minutos a 72°C.

Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa, corrido a 100 V, para lo cual se cargaron 5  $\mu$ L de producto de PCR en un gel de agarosa al 1% en solución tampón TBE 1X (Sambrook *et al.*, 1989). El amplificado se visualizó por tinción del gel con bromuro de etidio y exposición a luz UV.

### Clonamiento y secuenciación de fragmentos de acuaporinas obtenidos por PCR

---

Cuando se obtuvo un amplificado del tamaño esperado se separó en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X. Las bandas de interés se cortaron con bisturí y se pesaron en tubos de microcentrífuga, a los cuales posteriormente se agregaron 3 volúmenes de NaI 6M y se incubaron a 55 °C para fundir el gel de agarosa. En este paso se agregaron 10  $\mu$ L de sílica gel y se invirtió cada tubo para mezclar. Luego, los tubos se dejaron en hielo durante 15 minutos, se centrifugaron durante algunos segundos a máxima velocidad en



---

una microcentrífuga Eppendorf 5415C y se descartó el sobrenadante. Se lavó y resuspendió el precipitado obtenido en 500  $\mu$ L de solución de lavado. Se centrifugó durante algunos segundos, y se descartó el sobrenadante (se repitió este paso dos veces). El precipitado final se resuspendió en 40  $\mu$ L de agua bidestilada a 55°C, se centrifugó brevemente, y se recuperó el sobrenadante con el DNA purificado (Sambrook *et al.*, 1989).

## Ligación de los fragmentos de acuaporinas y transformación de bacterias competentes

---

Para la clonación de los fragmentos de acuaporina amplificados por PCR, se utilizó el vector comercial p-GEM-T Easy System I® (Promega, Madison, WI, EE.UU). El producto de amplificación ya purificado se ligó al plasmidio utilizando 3,5  $\mu$ L de producto de PCR, 5  $\mu$ L de solución tampón de ligación 2X, 0,5  $\mu$ L de plasmidio 1  $\mu$ L de DNA ligasa de fago T4. Esta mezcla se incubó durante 16 horas a 16°C y posteriormente se utilizó esta mezcla de reacción para transformar bacterias de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes.

Para la transformación, se incubaron 100  $\mu$ L de células competentes DH5 $\alpha$  y 7  $\mu$ L de producto de ligación durante 30 minutos a 4 °C (en hielo), seguida de un shock térmico de 90 segundos en baño María a 42 °C, más 5 minutos de enfriamiento en hielo a 4°C; luego, las células se recuperaron del shock térmico mediante una incubación a 37 °C durante 60 minutos. Las células se sembraron finalmente en placas Petri con 25 ml de medio sólido LB (1,5 % de agar) con X-gal e IPTG (para distinguir colonias blancas positivas y azules negativas) y carbenicilina 50 mg/ml (antibiótico selectivo para bacterias transformadas con p-GEM T easy, portador del gen de resistencia  $\beta$ -lactamasa) (Sambrook *et al.*, 1989).

## Confirmación por PCR de la presencia del fragmento del gen de acuaporina

---

Se analizó un número de colonias blancas recombinantes mediante PCR ,ocupando partidores universales M13, los cuales se anclan en sectores aledaños al sitio de policlonamiento del vector, utilizando como templado DNA de las colonias y verificando el tamaño del amplicón obtenido.

## Extracción de plasmidios

---

Cada una de las colonias que resultaron positivas tanto en el rastreo como en el control mediante PCR de confirmación de presencia del inserto, se cultivaron en 3 ml de medio LB con carbenicilina (50  $\mu$ g/ml) durante 16 horas a 37°C, con una agitación de 200 rpm. De los inóculos en fase estacionaria se tomaron 1,5 ml que se utilizaron para la extracción de plasmidios con el sistema comercial “FastPlasmid Mini $\alpha$ ” (Eppendorf NY, EE. UU.) según indicaciones del proveedor.

## Secuenciación y alineación de secuencias

---

Los plasmidios obtenidos que contenían el fragmento insertado, se enviaron a secuenciar a los servicios de secuenciación de Macrogen Inc. (Chongro-ku, Seúl, Corea). Se secuenciaron mediante amplificación utilizando partidores universales M13, en un equipo ABI-Prism 3700 (Applied Biosystems, Seúl, Corea). En general, los fragmentos clonados permitieron lecturas directas de secuencia de hasta 850 nucleótidos.

## Análisis de secuencias

---

La determinación de secuencias codificantes se realizó mediante el programa Genesplicer ([http://www.tigr.org/tdb/GeneSplicer/gene\\_spl.html](http://www.tigr.org/tdb/GeneSplicer/gene_spl.html)) el cual identifica sitios dadores y aceptores de procesamiento en relación a patrones descritos en *A. thaliana* y arroz. Posteriormente se realizó una comparación de las secuencias de nucleótidos mediante un BlastX, procedimiento disponible en la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (National Center of Biotechnology Information, EE.UU.) que permite la comparación de la secuencia nucleotídica ingresada por el usuario, con secuencias de proteínas presentes en Genbank. La traducción de la secuencia *in silico*, se realizó mediante el programa OMIGA® eliminando los putativos intrones y analizando cada posible marco de lectura. Luego se realizó una comparación de secuencias aminoacídicas utilizando BlastP, con otras proteínas descritas en la base de datos de Genbank. El análisis filogenético que involucra distintas especies vegetales, sólo comprendió las regiones equivalentes en ubicación y largo, a las clonadas en este trabajo, por lo tanto la construcción de los árboles filogenéticos no representó el largo total de las proteínas para cada especie.

## Southern blot

El DNA genómico fue extraído de hojas de plantas adultas de la variedad Sultanina, del cual 25 µg fueron digeridos utilizando las enzimas de restricción EcoRV, HindIII y digestiones dobles de estas enzimas con el respectivo tampón según indicaciones del fabricante (New England Biolabs, MA, EE.UU). Posteriormente cada reacción fue precipitada en etanol y acetato de amonio (Sambrook *et al.*, 1989). Las digestiones se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en tampon TAE 1X a 80 V por 6 horas, se tiñó con bromuro de etidio y se observó el resultado sobre luz UV. Posteriormente se transfirió por capilaridad con buffer 20X SSC (3M NaCl 0.3M citrato tri-sódico 2.H<sub>2</sub>O) toda la noche a una membrana de nylon (Hybond N+, Amersham Biosciences, General Electric NY. EE.UU.) según indicaciones del fabricante. Después de ocurrida la transferencia se fijó el DNA a la membrana mediante irradiación con luz UV 90 segundos.

---

## Marcación de Sondas

---

Los distintos fragmentos amplificados que se utilizaron como sondas, fueron marcados con biotina, según indicaciones del fabricante, mediante el kit Bioprime DNA-labeling System<sup>®</sup> (Invitrogen). Luego las sondas fueron purificadas con el kit Centriprepcolumn<sup>®</sup> (Princeton Separation, New Jersey, EE.UU).

---

## Hibridaciones

---

Las membranas se procesaron en frascos de vidrio usando un horno de hibridación por una hora a 42°C con una solución de Denhart 5X, SSC 5X, 0,5 % SDS, 100µg ml<sup>-1</sup> de DNA de espermio de salmón y formamida al 50% v/v. Las hibridaciones con marca fría se realizaron por 18 horas a 42°C en una solución de Denhart 5X, SSC5X, 0,5 % SDS, 10µl de sonda y formamida al 50% v/v. Luego para evitar las hibridaciones inespecíficas se realizaron dos lavados de baja estrictez (SSC 2X y 0,1 % SDS) por 5 minutos a 42°C, dos lavados de mediana estrictez (SSC 1X y 0,1 % SDS) por 10 minutos a 42°C, y un lavado en caso de ser necesario de alta estrictez (SSC 0,1X y 0,1% SDS) por 10 minutos a 42°C. Todos los lavados se realizaron en botella (Sambrook *et al.*, 1989).

---

## Revelado

---

Los experimentos realizados con marcación por biotina, se revelaron con el kit Photop-Star Detection Kit<sup>®</sup> (New England BioLabs, MA, EE.UU) según indicaciones del fabricante, para permitir la reacción quimioluminiscente. La membrana fue expuesta sobre una película Kodak, usando un cassette de exposición 30 minutos a temperatura ambiente.

## Preparaciones de RNA

---

### Extracción y purificación de RNA

---

Cinco gramos de tejido congelado de distintos estados de desarrollo de baya, fueron molidos en un mortero enfriado por nitrógeno líquido, hasta pulverizar la muestra. Esta se agregó a un tubo de 50 ml que contenía 10 ml de solución amortiguadora de perclorato de sodio 5M y 300 µl de β-mercaptoetanol. Se agitó a 400 rpm a temperatura ambiente en posición horizontal por 40 minutos. Posteriormente, esta muestra se filtró al vacío utilizando una jeringa de 50 ml a través de un filtro de Miracloth seguida de una columna de lana de vidrio. A continuación se agregó a la columna una solución amortiguadora modificada de perclorato 5M, obteniendo una muestra sin partículas sólidas. Luego se centrifugó a 6.500 rpm a 4 °C en centrífuga Heraeus (Suprafuge 22) por 20 minutos. Se

recuperó el sobrenadante, el cual fue transferido a un nuevo tubo de 50 ml y se adicionó 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, dejándose precipitar durante 30 minutos a -20 °C. Pasado este tiempo, se centrifugó por 20 minutos a 6.500 rpm a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. El pellet obtenido, fue resuspendido en 1ml de agua DEPC autoclavada y transferido a un tubo eppendorf de 2 ml. Se extrajo esta muestra tres veces con 1 ml de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) centrifugando en cada ocasión a 14.000 rpm por 5 minutos en una centrifuga Kubota (modelo 1700) y recuperando la fase acuosa. Se realizó una última extracción con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) en las mismas condiciones de centrifugación. A la fase acuosa recuperada, se le adicionó ¼ de volumen de cloruro de litio 10 M, mezclando y dejando precipitar por 30 minutos a -20 °C. Luego se centrifugó a 14.000 rpm por 30 minutos a 4 °C, eliminando el sobrenadante y secando el pellet invertido a temperatura ambiente. Este se resuspendió en 200 µL de agua DEPC autoclavada y se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M (pH 4.8) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se dejó precipitando por 30 minutos a -80 °C y posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de etanol 70% frío (en agua DEPC). Se descartó el etanol, y se secó el pellet por inversión del tubo sobre toalla absorbente. Finalmente la muestra de RNA se resuspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas y se almacenó a -80°C.

## Cuantificación de RNA y determinación de su calidad

---

Cada muestra fue cuantificada y analizada su pureza mediante espectrofotometría (espectrofotómetro marca Shimadzu) realizando un barrido de espectro entre las longitudes de onda de 230 nm y 290 nm. Su concentración se estimó por absorbancia a 260 nm. Las muestras fueron cargadas en un gel 1,5 % de agarosa en condiciones denaturantes (Sambrook *et al.*, 1989).

## Northern blot

Los análisis de Northern se realizaron de acuerdo a lo que describe Sambrook *et al.*, (1989). Las muestras (20 µg) fueron cargadas en un gel de agarosa al 1,5 % en tampón MOPs (3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid 4-Morpholinepropanesulfonic acid) 1X y sometidas a electroforesis a 70 V por 90 minutos, y luego transferidas a una membrana cargada positivamente (Hybond N+, Amersham Biosciences, General Electric NY. EE.UU.) según indicaciones del fabricante. Las hibridaciones y revelado de los experimentos de Northern blot, fueron realizados siguiendo el protocolo descrito en el experimento de Southern blot.

## Análisis estadístico

---

El diseño que se uso presentó un modelo completamente aleatorio. El ensayo constó de dos tratamientos, con cuatro repeticiones, siendo la unidad experimental la baya de uva.

Para comparar los parámetros cuantitativos de los tratamientos y determinar si existen diferencias significativas entre ellos, se usara análisis de varianza (ANDEVA). En el caso que se encuentren diferencias significativas se realizara la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey.



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Efecto del GA<sub>3</sub> en el crecimiento y transporte de agua hacia las bayas

El análisis del resultado de las curvas de crecimiento considerando diámetro, peso fresco y contenido de agua en las bayas mostraron una significativa diferencia entre ambos tratamientos. Estas diferencias fueron ratificadas por análisis de varianza (ANDEVA) donde se obtuvo un valor-p < 0,01. En la Figura 3 se observa las curvas de volumen de bayas y muestra las diferencias de ambos tratamientos. Estas diferencias se deben al efecto de las giberelinas (GA<sub>3</sub>) en las bayas, el cual fue visto inicialmente por Weaver (1957) quien demostró en uva que las aplicaciones de esta fitohormona aumentaban el tamaño de las bayas. Trabajos realizados por Roller (2003) mostraron que el incremento del peso de cosecha de la baya es lineal con respecto a la aplicación de GA<sub>3</sub>, con aplicaciones en el rango de 120 a 220 ppm de GA<sub>3</sub>.

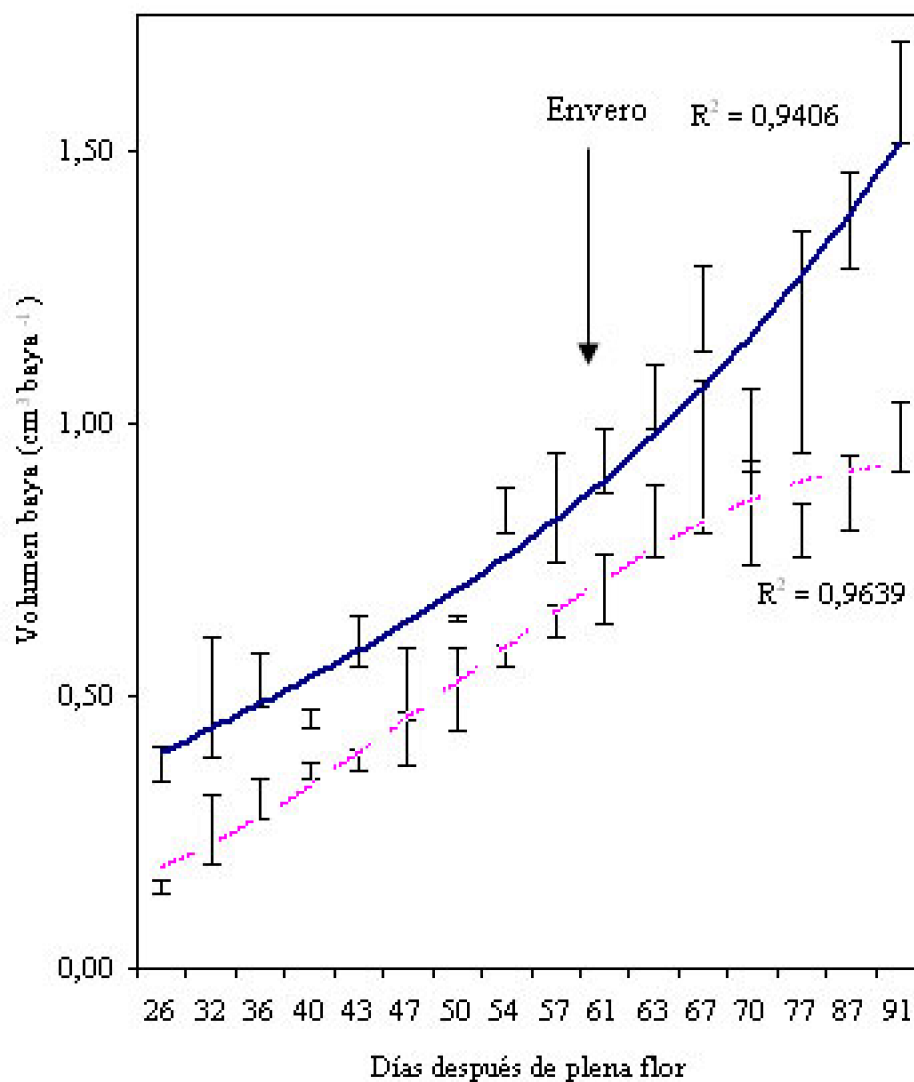


Figura 3. Evolución del volumen en bayas, con aplicación de  $GA_3$  (—) y sin aplicación de  $GA_3$  (-----).

En este estudio se verificó que el aumento del tamaño de la baya se debe a una mayor entrada de agua (Figura 4), ya que no hay diferencia significativa en el análisis de peso seco y en el contenido de sólidos solubles (Figura 5) de las bayas tratadas y no tratadas con  $GA_3$ .



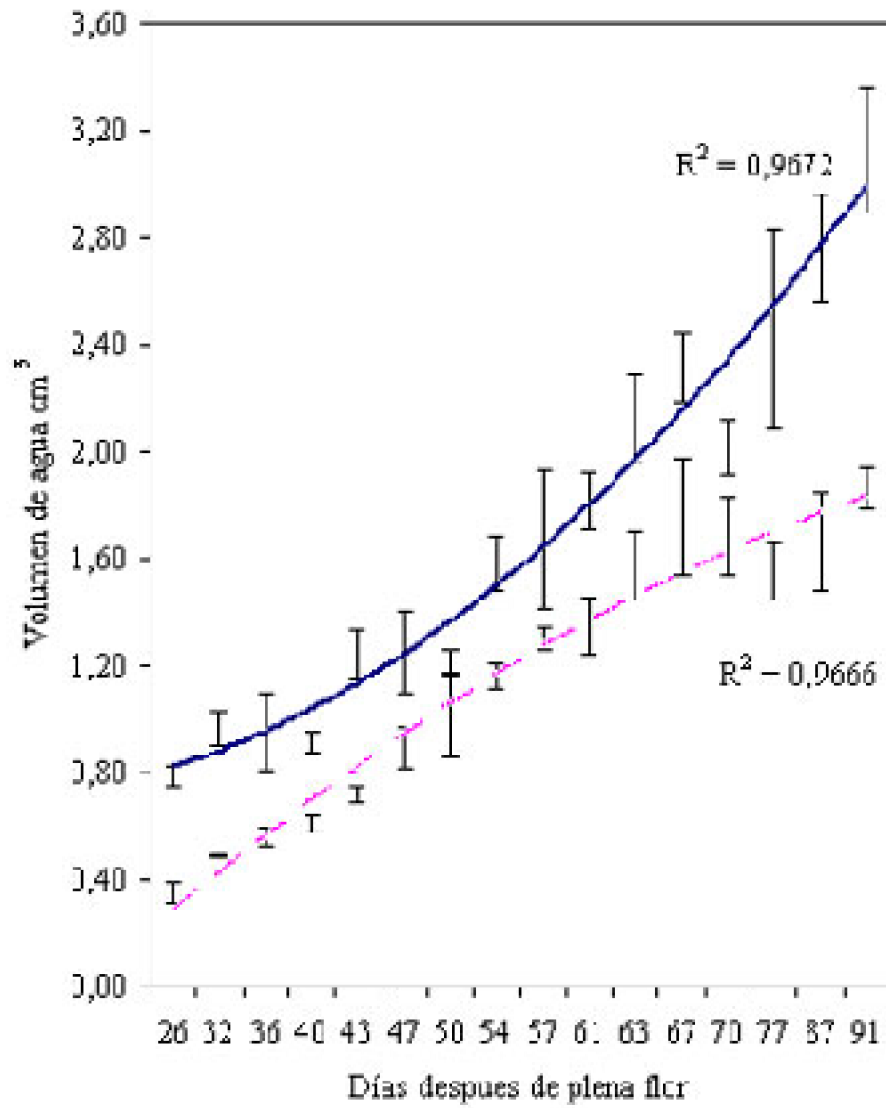


Figura 4. Evolución del contenido de agua en bayas. Con aplicación de GA<sub>3</sub> y (—) sin aplicación de GA<sub>3</sub> (-----).

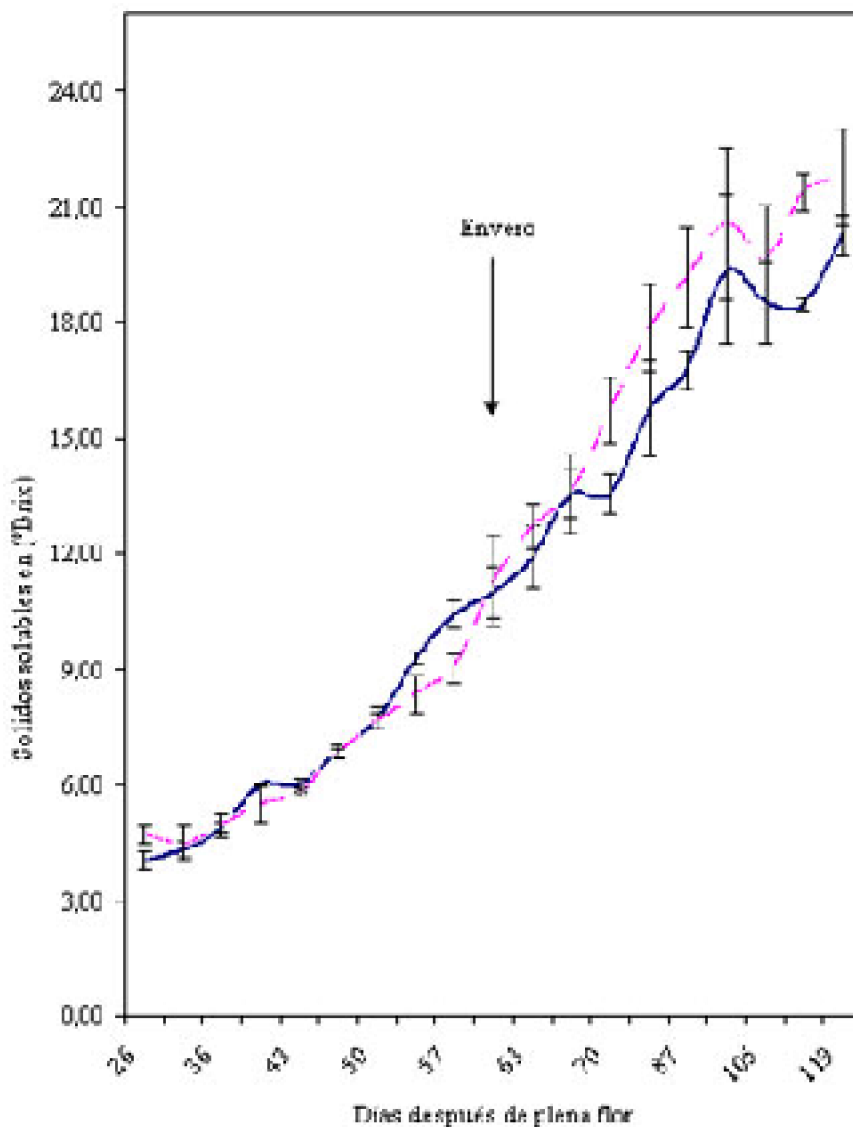


Figura 5. Evolución de los sólidos solubles (°Brix) en bayas con aplicación de GA<sub>3</sub> (—) y sin aplicación de GA<sub>3</sub> (----).

El análisis de la funcionalidad de los vasos xilemáticos reveló, que en esta variedad, ellos dejan de ser funcionales cercano a 60 días después de plena flor (ddpf) (Figura 6). Lo que nos indica que los haces vasculares del xilema dejaron de ser funcionales, justo en el momento cuando se observa una gran entrada de agua en la baya (Figura 4). Por esta razón, se estudió la expresión de genes de acuaporinas, como factores determinantes de la entrada de agua en las bayas. Diversos autores han observado este colapso xilemático (Lang y Torpe, 1989; Coombe, 1992 y Rogiers *et al.*, 2001), coinciden con los resultados obtenidos en estos ensayos.

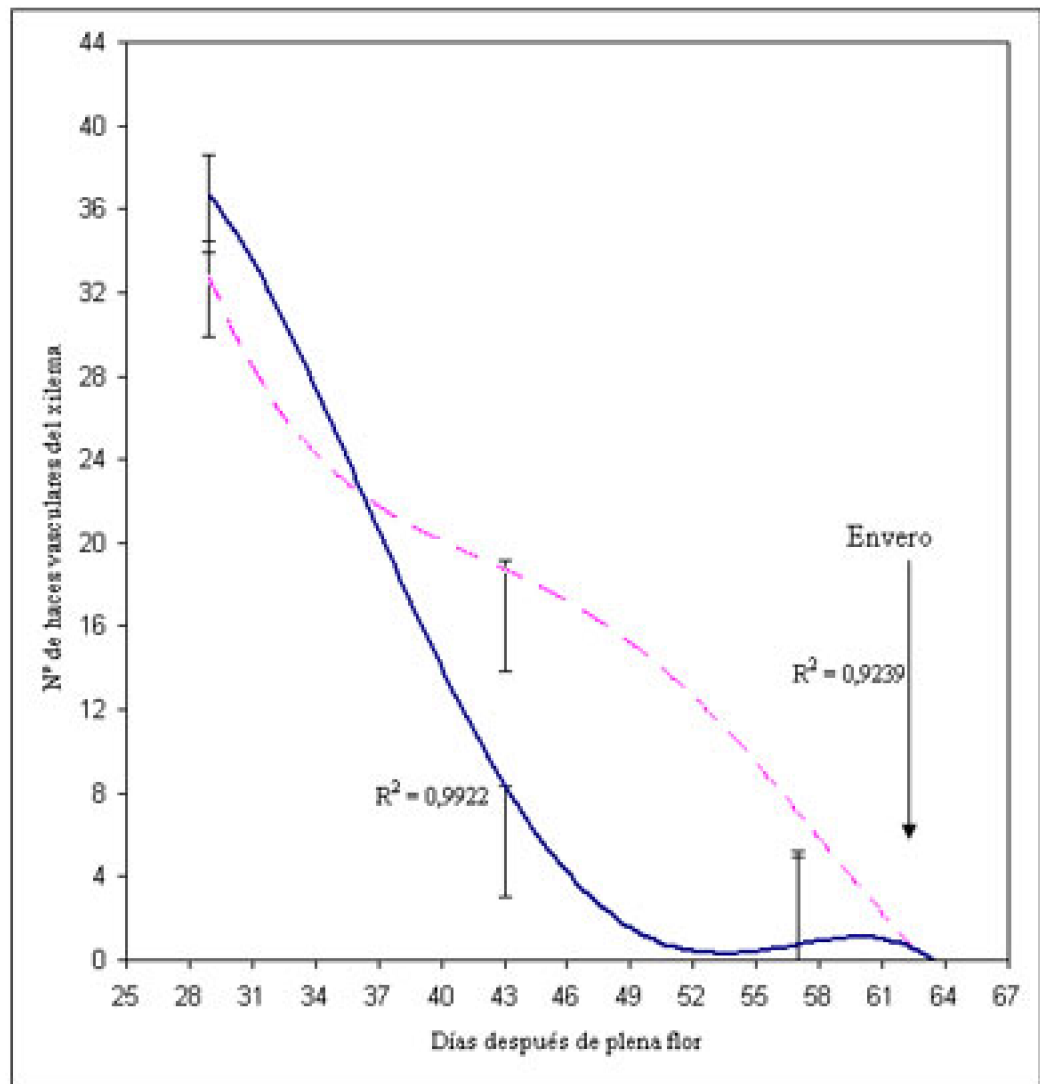


Figura 6. Evolución de número de haces xilemáticos funcionales en bayas de Sultanina tratadas con  $GA_3$  (—) y no tratadas (----).

## Identificación y clonación de genes de acuaporinas

### Análisis de secuencias de acuaporina para el diseño de partidores

A partir de genes homólogos y heterólogos de acuaporina obtenidos de bases de datos se diseñaron partidores para el clonamiento de genes de acuaporinas de vid donde se analizaron en base al alineamiento de 34 secuencias obtenidas de la base de datos NCBI (National Center of Biotechnology Information), discriminadas según tipo de acuaporinas, la especie, el porcentaje de similitud, y la ubicación dentro de la planta. Para este ensayo se utilizó la nomenclatura descrita por Johanson *et al.*, (2001). A partir de

**Expresión de genes de acuaporinas en la baya de vid cv. Sultanina.**

este alineamiento se diseñaron partidores genéricos para las acuaporinas denominados MIP y específicos para cada familia de genes de acuaporinas (PIP1, PIP2, TIP1, TIP2, TIP3) (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Diseño de partidores y secuencias involucradas en el diseño de éstos para acuaporina en vid variedad Sultanina.**

Espece	Codigo de acceso	Nombre de partidor	Secuencia de los partidores <sup>a</sup> directos, <sup>b</sup> reversos
<i>Glycine max</i>	GMU27347	MIP	<sup>a</sup> 5'TGCACTGCTGGTATCTCAGG <sup>b</sup> 3' 5'GCAAGAGCAGCTCCAATGA 3'
<i>Junglans regia</i>	AY189974		
<i>Prunus communis</i>	AB058678		
<i>Prunus persica</i>	AF367457		
<i>Prunus perica</i>	AF367458		
<i>Prunus persica</i>	AF367460		
<i>Raphanus sativus</i>	AB012045		
Vitis sp.	AF141642		
Vitis sp.	AF141643		
Vitis sp.	AF141898		
Vitis sp.	AF141900		
<i>Zea mays</i>	AF326493		
Vitis sp.	AF141899	PIP1	<sup>a</sup> 5'GTTTCATGGCCACTTTCCTGT <sup>b</sup> 3' 5'GTCTCTGGCGTTTCTCTTGG 3'
Vitis sp.	AF188843		
Vitis sp.	AF188844		
Vitis sp.	AF367457		
<i>Prunus communis</i>	AB058678	PIP2	<sup>a</sup> 5'GCTACAAGAGCCAGACCGAC3' <sup>b</sup> 5'GTCTCTGGCACTC 3'
<i>Prunus communis</i>	AB058680		
Vitis sp.	AF141642		
Vitis sp.	AF141900		
<i>Junglans regia</i>	AY189974		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_105978	TIP1	<sup>a</sup> 5'GGCTCCATTCTTGTCATGTTT <sup>b</sup> 3' 5'TAGACAGATCCTCCCATGCC 3'
<i>Nicotiana glauca</i>	AF290619		
<i>Oryza sativa</i>	D25534		
<i>Prunus communis</i>	AB048248		
<i>Triticum aestivum</i>	TAU86764		
Vitis sp.	AF271661		
<i>Zea mays</i>	AF037061		
<i>Zea mays</i>	AF326500		

Especie	Codigo de acceso	Nombre de partidor	Secuencia de los partidores <sup>a</sup> directos, <sup>b</sup> reversos
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_112495	TIP2	<sup>a</sup> 5'TCATGGTTTTGCTCTCTTCG 3' <sup>b</sup> 5'GATCCACCGGAGAATGGAC 3'
<i>Vitis vinifera</i>	AJ289866		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_101968	TIP3	<sup>a</sup> 5'TGTATTGGATTGCCAGCTT3' <sup>b</sup> 5'ATTAGGGGTCCCACCC
Vitis sp.	AF271660		
<i>Vitis vinifera</i>	AJ289866		

**Cuadro 3. Número de nucleótidos esperados y obtenidos con la amplificación por PCR de los partidores específicos.**

Nombre del partidor	Nº de nucleótidos esperados	Nº de Nucleótidos obtenidos
MIP	500 pb	
PIP1	465 pb	613 pb
PIP2	410 pb	537 pb
TIP1	300 pb	300 pb
TIP2	399 pb	494 pb
TIP3	362 pb	480 pb

**Clonamiento de acuaporinas asociadas a la membrana plasmática (PIP).** Como se observa en el Cuadro 2, para el diseño de partidores genéricos de acuaporinas asociadas a las membranas plasmática PIP se usaron entre dos y 12 secuencias. Los partidores fueron probados en diferentes concentraciones de cloruro de magnesio y gradiente de temperatura. En las mejores condiciones alcanzadas, se clonó la banda respectiva obteniendo 15 posibles clones para PIP1, cuatro para PIP2 y dos para los partidores genéricos llamados MPIP, todo los clones fueron evaluados mediante PCR con los partidores universales M13, obteniéndose fragmentos del tamaño esperado de bandas (Cuadro 3). Los clones de cada gen presentaron el mismo patrón de digestión con las distintas enzimas de restricción. Para ratificar este resultado se secuenciaron cuatro clones PIP1, cuatro PIP2 y los dos clones MPIP.

**Clonamiento de acuaporinas asociadas a la membrana del tonoplasto (TIP).** Este clonamiento se realizó con el mismo análisis que en el caso de las PIP, obteniendo en base de datos del NCBI secuencias de TIP, agrupadas en TIP1, TIP2 y TIP3. Se diseñó un par de partidores por grupo (Cuadro 2), de los cuales se obtuvo una buena amplificación por PCR. Estos amplicones fueron clonados y analizados mediante PCR con partidores universales y digestión con enzimas de restricción. En ambos caso se obtuvo fragmentos de ADN del tamaño esperado (Cuadro 3). Para verificar este resultado se secuenciaron cuatro plasmidios de cada grupo.

### **Análisis de secuencias de las acuaporinas obtenidas.**

Las secuencias fueron analizadas con el software interProScan, identificándose un

segmento del dominio perteneciente a la familia de “Major Intrinsic Protein” (MIP). Mediante un alineamiento usando BlastX, se determinó que en el caso de los clones obtenidos con los partidores MIP, específicamente el clon MPIP22 presentó una similitud de 83 % con acuaporinas de tipo PIP2; el clon PIP1-19 presentó una similitud de un 99 % con acuaporinas del tipo PIP1-3 y de un 88 % con PIP1-2; el clon PIP2-11 presentó 83% de similitud con PIP2-1 dividido en tres regiones codificantes separadas por dos intrones. Finalmente, el clon TIP1-7 presentó 100% de similitud con TIP1. Las secuencias clonadas se observan en la Figura 7.

El análisis con Genesplicer, programa que identifica intrones, determinó que la secuencia MPIP-22, presentó dos intrones de 250 y 144 pb respectivamente, delimitados por sitios dadores y aceptores de procesamiento (GT y AG, respectivamente). Para PIP1 y PIP2 se observó la presencia de un intrón de 290 y 120 pb respectivamente. En TIP1 la secuencia clonada de 300 pb no presenta intrones.

Johanson *et al.*, (2001), determinó son zonas que codifican preferentemente en los bucles proteicos donde se conectan los segmentos de transmembrana. A su vez, las secuencias corresponden a los exones codifican para las regiones de transmembrana.

Las secuencias PIP1 clonadas (Figura 7) presentaron un alto porcentaje de identidad con las secuencias clonadas por Picaud *et al.*, (2003) en vid variedad Ugni blanc. La Figura 8 muestra un alineamiento aminoacídico de los clones PIP1, donde se destaca la región conservada de las acuaporinas NPA, descrita por Barone *et al.*, (1997). Junto a ello se identificaron cuatro de los seis dominios de transmembrana que describen Kyte y Doolittle (1982) como la estructura básica de una proteína integral de membrana.

Las secuencias obtenidas de los fragmentos clonados de TIP presentaron una calidad aceptable sólo en el caso de TIP1. El análisis de los cromatogramas de TIP2 y TIP 3 utilizando el programa Chromas® no logró identificar patrones definidos al alinear los clones secuenciados. Esto se debe a que los partidores diseñados en las diferentes condiciones ocupadas tuvieron como resultado productos de PCR inespecífico.

De los cuatro clones secuenciados de PIP1 se encontraron dos pares idénticos (PIP1-2 y PIP1-5, y PIP1-19 y PIP1-24) que a su vez se diferencian entre ellos por dos aminoácidos al ser traducidos en el marco de lectura + 2, cambiando una prolina por una serina, y una cisteína y una fenilalanina (Figura 8). Estas diferencias aminoacídicas pueden resultar en una diferencia funcional en la proteína, pero esta posible diferencia no se puede demostrar a nivel transcripcionales mediante Northern blot, debido al alto porcentaje de homología que presentan las secuencias, lo que no permitiría diseñar un sonda específica para cada forma génica.

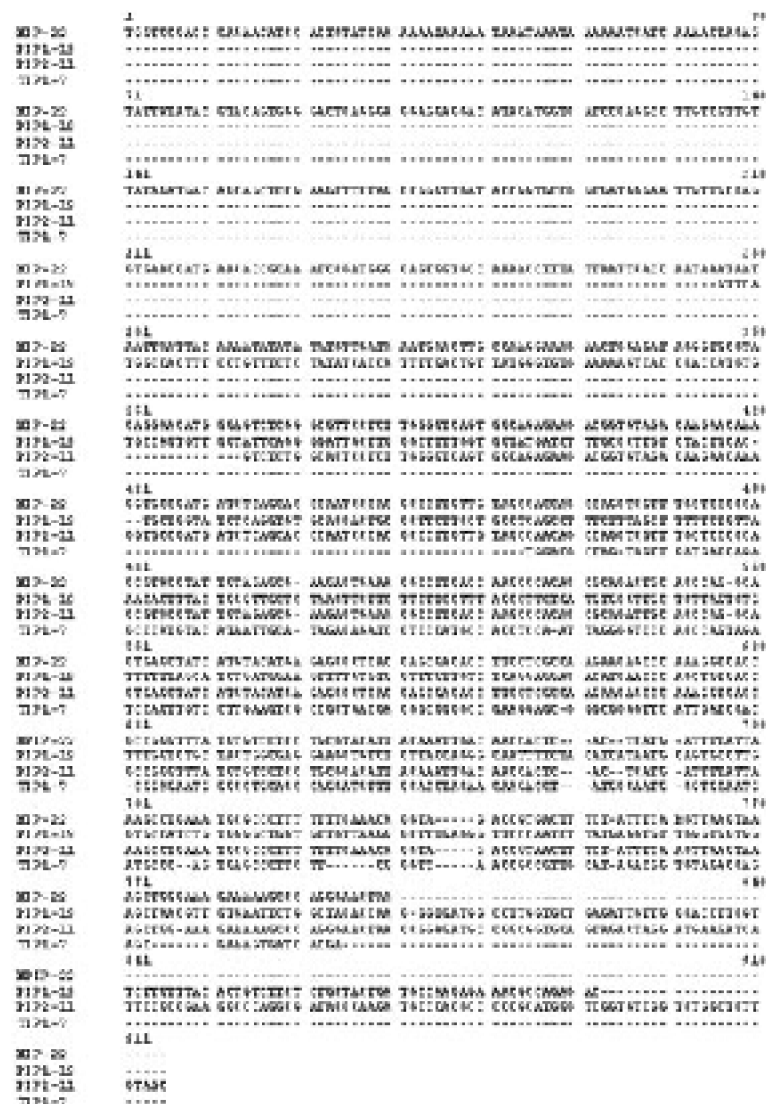


Figura 7. lineamientos de secuencias de nucleótidos para las cuatro familias de los fragmentos clonados en vid variedad Sultanina.

	10	20	30	40	50	60
PIP1-2	FMATFLFLYI	TILTVMGVVK	SSTHCAIVGI	QGIANAFGGH	IFALVYCTAG	ISGVVHCPS
PIP1-5	FMATFLFLYI	TILTVMGVVK	SSTHCAIVGI	QGIANAFGGH	IFALVYCTAG	ISGVVHCPS
PIP1-19	FMATFLFLYI	TILTVMGVVK	SPTHCAIVGI	QGIANAFGGH	IFALVYCTAG	ISGVVHCPS
PIP1-24	FMATFLFLYI	TILTVMGVVK	SPTHCAIVGI	QGIANAFGGH	IFALVYCTAG	ISGVVHCPS
	70	80	90	100	110	120
PIP1-2	FLSLSLAFSV	KHFTGLLVLL	-PLAL-CGLL	LVCFLASDGS	FVWFVVSQGH	INPAVTFGLL
PIP1-5	FLSLSLAFSV	KHFTGLLVLL	-PLAL-CGLL	LVCFLASDGS	FVWFVVSQGH	INPAVTFGLL
PIP1-19	CLSLSLAFSV	KHFTGLLVLL	LPLAFWCGLL	LVCFLASDGS	FVWFVVSQGH	INPAVTFGLL
PIP1-24	CLSLSLAFSV	KHFTGLLVLL	LPLAF-CGLL	LVCFLASDGS	FVWFVVSQGH	INPAVTFGLL
	130	140	150	160	170	180
PIP1-2	LARKLSLTRA	IFYIVMQLG	AICGAGVVKG	FEQSQSYEVL	GGGANVVMNSG	YTKDGLGAE
PIP1-5	LARKLSLTRA	IFYIVMQLG	AICGAGVVKG	FEQSQSYEVL	GGGANVVMNSG	YTKDGLGAE
PIP1-19	LARKLSLTRA	IFYIIMQLG	AICGAGVVKG	FEQSQSYEVL	GGGANVVMNSG	YTKDGLGAE
PIP1-24	LARKLSLTRA	IFYIIMQLG	AICGAGVVKG	FEQSQSYEVL	GGGANVVMNSG	YTKDGLGAE
	190	200				
PIP1-2	IVGTFVLVYT	VFSATDAKRN	ARD			
PIP1-5	IVGTFVLVYT	VFSATDAKRN	ARD			
PIP1-19	IVGTFVLVYT	VFSATDAKRN	ARD			
PIP1-24	IVGTFVLVYT	VFSATDAKRN	ARD			

Figura 8. lineamiento de las cuatro secuencias PIP1 clonadas en vid variedad Sultanina. En cajas se observan cuatro de los seis dominios conservados que presentan las PIP. Subrayado se indica el motivo de NPA de las acuaporinas.

## Determinación de la expresión de genes de acuaporina

### Diseño de sondas para genes de la familia PIP

Debido a la presencia de un intrón en las secuencias clonadas, se diseñaron partidores internos que amplificaran sólo regiones codificantes de PIP1 y PIP2, con el fin de obtener sondas para el análisis de expresión de estos genes. En ambos casos se utilizó uno de los partidores ya diseñados. Las sondas obtenidas por PCR se observan en la Figura 9.



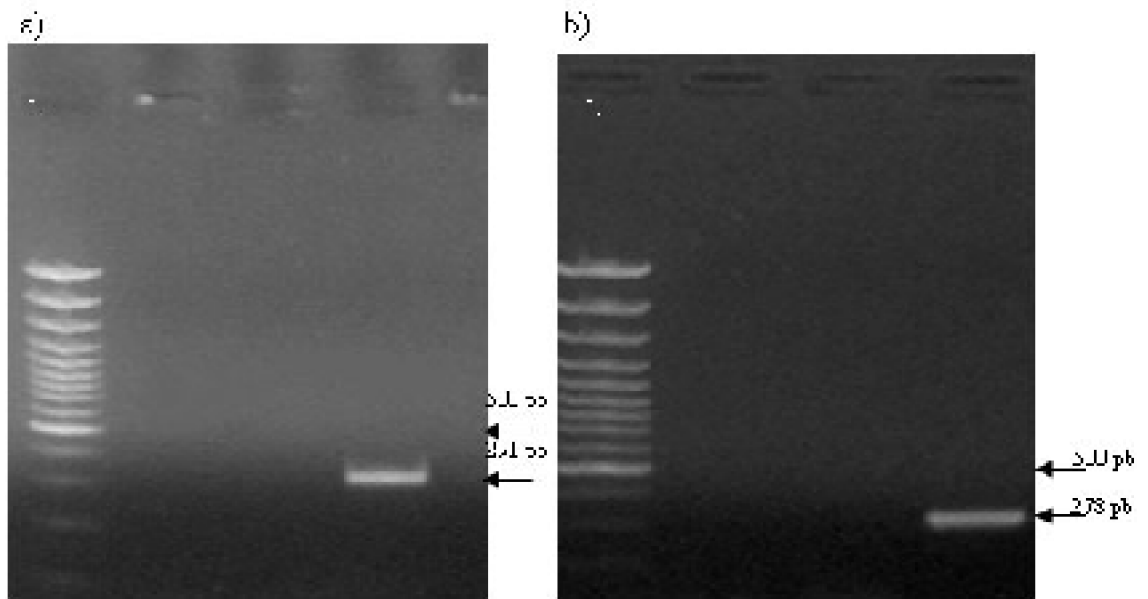


Figura 9. Sondas amplificadas por PCR. El marcador de peso molecular es 100 bp (L). a) Sonda PIP1 (291 pb), b) Sonda PIP2 (278 pb).

Las secuencias de las sondas obtenidas fueron analizadas *in silico*, alineadas con otras secuencias de PIPs disponible en bases de datos de libre acceso mediante el programa Bioedit. Con esto se construyó un árbol filogenético, donde se pudo establecer las distancias genéticas existentes entre ellas (Figura 10). Como se puede ver, existe una apreciable diferencia entre las secuencias de ambas sondas, agrupándose cada una con su respectiva familia de genes (PIP1 y PIP2).

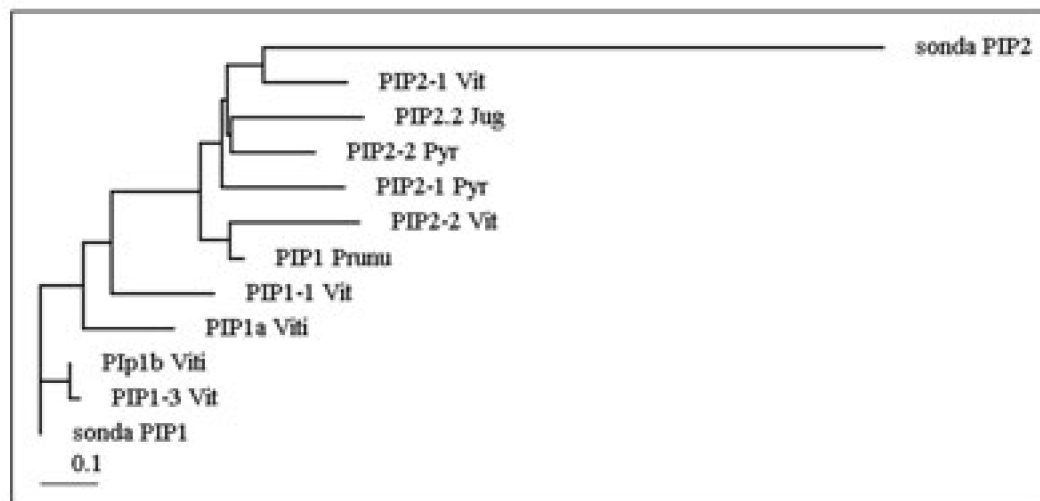


Figura 10. Análisis filogenético de las sondas PIP1 y PIP2 en diferentes especies.

### Diseño de sondas para genes de la familia TIP1

La sonda para la amplificación de la region codificante del gen TIP1 se obtuvo utilizando los mismos partidores que para el clonamiento de este gen, debido a que no presentó

ningún, intrón en la secuencia clonada.

### Determinación del número de copias de los genes de acuaporinas

Para determinar el número de copias, de cada gen en estudio, se efectuó un análisis de estos mediante Southern blot. Para ello se utilizaron diferentes enzimas de restricción nombradas eligiendo aquellas que no cortaran la sonda. Además se realizaron hibridaciones con diferentes condiciones de estrictez en los lavados de las membranas, para evitar las hibridaciones inespecíficas, de modo que se pudiera establecer la selectividad de la sonda, así como estimar el número de copias de genes de cada familia de acuaporina

En el caso de PIP1, el DNA utilizado se digirió con las enzimas EcoRI y EcoRV. En condiciones de lavado de mediana estrictez se detectaron varias bandas, mientras que al cambiar las condiciones a mayor estrictez, sólo se detectó una banda de mayor intensidad, de mayor tamaño en el caso de la digestión con EcoRV (Figura 11).

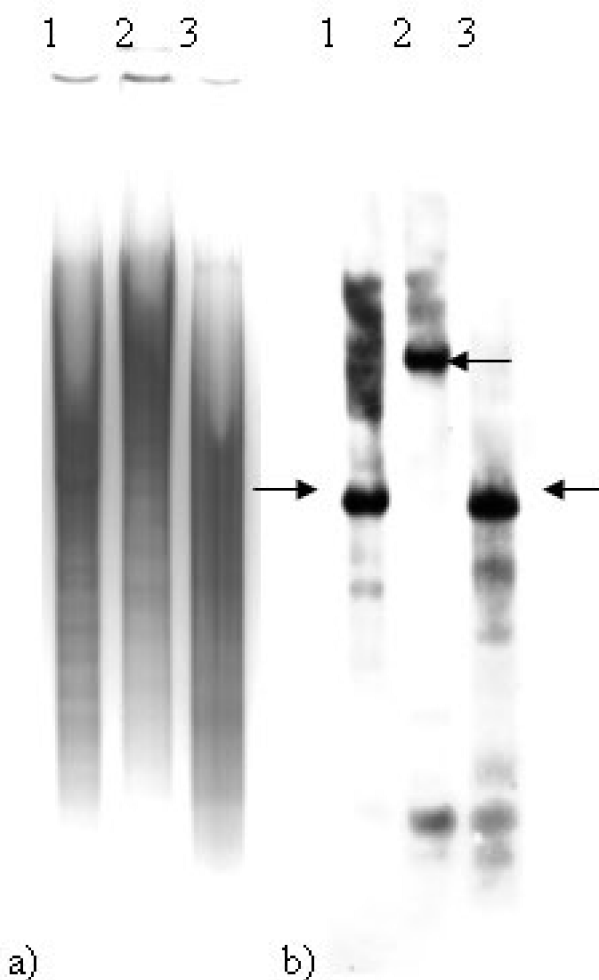


Figura 11. Southern blot de PIP1. a) Digestión de 20 µg de DNA b) hibridación de sonda PIP1. Los canales (1) y (3) corresponden a digestiones con las enzimas con EcoRI (1) EcoRv (2) y la mezcla de ambas (3).

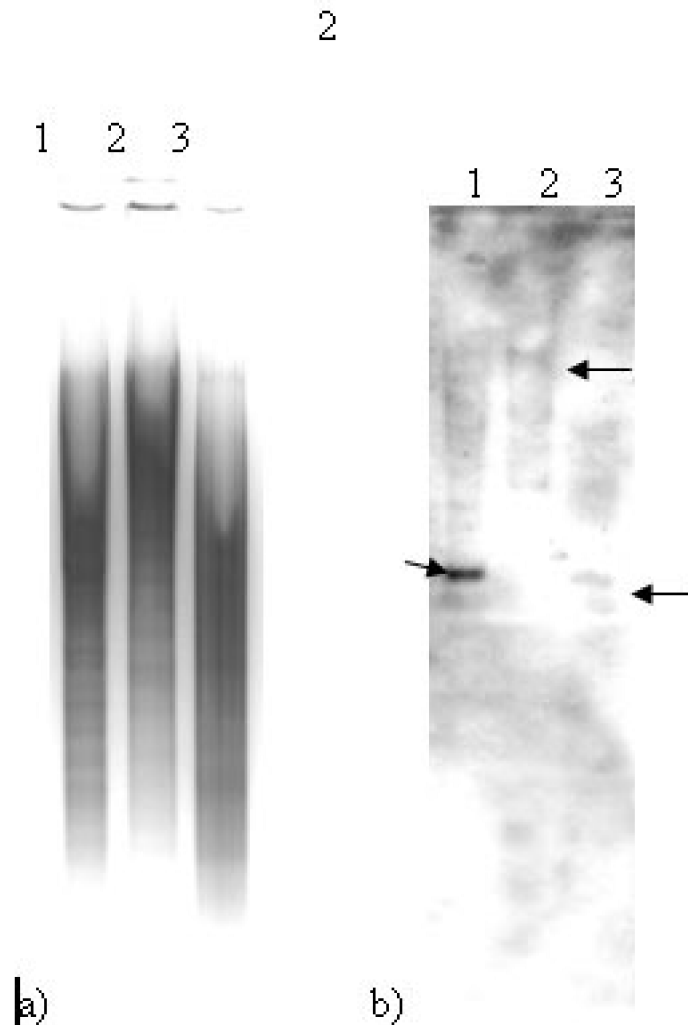


Figura 12. Southern blot de PIP2. La digestión enzimática de AND genómico (a), es igual que en la Figura 11 (de hecho, es la misma membrana), pero la hibridación mostrada en (b) es con la sonda PIP2.

En las hibridaciones realizadas con la sonda PIP2 se observó una banda, tanto en condiciones de mediana como alta estrictez. Además, en otro ensayo esta sonda hibridó con plasmidio PIP1, demostrando que tiene una baja especificidad. Esto se debería a que algunos miembros de las subfamilias PIP1 y PIP2 presentan una alta similitud en sus isoformas. De esta manera, la sonda PIP2 podría estar reconociendo genes de familia PIP1, por lo que no es posible usarla como sonda y discriminar con esta metodología su expresión. Schuurmans (2003) también observó en *Arabidopsis* y maíz un hecho análogo explicándolo mediante la alta similitud de las secuencias de PIP1 y PIP2, confirmando grupos muy cercanos filogenéticamente y de difícil exclusión mediante sondas.

En el caso de TIP1, las hibridaciones Southern mostraron una gran especificidad de la sonda, ya que como resultado se observó una sola banda en condiciones de lavado de alta estrictez (Figura 13).

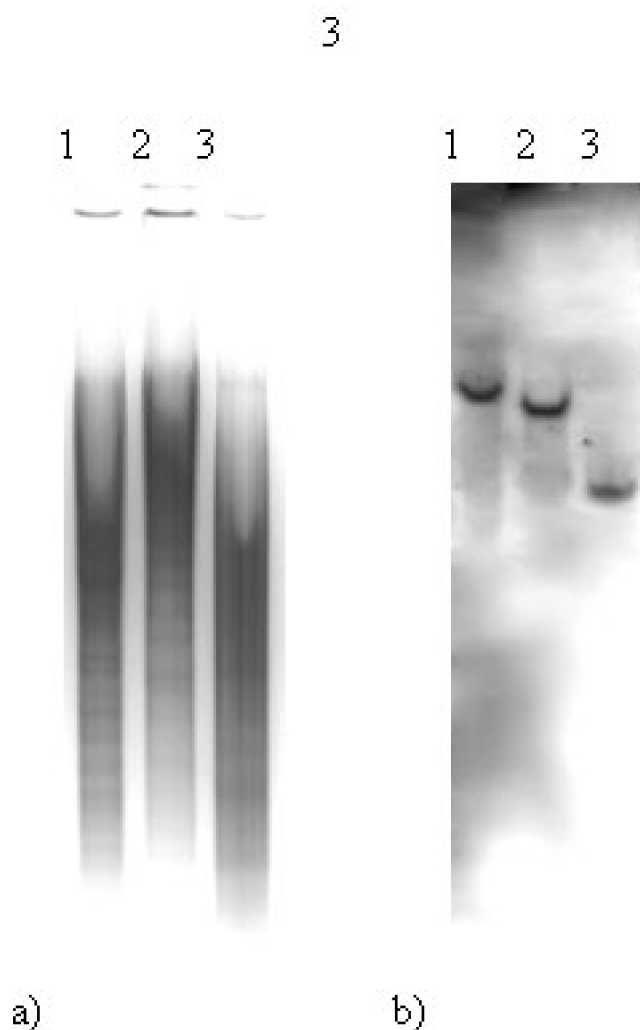


Figura 13. Southern blot de TIP1. Se utilizó la misma membrana que para PIP1 y PIP2, preparada mediante "stripping" para eliminar la señal de la primera hibridación. Las digestiones del DNA genómico son las mismas que se observan en la Figura 11.

## Caracterización de los perfiles transcripcionales de los genes PIP1 y TIP1

Para caracterizar los perfiles transcripcionales de los genes PIP1 y TIP1, se realizaron hibridaciones del tipo Northern blot, utilizando las sondas diseñadas desde los respectivos fragmentos clonados. Este estudio se centró en dos aspectos: la expresión de los genes durante el desarrollo de la baya, desde botón floral hasta el envero, y la expresión de éstos en respuesta a aplicaciones exógenas de giberelinas ( $GA_3$ ) en estos mismos estados fenológicos con excepción del envero.

La hibridación de los mRNA con la sonda PIP1 preparadas para este estudio

presentó señal en hoja y en los diferentes estados de desarrollo sin mostrar un aumento en los niveles de expresión del gen reconocido por la sonda PIP1. Además, de acuerdo con los resultados que se muestran en la Figura 14a, la aplicación de GA<sub>3</sub> no tuvo efecto sobre el nivel de expresión de estas proteínas, en ninguno de los estados de desarrollo de las bayas estudiadas.

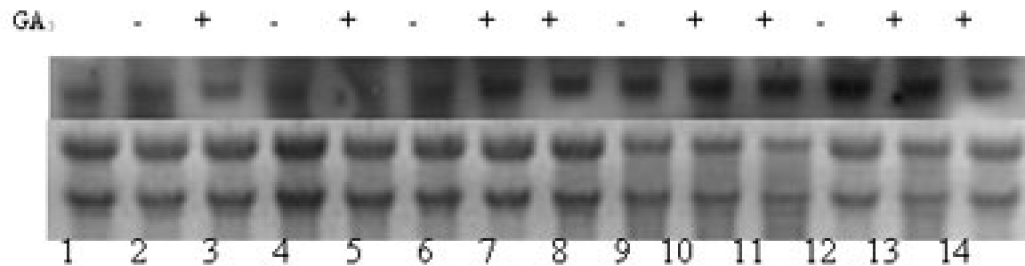


Figura 14 a. Northern blot con la sonda PIP1 los carriles corresponden a hoja (1), flor con tratamiento (2) y sin tratamiento (3), cuaja de racimos tratados (4) y no tratados con GA<sub>3</sub> (5), bayas de 4mm de racimos no tratados con GA<sub>3</sub> (6), bayas recolectadas 24 horas (7) y 72 horas luego de la aplicación (8), bayas de 6mm de racimos no tratados con GA<sub>3</sub> (9), bayas 24 horas (10) y, 72 horas después de la aplicación de GA<sub>3</sub> (11) bayas de 8mm de racimos no tratados con GA<sub>3</sub> (12), 24 horas (13) y 72 horas luego de la aplicación de GA<sub>3</sub> (14). El gel inferior corresponde a una tinción con bromuro de etidio, donde se aprecian las bandas del ARN ribosomal.

Las hibridaciones de PIP1 con mRNA obtenidas de etapas más avanzadas del desarrollo de las bayas mostraron una menor expresión una semana antes de envero, la que aumentó durante el envero y se reprimió una semana después de este. Esto se puede interpretar como, que el miembro de la familia PIP1 clonado presenta una alta expresión en el momento de mayor división celular, debido a que corresponden a proteínas que son funcionales en las etapas de desarrollo de la baya.

Esta isoforma tendría un papel diferente, con un menor nivel de expresión posterior, pero aumenta nuevamente en el envero, lo que coincide con un mayor ingreso de agua en la baya. Luego del envero sus niveles se reducirían nuevamente, aunque podría permanecer por más tiempo las proteínas de membrana funcionales, manteniéndose un transporte activo de agua hacia el interior de la baya (Figura 14b).

Esto no se correlaciona con los resultados obtenidos por Schuurmans (2003) quien clonó una PIP1 que presenta una expresión constitutiva. Tampoco coincide con lo observado por Picaud *et al.*, (2003), quien observa una acuaporina del tipo PIP1 aumenta luego del envero. Esto se puede deber a que en este caso se trataría de un miembro de la subfamilia diferente a lo descritos por los autores mencionados.

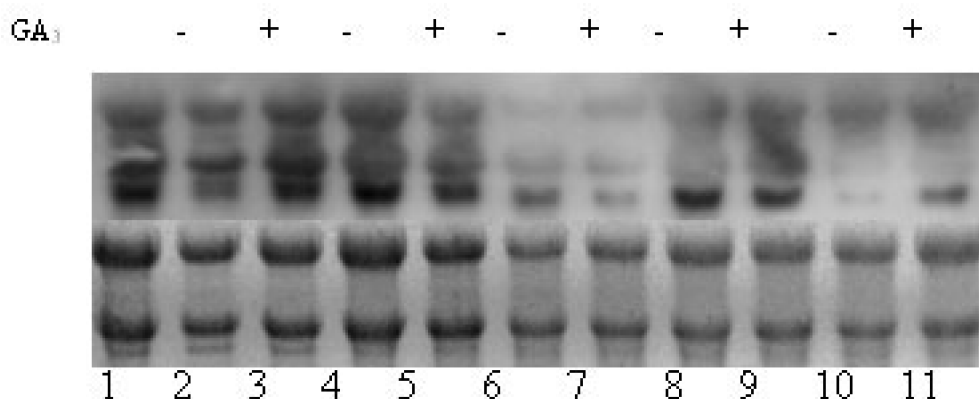


Figura 14 b. Northern blot con la sonda PIP1. Los carriles corresponden a hoja (1), cuaja de racimos no tratados (2) y tratados con  $GA_3$  (3), bayas de 4mm de racimos no tratados con  $GA_3$  (4), bayas recolectadas 24 horas luego de la aplicación (5), bayas extraídas 1 semana antes del envero sin previa aplicación de  $GA_3$  (6) y con aplicación (7), bayas extraídas durante el envero sin  $GA_3$  (8) y con aplicación (9), bayas extraídas una semana luego del envero sin aplicación (10) y con aplicación de  $GA_3$  (11). La parte inferior corresponde al gel con una tinción con bromuro de etidio, para evaluar la carga total de RNA en cada carril.

La hibridación de TIP1 mostró que la expresión de este gen se presenta más bien durante los primeros estados de desarrollo de la baya. En efecto, su expresión sería más intensa al estado de botón floral y se mantendría hasta el estado en que las bayas alcanzan los 8 mm de diámetro. Posteriormente durante el preenvero y el envero la expresión disminuye hasta perderse completamente (Figura 15). Esto se puede deber a que las acuaporinas del tipo TIP1 necesarias para el desarrollo de las bayas son transcritas durante las primeras etapas de su crecimiento, y participaría en eventos no relacionados a las últimas etapas de crecimiento de las bayas.

Por otra parte, el tratamiento con  $GA_3$  no produjo diferencias en la expresión del gen TIP1, como lo observado en *Arabidopsis thaliana* donde la expresión de una acuaporina TIP muestra un aumento regulado por GA3 (Yang *et al.*, 2003).

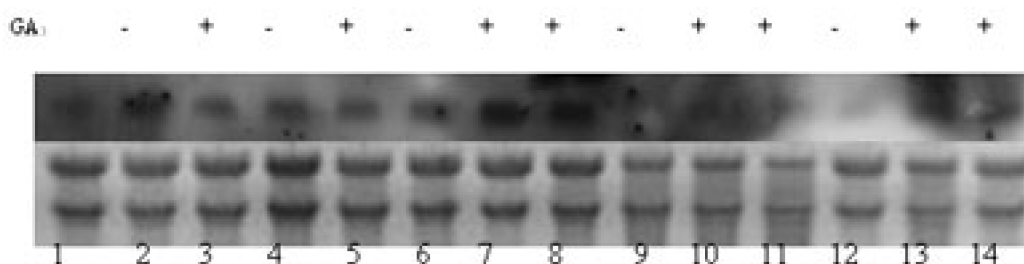


Figura 15 a. Northern blot con la sonda TIP1. los carriles corresponden a hoja (1), flor sin (2) y con  $GA_3$  (3), cuaja de racimos no tratados (4) y tratados con  $GA_3$  (5), bayas de 4mm de racimos no tratados con  $GA_3$  (6) y recolectadas 24 (7) y 72 horas luego de la aplicación (8), bayas de 6mm de racimos no tratados con  $GA_3$  (9) y 24 horas (10) y 72 horas luego de la aplicación de  $GA_3$  (11), bayas de 8mm de racimos no tratados con  $GA_3$  (12) y 24 horas (13) y 72 horas luego de la aplicación de  $GA_3$  (14). Se indica la tinción de RNAr para evaluar la carga total usada en cada carril

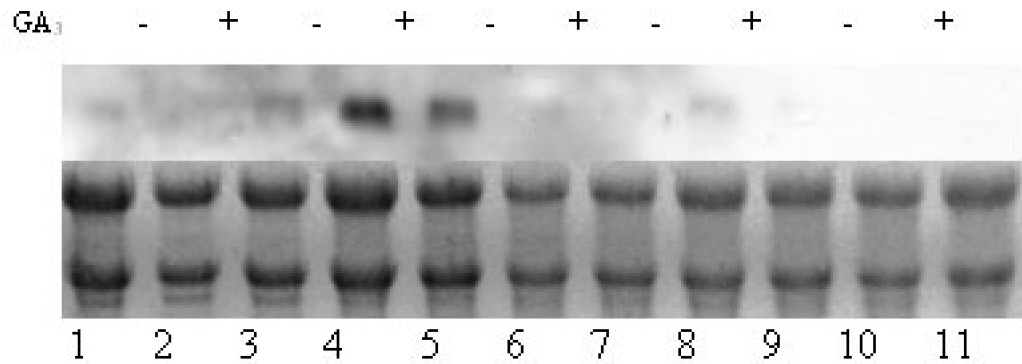


Figura 15 b. Northern blot con la sonda TIP1 los carriles corresponden a hoja (1), cuaja de racimos no tratados (2) y tratados con  $GA_3$  (3), bayas de 4mm de racimos no tratados con  $GA_3$  (4), bayas recolectadas 24 horas luego de la aplicación (5), bayas extraídas 1 semana antes del envero sin previa aplicación de  $GA_3$  (6) y con aplicación (7), bayas extraídas durante el envero sin  $GA_3$  (8) y con aplicación (9), bayas extraídas una semana luego del envero sin aplicación (10) y con aplicación de  $GA_3$  (11). En la parte inferior se observa el con tinción de RNAr con bromuro de etidio de para evaluar la carga total usada en cada carril





## Conclusiones

El transporte del agua en la baya aumenta a partir del envero, cuando el xilema ha dejado de ser funcional, por lo que ésta sería transportada a través de las membranas del floema.

Las aplicaciones exógenas de giberelinas aumentan el contenido de agua en la baya de la variedad Sultanina.

El clonamiento y análisis de secuencias de PIP1, PIP2 y TIP1 de vid variedad Sultanina confirma que estos genes en esta variedad y permite determinar su estructura intron- exónica, además de establecer a que familias génicas pertenecen.

En el crecimiento de las bayas variedad Sultanina la mayor expresión de las acuaporinas PIP1 y TIP1, sería en los primeros estados desarrollo. Aunque PIP1 presenta un segundo evento de expresión estrechamente relacionado con el envero en las bayas, etapa en que se produce el mayor incremento de volumen de las bayas.

La expresión de estas acuaporinas no se ve alterada de manera evidente en ninguno de los estados de desarrollo de las bayas por la aplicación de GA<sub>3</sub>.



---

## LITERATURA CITADA

- Agre, P., Sasaki, S., and Chrispeels M. 1993. Aquaporins: A family of water channel proteins. *Am. J. Physiol.* 265: F461.
- Aarón, R., Sahak, Y., Wininger, S., Bendov, Y., Kapulnik, Y. and Galili, G. 2003. Overexpression of plasma membrane in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not drought or salt stress. *Plant Cell* 15(2): 439-447.
- Baiges, I., Shäffner, A. and Mas, M. 2001. Eight cDNA encondig putative aquaporins in *Vitis* hybrid Richter-110 and their expresión. *J. Exp. Bot.* 52: 1949- 1951.
- BaroneL. Shih, C. and Wasserman, B. 1997. Mercury-induced conformational changes and identification of conserved surface loops in plasma membrane aquaporins from higher plants. *J. Biol. Chem.* 272(49):30672- 30677.
- Barrieu, F., Chaumont, F., and Chrispeels, M. 1998. High expression of the tonoplast aquaporin *zmtip1* in epidermal and conducting tissues of maize. *Plant Physiol.* 117: 1153-1163.
- Chaumont, F., Barrieu, F., Herman, M. and Chrispeels, M. 1998. Characterization of a maize tonoplast aquaporin expressed in zones of cell division and elongation. *Plant Physiol.* 117: 1143-1152.
- Chaumont F., Barrieu F., Jung R. and Chrispeels M.J. 2000. Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiol.* 122: 1025-1034.

- Chaumont F., Barrieu F., Wojcik E., Chrispeels M.J. and Jung R. 2001. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol.* 125: 1206-1215.
- Chrispeels, M. and Maurel, C. 1994. Aquaporins: The molecular basis of facilitated water movement through living plant cells. *Plant Physiol.* 105: 9-13.
- Chrispeels, M. Crawford, M. and Schroeder, J. 1999.** Proteins for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cells. *Plant Cell* 11: 661-676.
- Coombe, B. 1992. Research on development and ripening of the grape berry. *Am. J. Enol. Viticul.* 43 (1): 101-110.
- Fillion, L., Ageorges, A., Picaud, S. Coutos-Thévenot, P., Lemoine, R. and Delrot, S. 1999. Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of berry grape. *Plant Physiol.* 120:1083-1093.
- Gámez, M. 2005. Temporada agrícola. Santiago. ODEPA. 24:79-95.
- Heymann, B and Engel, A. 2000. Structural clues in the sequences of the aquaporins. *J. Mol. Biol.* 295:1039-1053.
- Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjövall, S., Fraysse, L., Weig, A. and Kjellbom, P. 2001. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in arabidopsis provide a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol.* 126:1358-1369.
- Kjellbom, P., Larsson, C., Johansson, I., Karlsson, M., and Johanson, U., 1999. Aquaporins and water homeostasis in plants. *Trends Plant Sci.* 4 (8):308-314.
- Kyte, J. and Doolittle, R. 1982 A simple method for displaying the hydrophobic character of protein. *J. Biol. Chem.* 157:105-132
- Lang, A. and Thorpe, M. 1989. Xylem, phloem and transpiration flows in grape: application of a technique for measuring the volume of attached fruit high resolution using archimedes principle. *J. Exp. Bot.* 40:1069-1078.
- Marin-Olivier M., Chevalier T., Fobis-Loisy I., Dumas C. and Gaudé T. 2000. Aquaporin pip genes are not expressed in the stigma papillae in *brassica oleracea*. *Plant J.* 25:231- 240.
- Maurel, C. and Chrispeels, M. 1994. Aquaporins: The molecular basis of facilitated water movement through living plant cells. *Plant Physiol.* 105:9-13.
- Maurel, C. 1997. Aquaporins and water permeability of plant membrane. *Annual Review of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 48:399- 429.
- Maurel, C. and Chrispeels, M. 2001. Aquaporins. A Molecular entry plant water relations. *Plant Physiol.* 25:135-138.
- Picaud, S., Becq, F., Dédaldéchamp, F., Ageorges, A. and Delrot, S. 2003. Cloning and expression of two plasma membrane aquaporins expressed during the ripening of grape berry. *Funct. Plant Biol.* 30:621- 630.
- Preston, G., Carroll, P., Guggino, B. and Agre P. 1992. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science.* 25:385-387.
- Quigley, F., Rosenberg, J., Shachar-Hill, Y. and Bohnert, H. 2001. From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins. *Genome Biol.* 3:1-17.

- 
- Rogiers, S. Smith, J. White, J. Keller, M. Holapfel, B. and Virgona, J. 2001. Vascular function in berries of *Vitis vinifera* (L) cv. Shiraz. *Aust. J. Grape Wine Res.* 7:46- 51
- Roller, J. 2003. Gibberellic acid and basal leaf removal implications for fruit maturity, vestigial seed development, and sensory attributes of sovereign coronation grapes. Department of Biological Sciences. Brock University. St. Catharines, Ontario. Canada. 56p
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schuermans, J. Van Dongen, J. Rutens, B. Boonman, A. Pieterse, C. and Borstlap, A. 2003. Members of aquaporin family in developing pea seed coat include representatives of the PIP, TIP, and NIP subfamilies. *Plant Mol. Biol.* 53:633-645
- Steenkamp, J., Wiid, I., Lourens, A., Van Helden, P. 1994. Improved method for DNA extraction from *Vitis vinifera*. *Am. J. Enol. Vitic.* 45 (1):102-106.
- Tyerman, S., Niemietz C. and Bramley H. 2002. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ.* 25 (2):173–194.
- Weaver, R. 1958. Effect of gibberellic acid on fruit set and berry enlargement in seedless grape of *Vitis vinifera*. *Nature* 181:851- 852
- Yang, S., Maesuima, M., Tanaka, Y. and Komatsu, S. 2003. Modulation of vacuolar  $\text{h}^+$ -plums and aquaporins by phytohormones in rice seedling leaf sheaths. *Biol. Pharm. Bull.* 26(1):88-92.