



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

**ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE GENES
RELACIONADOS CON EL CRECIMIENTO DE BAYA EN UVA DE
MESA, EN FENOTIPOS CONTRASTANTES EN TAMAÑO DE
BAYA Y SEMILLA**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL
EN BIOTECNOLOGÍA

PABLO ANTONIO MUÑOZ ROBREDO

PROFESOR GUÍA:
ORIANA SALAZAR AGUIRRE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
MAURICIO ALFREDO GONZÁLEZ AGÜERO
JOSE CRISTIAN SALGADO HERRERA

**SANTIAGO, CHILE
ENERO DE 2010**

ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL CRECIMIENTO DE BAYA EN UVA DE MESA, EN FENOTIPOS CONTRASTANTES EN TAMAÑO DE BAYA Y SEMILLA

La uva de mesa es la fruta más exportada en Chile. Sobre ella recaen una serie de condiciones que debe cumplir para poder ser exportada, como por ejemplo, que posean un alto calibre de bayas (gran tamaño) y apirenia (ausencia de semillas) en sus frutos. Sin embargo, el desarrollo simultáneo de ambas características es incompatible de forma natural, principalmente por motivos hormonales. Esta memoria se desarrolló en el marco del proyecto Genoma II en uva de mesa, que busca el desarrollo de marcadores genéticos que permitan la identificación temprana de los caracteres antes mencionados.

El presente trabajo tuvo como principal objetivo el estudio de la relación entre estos caracteres (apirenia y tamaño de baya) y los perfiles de expresión de los genes de la proteína inhibidora de pectin metilesterasa (*PMEI*) y de Spindly (*SPY*). Ambos genes fueron identificados previamente en una búsqueda realizada utilizando el método de mapeo por QTL's (Quantitative Trait Locus) y estarían estrechamente ligados con la condición de apirenia estenospermocárpica y la expresión del carácter tamaño de baya en *Vitis Vinifera* L. En este Trabajo de Memoria se diseñó partidores para aislar por PCR fragmentos de tres isoformas de *PMEI* y tres isoformas distintas de *SPY* en *Vitis vinifera*, los que se caracterizaron parcialmente en su secuencia nucleotídica y aminoacídica. Se identificó, caracterizó y analizó el patrón de expresión de estos genes, mediante el uso de la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real, en cuatro individuos segregantes con fenotipos contrastantes, en tamaño de baya y presencia/ausencia de semilla, en siete diferentes estadios de desarrollo. Dichos individuos provienen de la recombinación de dos parentales apirenos esternocárpicos (Ruby y Sultanina). Adicionalmente se analizó la posible participación de estos productos protéicos en vías metabólicas, encontrándose que *SPY* podría estar participando en la vía de las giberelinas, actuando sobre represores e inhibidores de GA, y *PMEI* participaría en la vía de la degradación de pectinas inhibiendo el accionar de PME.

Al comparar los perfiles de expresión entre individuos con fenotipos contrastantes de baya y semilla, se observó que a medida que las bayas se van desarrollando, ocurren cambios de los niveles de expresión en la mayoría de los genes analizados. Se detectó que los dos genes candidatos obtenidos de los estudios por QTL (*PMEI-2* y *SPY-A*), no presentaron cambios en su perfil de expresión que se puedan asociar al fenotipo tamaño de baya o semilla; en cambio los nuevos genes identificados en este estudio, como *PMEI-1* y *SPY-C* estarían relacionados con el desarrollo de la baya y *SPY-B* estaría asociada a los cambios relacionados con el tamaño de la semilla. Este resultado, presenta una inconsistencia con respecto a lo indicado por el método de mapeo por QTL y por ende, se recomienda realizar un nuevo mapeo por QTL con una mayor saturación de marcadores moleculares.

Se sugiere a partir de este estudio, un nuevo análisis con todas las isoformas génicas, en el que se diferencien tejidos (de baya, de piel y de semilla), y se utilicen a lo menos tres o más segregantes por fenotipo, con el propósito de realizar ensayos con una mayor certeza y precisión a nivel estadístico, que permitan obtener datos confiables que relacionen un gen con un fenotipo determinado y no con un individuo en particular. Los resultados de esta investigación generaron además, información genética y biológica de ambos genes, la cual permitiría realizar una aproximación hacia el conocimiento de los caracteres en estudio.

I. ÍNDICE DEL CONTENIDO.

1. Introducción	01
1.1. Antecedentes Generales	01
1.1.1. Introducción: la uva de mesa	01
1.2. Antecedentes bibliográficos	02
1.2.1. La uva de mesa	02
1.2.2. Variedades apírenicas de uva de mesa: Ruby y Thompson Seedless	02
1.2.2.1. Ruby Seedless	02
1.2.2.2. Thompson Seedless	03
1.2.3. El mercado de la uva de mesa y la genética en Chile	03
1.2.4. Apirenia y tamaño de baya	05
1.2.5. Métodos para el estudio de la expresión génica	06
1.2.5.1. <i>Northern Blots</i>	07
1.2.5.2. Arreglos de cDNA (micro y macro <i>Arrays</i>)	07
1.2.5.3. PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)	08
1.3. Antecedentes del proyecto	11
1.3.1. Genes candidatos	11
1.3.1.1. Inhibidor de Pectin Metilesterasa (<i>PMEI</i>)	12
1.3.1.2. Spindly (<i>SPY</i>)	13
1.3.2. Origen de las muestras en estudio	14
1.4. Hipótesis y objetivos	16
1.4.1. Hipótesis de Trabajo	16
1.4.2. Alcances de esta memoria	16
1.4.3. Objetivo General	17
1.4.4. Objetivos específicos	17
2. Metodología	18
2.1. Búsqueda bibliográfica y de base de datos	18
2.2. Obtención de los perfiles de expresión	18
2.2.1. Material vegetal	18
2.2.2. Extracción de RNA de muestras, cuantificación y verificación de integridad	18
2.2.3. Purificación de mRNA a partir de RNA total	19
2.2.4. Síntesis de cDNA y verificación	19
2.2.5. Diseño de Partidores	20
2.2.6. Amplificación por PCR a partir de cDNAs	20
2.2.7. Análisis de expresión diferencial de Genes	20

2.2.8. Búsqueda de un gen de expresión constitutiva para los ensayos de qPCR	21
2.2.9. Análisis estadístico	21
2.3. Identificación y caracterización de genes	21
2.3.1. Obtención de los transcritos de largo completo mediante Race PCR	21
2.3.2. Clonamiento, obtención y estudios de secuencias	21
3. Resultados y discusión	23
3.1. Búsqueda bibliográfica y de base de datos	23
3.1.1. Búsqueda de secuencias de genes candidatos	23
3.1.2. Construcción de arboles filogenéticos	29
3.1.3. <i>PMEI</i> y <i>SPY</i> : Posibles vías metabólicas involucradas	32
3.1.4. Identificación de secuencias y diseño de partidores	36
3.1.5. RACE PCR	37
3.2. Obtención del perfil de expresión de los genes analizados	39
3.2.1. De la obtención del RNA	39
3.2.2. Síntesis de cDNA	42
3.2.3. Prueba de partidores	42
3.2.4. Confección de curvas estándar para qPCR	44
3.2.5. Perfiles de expresión	45
4. Conclusiones	64
5. Recomendaciones y Comentarios	66
6. Referencias bibliográficas	67
7 Anexos	73
Anexo A: Mapeo funcional de genes candidatos en vid	73
Anexo B: Posición de los QTLs en el mapa consenso en cromosomas 2 y 8	74
Anexo C: Estados fenológicos según Baggiolini	75
Anexo D: Desarrollo de la baya según estados fenológicos de Baglioni, en etapas en estudio	76
Anexo E: Individuos segregantes escogidos como contrastantes	77
Anexo F: Número de moléculas de mRNA de cada segregante para cada uno de los estadios	78
Anexo G: Resultado de la espectrofotometría de la purificación de mRNA	81
Anexo H: Resultado de la espectrofotometría de la síntesis de cDNA	82
Anexo I: Protocolo de Purificación de mRNA (Dynabeads)	83
Anexo J: Protocolo <i>Hot Borate</i> para la extracción de RNA	85
Anexo K: Síntesis de cDNA. Enzima MMLV-RT (Promega)	87
Anexo L: Secuencia Fasta de los genes candidatos	88
Anexo M: Fotos de geles de ensayos de amplificación	89

II. ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICOS.

Figuras

Figura 1: Posición de los genes que codifican <i>SPY</i> en sus formas A, B y C dentro del cromosoma 8 de <i>Vitis vinífera</i> _____	28
Figura 2: Posición de los genes que codifican <i>PMEI</i> en sus formas 1, 2 y 4 dentro del cromosoma 2 de <i>Vitis vinífera</i> _____	28
Figura 3: Posición del gen que codifican <i>PMEI-3</i> dentro del cromosoma 19 de <i>Vitis vinífera</i> _____	28
Figura 4: Árbol filogenético radial de las isoformas de <i>PMEI</i> detectadas en <i>Vitis vinífera</i> _____	29
Figura 5: Árbol filogenético radial de las proteínas <i>SPY</i> detectadas en <i>Vitis vinífera</i> _____	30
Figura 6: Árbol filogenético para las formas de <i>PMEI</i> _____	31
Figura 7: Árbol filogenético para las formas de <i>SPY</i> _____	32
Figura 8: Posibles vías de participación de <i>PMEI</i> en los procesos de degradación de pectinas y elongación celular_____	34
Figura 9: Posibles vías de participación de <i>SPY</i> sobre las vías de la giberelinas_____	35
Figura 10: Ensayo de amplificación de RNA y cDNA obtenidos mediante uso de kit_____	40
Figura 11: Verificación de la extracción de RNA total en gel denaturante_____	41
Figura 12: Comprobación síntesis de cDNA, para muestras de los 4 segregantes y parentales_____	42
Figura 13: Prueba de partidores de <i>PMEI</i> y <i>SPY</i> (Ta=60 °C)_____	43
Figura 14: Prueba de partidores de <i>PMEI</i> y <i>SPY</i> en cDNA obtenido a partir de RNA de Hoja_____	43
Figura A-1: Posición de los QTLs para peso fresco de semillas (SFW) y peso de baya (BW) en el mapa consenso de Ruby Seedless x Thompson Seedless_____	74
Figura A-2: Esquema de los estados fenológicos de Baggiolini (A-P)_____	75
Figura A-3.1: Desarrollo del carácter tamaño de baya a partir del estado de floración_____	76
Figura A-3.2: Vista en el parrón de cada uno de los siete estadios en estudio para una cepa tinta de vid_____	76
Figura A-4: Fotografía de los fenotipos contrastantes seleccionados_____	75
Figura A-5: Ensayo de amplificación de RNA y cDNA obtenido mediante kit con uso de DNAsas Rq1_____	89
Figura A-6: Ensayo de amplificación de RNA y cDNA obtenido mediante kit con uso de DNAsas 1_____	89
Figura A-7: Ensayo de amplificación de RNA y cDNA obtenido mediante kit con uso de purificación mediante el uso de Dynabeads poli T_____	89

Gráficos

Gráfico 1: Curva de expresión obtenida mediante técnica PCR en tiempo real	9
Gráfico 2: Perfil de expresión de <i>PMEI-1</i>	46
Gráfico 3: Perfil de expresión de <i>PMEI-2</i>	46
Gráfico 4: Perfil de expresión de <i>PMEI-4</i>	47
Gráfico 5: Perfil de expresión de <i>SPY-A</i>	47
Gráfico 6: Perfil de expresión de <i>SPY-B</i>	48
Gráfico 7: Perfil de expresión de <i>SPY-C</i>	48
Gráfico 8: Perfil de expresión de <i>PMEI-1</i> separado por segregante	50
Gráfico 9: Perfil de expresión de <i>PMEI-2</i> separado por segregante	51
Gráfico 10: Perfil de expresión de <i>PMEI-4</i> separado por segregante	52
Gráfico 11: Perfil de expresión de <i>SPY-A</i> separado por segregante	53
Gráfico 12: Perfil de expresión de <i>SPY-B</i> separado por segregante	54
Gráfico 13: Perfil de expresión de <i>SPY-C</i> separado por segregante	55
Gráfico 14: Perfil de expresión del segregante 19	57
Gráfico 15: Perfil de expresión del segregante 27	57
Gráfico 16: Perfil de expresión del segregante 184	58
Gráfico 17: Perfil de expresión del segregante 359	58
Gráfico A-1: Distribución de la población de segregantes según las coordenadas de peso fresco de semilla versus peso de bayas	77

Tablas

Tabla 1: Similitud de secuencias nucleocídicas entre la secuencias que transcriben el gen inhibidor de Pectin metilesterasas	26
Tabla 2: Similitud de secuencias nucleocídicas entre la secuencias que transcriben el gen Spindly	26
Tabla 3: Similitud de secuencias aminoacídicas entre la secuencias que transcriben el gen <i>PMEI</i>	26
Tabla 4: Similitud de secuencias aminoacídicas entre la secuencias que transcriben el gen <i>SPY</i>	27
Tabla 5: Resumen de posiciones y largos de las formas génicas de <i>PMEI</i> y <i>SPY</i>	27
Tabla A-1: Resumen de los genes candidatos	73
Tabla A-2: Estados fenológicos de vid ocupados para el estudio, y su abreviatura	76
Tabla A-3: Resumen de los fenotipos contrastantes	77
Tabla A-4: Numero de moléculas por μ l de mRNA	78
Tabla A-5: Absorbancias medidas para muestras de mRNA purificado de cada segregante	81
Tabla A-6: Absorbancias medidas para muestras de cDNA sintetizado para cada segregante	82

III. LISTADO DE ABREVIATURAS.

°BRIX	Grado Brix (Concentración de glucosa en un líquido)
°C	Grados Celsius
15s, 25s	Subunidades Ribosomales
ACT	Gen Actina
AGL / VvAGL	Gen Agamous Like 11
ANOVA	Análisis de la Varianza
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Herramienta de búsqueda de alineamiento local)
Ca ⁺⁺	Ión calcio
cDNA	DNA complementario
cM	CentiMorgans
CY3 o CY5	Moléculas fluorescentes compuestas de cianina
DAP	Gen dehydrodipicolinato reductasa
DELLA	Proteína Reguladora del crecimiento de baya
DIM	Base de datos de Departamento de Ingeniería matemática de la U de Chile
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxiribonucleótidos trifosfato
EF1 α	Gen Factor de elongación 1 alpha
<i>EXP</i>	Gen Expansina
FASTA	Formato de escritura aminoacídica y nucleotídica proveniente del programa FASTA (fast all)
<i>FRGA</i>	Factores de respuesta a GA
g	Gramos
GA	Gibelinas
GA ₃	Acido Giberélico
<i>GA-MYB</i>	Factor de transcripción de Mieloblastosistos de Giberelinas
GAI	Inhibidores de Giberelinas
<i>GARE</i>	Genes de respuesta a giberelinas
GAZE	Herramienta de analisis de la prediccion de secuencias y de predicción en secuencias completas génicas
GTP	Guanosín trifosfato
H ⁺	Protones
ID	Identidad o identificación

INIA	Instituto nacional de investigación agropecuaria
kb	Kilo pares de bases
<i>LFY</i>	Gen Leafy
Loci / (pl. locus)	Posiciones definidas cromosomales
LSD	Prueba de mínima diferencia significativa (Least significant difference)
MADS box	Secuencia génica conservada presente en secuencias génicas de familias de factores de transcripción en eucariontes.
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MMLV-RT	Nombre Enzima Transcriptasa Reversa proveniente de el virus de la leucemia murina de Maloney
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensajero
NCBI	Base de datos de National Center for Biotechnology Information
nm	Nanómetros
OD ₂₆₀	Densidades ópticas a 260 nm
pb	Pares de bases
PCR	Reacción de la polimerasa en cadena
PG	Poligalacturonasa
pH	Potencial de hidrogeno
PME	Gen Pectinmetilesterasa
PMEI / VvPMEI	Gen inhibidor de la proteína Pectinmetilesterasa
Pmol	Pico mol
qPCR	PCR cuantitativo
QTL	Método de mapeo (Quantity trait locus)
RGA	Represores de Giberelinas
RNA	Acido Ribonucleico
SPY	Gen Spindly
U	Unidades
Vv	Vitis vinifera
VvGDB	Base de datos de <i>Vitis vinifera</i> Genome Data Base
μM	Micro Molar
μl	Micro litros
μg	Microgramos

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. ANTECEDENTES GENERALES.

1.1.1. Introducción: la uva de mesa.

Las condiciones de globalización y de libre mercado existentes hoy en día entregan a los consumidores la posibilidad de escoger sus preferencias entre una amplia gama de posibilidades, siendo la principal tendencia de los usuarios escoger una buena relación de precio-calidad, además de cualidades de comodidad, rapidez y eficiencia. La industria de los alimentos no escapa de esta línea de exigencias contemporáneas, en donde las preferencias de los consumidores se dirigen a alimentos que sean fáciles y rápidos de preparar y que además tengan buen sabor, básicamente por la falta de disponibilidad de tiempo y por los niveles de estrés y cansancio que se detectan hoy en día. Es en estas condiciones que las comidas congeladas y de bajo contenido nutritivo gobiernan las preferencias de consumo del ser humano moderno. Así, por ejemplo, los niños prefieren abrir un paquete de *snacks*, antes de prepararse una fruta a la cual deben extraer la cáscara y separar las semillas para su consumo. Es por ello que para que sean atractivas al consumidor, las frutas deben carecer de semillas y no requerir mayor manipulación para ser ingeridas. La uva de mesa no escapa a esta regla y más aún, es deseable que ella presente un fruto de baya grande, de buena apariencia, con sabor dulce y leve acidez ^[1].

Una de las dificultades que encuentran los agricultores en el momento de iniciar un cultivo de vides (con las características deseables), es que éstas presentan una cierta variabilidad, debido a que los parrones en que se produce la uva de calidad comercial son producto de injertos. Estos generan una variedad de fenotipos sobre los cuales se debe realizar una posterior selección. Dicha selección es lenta y por lo general requiere de por lo menos 5 años, debido principalmente al tiempo que demora la vid en generar sus primeros frutos ^[2]. Por esto es de interés poseer marcadores, que permitan detectar tempranamente a cual fenotipo corresponde un determinado producto de un injerto, para realizar con mayor eficiencia el proceso de selección ^[3].

Es para la generación de dichos marcadores, que se debe estudiar las características fenológicas desde diversos ángulos; uno de ellos corresponde a la identificación de los genes que poseen mayor relación con la expresión de los caracteres de interés. En este contexto, esta memoria se orienta en el cual se estudio de la expresión de dos genes candidatos a ser responsables de los caracteres tamaño de baya y semilla.

1.2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

1.2.1. La uva de mesa.

La uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) pertenece a la familia *Vitaceae*. Ésta familia está compuesta por un total de 14 géneros y consta de al menos 800 variedades las cuales gran parte de ellas corresponde a plantas leñosas o lianas herbáceas (trepadoras); en particular el género *Vitis*, es el único que produce bayas comestibles. Las vides se presentan como una planta del tipo enredadera, de hojas caducas (que se caen entre temporadas) y tronco leñoso, en el cual sus ramas largas y flexibles tienen la capacidad de trepar fácilmente en busca de luz^[4].

Las bayas de vid suelen presentar diversas formas, turgencias y tonalidades, las cuales son propias de la variedad. Del mismo modo, los distintos cultivares varían en otros caracteres, tales como presencia de azúcares (Principalmente glucosa y fructosa), acidez, y concentración de nutrientes, entre los que destacan las vitaminas A, B6 y C, sustancias antioxidantes (flavonoides) y otros elementos como potasio, calcio, magnesio, hierro y cloro^[5].

Por otra parte, las vides son portadoras de un genoma de aproximadamente 500 millones de pares de bases^[6], relativamente pequeño si se compara con otras especies vegetales, como el trigo, que posee 16.000 millones de pares de bases^[7] o con el genoma humano con 3.000 pares de bases. El genoma de *Vitis vinifera* es diploide y está conformado por 19 pares de cromosomas^[6].

1.2.2. Variedades apirénicas de uva de mesa: Ruby y Thompson Seedless.

1.2.2.1. Ruby Seedless.



Ruby Seedless

La variedad Ruby Seedless fue originalmente desarrollada a partir del cruzamiento de las variedades Pirovano y Emperor en la Universidad de Davis en California en los Estados Unidos^[8]. Su estreno comercial se realizó en 1968 en dicho país; una década demoró esta especie en ser introducida en el mercado chileno bajo el nombre de “King Ruby”. Esta variedad destaca por ser una uva sin semillas (presenta apirenia del tipo estenospermocárpica), de color rojo oscuro (casi negruzco), aunque también se encuentra en una coloración roja azulada; esta variedad, presenta una capa de piel fina, con una baya blanda y suave de una forma ligeramente ovoide. Sus racimos tienden a ser grandes y apretados los que presentan hombros superiores largos, lo que permite que estos sean abundantes en bayas. Por lo general, cada racimo para exportación llega a pesar en promedio un kilogramo y el calibre de baya fluctúa

entre 16 y 18 milímetros ^[9]. Sin embargo, si no se dan las condiciones adecuadas para un buen crecimiento, esta variedad produce bayas muy pequeñas carentes de calidad comercial. Este problema se da con frecuencia en esta variedad, por ello es que se debe ser minucioso en los cuidados y tratamientos especiales durante su cultivo. Es una especie que prácticamente no responde al tratamiento con ácido giberélico (GA₃) para el crecimiento de baya. Por lo general, la cosecha se realiza cuando el racimo presenta un color uniforme y un contenido mínimo de azúcar de 16° Brix ^[8].

1.2.2.2. Thompson Seedless.



Thompson Seedless

La variedad Thompson Seedless, también denominada “Sultanina”, es oriunda de la zona de Irán Meridional. La introducción de esta variedad a suelos americanos fue realizada por William Thompson (de él deriva el actual nombre de la variedad) en California, Estados Unidos ^[10]. La variedad muestra un suave color verde y sus bayas son de forma oblonga, presentando un calibre promedio entre 18 a 20 milímetros; se caracteriza por poseer un sabor muy dulce y abundancia de jugo. Por otra parte, su racimo es excesivamente compacto, de un tamaño mediano ^[9]. Aunque originariamente se cultivó para la producción de pasas (Sultanas), hoy en día también se destina a la producción de uva de mesa. Esta variedad destaca por ser la variedad de uva apirena más cultivada a nivel mundial, la que sin embargo, requiere de aplicaciones de GA₃ en distintas instancias de su desarrollo, además de requerir ciertos tratamientos sobre la parra; alcanzan un nivel de rendimiento de 18 a 20 toneladas por hectárea de suelo cultivado. Su recolección se realiza una vez que la uva alcanza 18° Brix ^[10].

1.2.3. El mercado de la uva de mesa y la genética en Chile.

Chile es el principal exportador de Uva de Mesa en el hemisferio sur, además de ser el segundo exportador a nivel mundial de este fruto, con un total de 62 mil hectáreas de plantación a lo largo del país. Posicionando a la uva de mesa como la fruta con mayor producción nacional, concentrándose los cultivos de esta especie principalmente en la zona que considera desde la región de Atacama a la del Maule, donde se concentra más del 90 % de la uva de mesa que se genera en el país. Las principales variedades producidas en Chile son Thompson Seedless con una producción de 836 mil Toneladas/año (27,6 % del mercado de uva de mesa), Red Globe con 651 mil Toneladas/año (21,5 %), Crimson Seedless con 507 mil Toneladas/año (19,0 %), Flame Seedless con 395 mil toneladas/año (14,9 %) y Sugraone con 308 mil toneladas/año (8 %) ^[11].

La producción de uva de mesa en Chile tiene tres objetivos principales: por una parte, un 80 % de la fruta generada es exportada, presentando como mercados objetivos E.E.U.U. (59 %), Europa (24 %),

Asia (8 %) y Latinoamérica (7,4 %) ^[12]. El segundo destino de la uva corresponde al consumo en el mercado nacional, a lo que se destina un 11,6 % del total nacional producido y una tercera fracción (6,6 %) es destinada a la industria de alimentos. El volumen exportado de uva de mesa corresponde a más de 700 miles toneladas métricas de fruto, teniendo un mercado en la temporada 2008-2009 de un total de 776,2 millones de dólares ^[13].

Tal como lo indican los números, la producción de uva de mesa es un negocio que deja varios millones de dólares cada año y que permite la creación de miles de puestos de trabajo a lo largo del país. Sin embargo, en las últimas temporadas se ha perdido competitividad, debido básicamente a problemas con la condición de llegada de la fruta a nivel del consumidor. Por otra parte, otros países productores de uva de mesa, como por ejemplo Israel, ya se encuentran desarrollando estudios para realizar mejoras genéticas, orientadas a mejorar la competitividad de sus vides frente al mercado internacional. Es por esta razón que en Chile existen varias instituciones involucradas con el sector, que están preocupadas por el eventual escenario que podría llegar a afrontar la industria de la uva de mesa, y que están generando investigación y desarrollo en esta área ^[14].

En la actualidad, este exitoso negocio exportador, depende ampliamente de la genética extranjera ya que prácticamente todas las variedades que se cultivan Chile son de origen extranjero. El conflicto que ello genera recae principalmente en los pagos asociados a los derechos de usufructo sobre las variedades, debido a las barreras que implican los derechos de propiedad intelectual; además, las variedades foráneas no siempre se ajustan a las condiciones agroecológicas bajo las que se desarrolla la producción de la uva de mesa en Chile (ya sea clima, tipo de suelo, resistencia a viajes en cámaras de frío, etc.).

Es por lo anterior, que existe una necesidad de impulsar el mejoramiento genético de vides para la obtención de nuevas variedades de uva de mesa. Este tipo de mejoras se pretende lograr mediante el uso de técnicas biotecnológicas, abordando diferentes áreas de la ciencia, como por ejemplo: la genómica, la proteómica, la agronomía, la fitopatología, la transgenia, entre otras ramas investigativas. Estas áreas integradas y bien dirigidas, pueden lograr el objetivo de mejorar las vides nacionales, aumentando el rendimiento de éstas, bajo las condiciones de clima y suelo nacionales; además de generar una mayor resistencia a los tratamientos de postcosecha y de crear variedades autóctonas que destaquen y den identidad propia a la uva producida. En este ámbito, Chile cuenta con dos variedades propias de uva de mesa denominadas Isela e Ilusión las que son el resultado de 18 años de trabajos de mejoramiento genético realizado en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) ^{[15] [16]}.

1.2.4. Apirenia y tamaño de baya.

Al realizar un sencillo análisis de las preferencias de los consumidores de uva de mesa, destaca el interés por uvas con bayas que carezcan de semillas palatables (apirenia). Llega a ser tan fuerte esta condición sobre el mercado, que se estima que cerca del 75 % de la producción nacional de uva de mesa total corresponde a uvas apirénicas. Por otra parte, otro carácter agronómico deseado es el hecho de que la bayas sean de un alto calibre, es decir que presente uvas grandes. Ambas condiciones (apirenia y tamaño de baya grande) son incompatibles de forma natural principalmente por motivos hormonales. En esta línea, existen reportes que indican que el crecimiento del fruto en tamaño de baya está relacionado con la presencia de semillas y tamaño de éstas, debido a la producción de giberelinas (GA), las cuales actúan como hormona de crecimiento de la baya, siendo la semilla la principal fuente de producción de GA ^[17].

En variedades de uva de mesa apirenas, el crecimiento de la baya dependerá de las aplicaciones de GA₃ (GA aportado de manera exógena) al viñedo; la magnitud de este aporte varía con respecto a la variedad de uva, tanto en número de aplicaciones como en cantidad de ácido aplicado ^[18]. La idea a nivel de investigación, es entonces generar variedades de vides de baya grande que no necesiten de aplicación exógena de GA₃ y que además presenten el carácter de apirenia.

En un aspecto más genético, se han desarrollado estudios comparando tamaños de bayas contrastantes en *Vitis vinifera* ^[19], analizando la expresión génica mediante el uso de micro-arreglos. Interesantemente se observó que en bayas pequeñas existe una sobreexpresión de genes relacionados con metabolismo secundario, vinculados a resistencia a stress y procesos de defensa, por ejemplo oxidoreductasas, metiltransferasas y liasas. Por otra parte, los genes sobreexpresados en bayas grandes estaban mayormente involucrados en procesos primarios, como transporte de agua (acuaporinas), asimilación de azúcares (invertasas) y síntesis de malato en el citoplasma (fosfoenolpiruvato carboxilasa PEP Case) ^{[20] [21]}. Pese a estos avances, no existen datos concluyentes que determinen los principales genes asociados la expresión del carácter de tamaño de baya (relación fenotipo-genotipo), ni menos a la relación de esta condición con el tamaño de semilla.

En relación al tema de la apirenia, por lo general existen algunas variedades de uva de mesa en las que se observa problemas embrionarios, los que traen como consecuencia un aborto de las semillas correctamente fecundadas entre dos y cuatro semanas después de la fecundación. A este tipo de aborto embrionario se entrega la denominación de estenoespermiocarpia; este tipo particular de partenocarpia (proceso mediante el cual se genera un fruto carente de semilla) permite que existan variedades apirenas, dado que la semilla se expresa en forma de una traza o fragmento imperceptible para el paladar. Las bases biológicas, genéticas o moleculares que gobiernan este proceso son aún desconocidas, manejándose solo ideas a nivel de hipótesis que deben ser estudiadas para su validación ^{[22] [23]}.

Retomando el tema de la apirenia (estenoespermocarpica) en uva, existen diversas hipótesis que tratan acerca de los genes que controlan este carácter; una de ellas postula que la apirenia sería controlada por un gen recesivo ^[22]. Otros autores hablan de una combinación de dos ^[24] o mas genes ^[25]. Ninguna de estas hipótesis es capaz de resolver el paradigma que se produce a partir de la generación de individuos semillados desde parentales apirenos que se da en la naturaleza. De hecho, el análisis se hace más complejo en cuanto se han encontrado no solo individuos semillados en cultivos apirenos, sino también el caso contrario, con lo cual dichas teorías parecieren no ser adecuadas para explicar el fenómeno. Lo mismo pasa con teorías que hablan sobre genes dominantes que afecten el proceso ^[26]. El modelo más aceptado, para explicar la herencia de apirenia, es la existencia de varios genes recesivos independientes, que están dominados por una serie de reguladores e inhibidores pertenecientes a una red compleja de regulación.

En búsqueda de satisfacer alguna de estas hipótesis, existe un estudio ^[27], en el cual mediante un mapeo por QTLs (*Quantitative Trait Locus*) se ha logrado identificar un gen que presenta una gran relación con la condición de apirenia. Este gen se encuentra en el cromosoma 18 de *Vitis vinifera*; confirmándose posteriormente que corresponde al gen *AGL11* (Agamous like MADS box) que se reporta como un regulador transcripcional ^[27], que sería el responsable de más del 70 % de la respuesta a variación de peso fresco de semilla (y por ende de apirenia) en uva. Es en este último estudio, en el cual se obtienen otros dos genes candidatos a ser responsables de la condición de apirenia: *PMEI-2* (inhibidor de pectinmetilesterasa 2) en el cromosoma 2 y *SPY* (Spindly) en el cromosoma 8 de *Vitis*. Estos genes son el objeto de estudio en este trabajo de memoria y se detallarán posteriormente.

1.2.5. Métodos para el estudio de la expresión génica.

Dentro de la biología existe un cierto interés por comprender una serie de caracteres y respuestas que presentan los organismos frente a una diversidad de escenarios y factores que pueden ser útiles, ya sea para conocer sus mecanismos de funcionamiento, o bien en un aspecto más industrial, para mejorar las cualidades de un producto que se genere a partir de dichos organismos. Para ello, se utilizan herramientas como las que otorga la biología molecular. Es así como se recurre en muchos casos a la elaboración de perfiles de expresión, los cuales indican cuanto cambia un determinado gen bajo diferentes condiciones, tratamientos o tiempos; este perfil permite adquirir una perspectiva más amplia, para comprender los fenómenos que ocurren en el organismo en cuestión. En la actualidad existen diversas metodologías para llegar a estos perfiles; algunas de ellas son presentadas a continuación.

1.2.5.1. *Northern Blot*.

Es un método muy usado para el estudio de la expresión génica. Para su realización se procede a una separación electroforética por tamaño, de una muestra de RNA en geles denaturantes; a partir de dichos geles los RNA son transferidos mediante capilaridad, a una membrana de nylon o nitrocelulosa, a la cual se realiza un tratamiento (que permite la fijación de los RNA) y de posterior pre-hibridación en dichas membranas^[28]. Posteriormente se ejecuta una hibridación, la que se realiza con sondas específicas al mRNA en estudio, estas sondas deben ser confeccionadas de tal manera que sean complementarias al mRNA de interés y debiesen estar marcadas radiactivamente; el proceso de *Northern blot* es continuado por un lavado que permite dejar solo las sondas hibridadas a un mRNA, las cuales se identifican con un proceso de autoradiografía sobre la membrana. Es posible cuantificar los niveles de mRNA específico, al correlacionar el número de mRNA en la muestra con la intensidad de la radiación que se capte en el proceso radiográfico^[29].

Este método es uno de los más usados para medir la expresión génica, ello por ser un método fácil, de costo no muy elevado. Hay que prestar ciertas atenciones en su aplicación, como por ejemplo, tener presente el hecho de que el RNA se degrada fácilmente, lo que implica que el tiempo en que se debe realizar todo el proceso debe ser corto. Por otra parte, el traspaso de RNA a la membrana no es 100% eficiente y depende del tiempo utilizado en el movimiento, lo cual convierte al *Northern blot* en una técnica cuasi-cuantitativa^[30], pero de alta representatividad. Otro factor que se debe analizar en el momento de elegir esta técnica, es que ella depende de la elaboración de sondas con afinidad específica al RNA de interés (lo que permite dar especificidad al método) con la inclusión de un sistema de marcaje y sondeo de señal definido y proporcional al nivel de expresión existente en la muestra en estudio^[31].

1.2.5.2. Arreglos de *cDNA* (micro y macro *Arrays*).

Pertenece básicamente a un caso particular de las hibridaciones, este método permite la cuantificación e identificación génica de múltiples genes a la vez. Consiste básicamente en la inmovilización de muestras de cDNAs, sintetizados a partir de mRNA, sobre un sustrato sólido o en placas, en las cuales se practica la hibridación de sondas específicas marcadas, ya sea radiactivamente, por fluorescencia (fluorocromos, Cy3 y Cy5) o por actividad enzimática (fosfatasa alcalina y peroxidasa)^[32], formando una matriz de secuencias en 2 dimensiones. La cuantificación de la expresión se obtiene tras una serie de pasos, los que incluyen lavados del sustrato sólido y un escaneo de la intensidad de señales, lo que permite realizar la cuantificación de los mRNA^[33], mediante el uso de aparatos de escaneo adecuados; que utilizan tecnologías que llegan hasta el uso de la robótica y de lentes y sensores de alta resolución^[34].

Una de las principales virtudes de este método es que debido a su configuración permite estudiar la expresión de múltiples transcritos en paralelos, lográndose construir, perfiles de expresión a partir de datos diferenciales ^[34]. Todo ello en un proceso miniaturizado, con un alto grado de sensibilidad ^[35]. Esta técnica destaca por sobre el *Northern blot* en eficiencia, resolución y repetitividad, sin embargo no se justifica su realización si no se está evaluando gran cantidad de genes, principalmente por el costo asociado a cada uno de estos ensayos.

1.2.5.3. PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR).

Es una técnica basada en el PCR tradicional y permite comparar en forma cuantitativa la abundancia relativa de un determinado transcrito. Esta técnica posee ciertas ventajas sobre método del *Northern blot*, destacando el hecho de que requiere una cantidad menor de RNA, es más rápido y sensible, entre otras características. El PCR cuantitativo consta de dos partes principales: una que corresponde a la transcripción reversa de los mRNA ^[36], en donde se usa principalmente un partidador complementario a la cola poli-A de los mRNA y una enzima transcriptasa reversa, que es una polimerasa que usa como molde RNA para sintetizar una doble hebra de cDNA. Este cDNA usado como templado en la siguiente etapa. Posteriormente, se realiza el análisis cuantitativo. Este último paso corresponde a una amplificación por PCR en tiempo real en el cual se registra, después de cada ciclo del PCR, la medición de intensidad de señal de un reportero que porta un fluoróforo ^[37]. Dichos reporteros pueden ser marcadores inespecíficos, como el SYBR green (afín a doble hebra) o marcadores específicos tales como sondas de hibridación (FRET), o sondas Fluorocromo-Quencher (algunas sondas comerciales de este tipo son: Taqman, Scorpion o Eclipse) y sondas Lux (Plexor, Universal ProbeLib).

Para realizar la cuantificación, se debe poseer un estándar con una cantidad conocida de DNA. Ello se puede lograr por diversos métodos. El más usado es la espectrofotometría, que permite relacionar la absorbancia detectada para una muestra de DNA con la concentración que dicha muestra posee mediante una relación empírica. Con un DNA estándar, es posible construir una curva de calibración. La curva de calibración generalmente se logra realizando un PCR sobre una serie de diluciones a partir del estándar, con lo que se define una curva que es característica para cada gen ^[38].

Durante los ensayos de cuantificación, se puede observar que la curva generada por la intensidad de señal del gen reportero a lo largo de la amplificación presenta una forma sigmoidea, lo cual aparentemente no concuerda con la idea de que en una reacción de PCR el número de partículas en función al número de ciclos de la reacción se manifiesta de modo exponencial bajo la relación:

$$n_m = n_0 * \epsilon * 2^m \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde m es el número de ciclos de PCR, n_0 es la cantidad inicial de DNA y ε es la eficiencia de la reacción (en condiciones ideales $\varepsilon=1$) [38].

En dicha curva (gráfico 1), el primer tramo corresponde a un artefacto de las mediciones. Dadas las limitaciones de lectura propias de los aparatos de PCR en tiempo real, los reporteros generan intensidades de señal inferiores a la banda muerta del equipo sensor [39]. Por ello se debe superar la intensidad del umbral mínimo para que la señal del fluoróforo, pueda ser captada sin influencia de ruido (la reacción cumple con la forma de la Ecuación 1 en esta etapa).

Posteriormente, una vez que se supera dicho umbral, la curva se ajusta al modelo presentado en la Ecuación 1, etapa en la cual se detecta un crecimiento exponencial de base 2; es durante este rango de mediciones donde todos los reactivos participantes se encuentran aún en abundancia y es en este periodo que la amplificación del PCR se refleja fielmente en la señal que detecta el sensor [39].

Esta etapa exponencial se detecta hasta que alguno de los reactivos de la reacción empieza a ser limitante, agotándose su disponibilidad. Ello implica que la reacción deja de ser exponencial y la amplificación sea muy variable, incluso entre réplicas. Es aquí cuando la medición de señal alcanza un techo al que se le denomina *plateau*. Si se pensase en evitar esta etapa, existen reportes que indican que este techo igual se detecta, principalmente debido a la competencia que se genera entre la renaturación del amplicón y la unión de las hebras denaturadas con los partidores de la reacción [40].

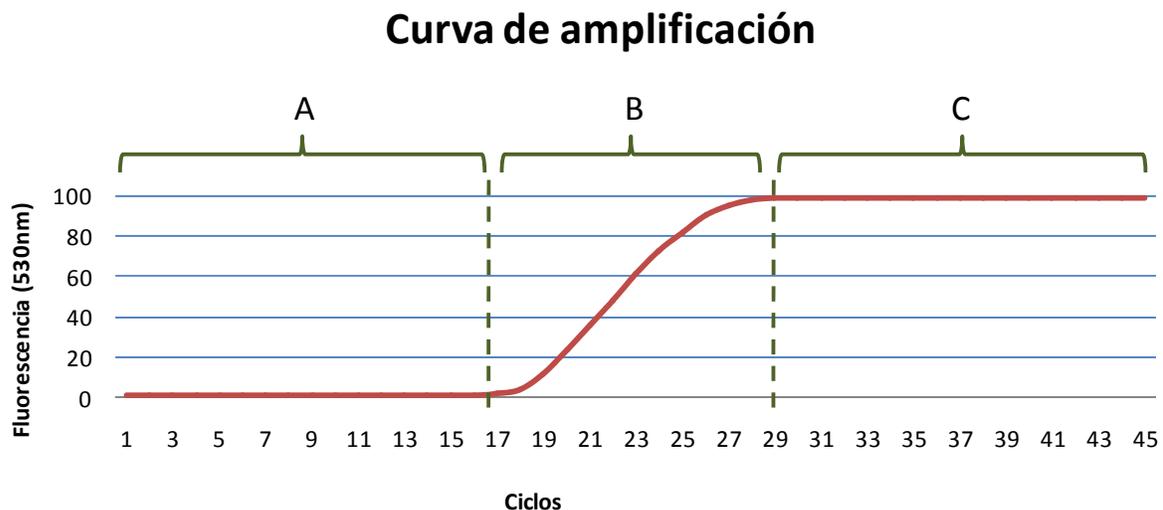


Gráfico 1: Curva de expresión obtenida mediante técnica PCR en tiempo real (En este ejemplo: En el sector A del gráfico el crecimiento es exponencial pero es imperceptible por los sensores, el área B corresponde a la fase exponencial medible, y el sector C corresponde al *plateau* de la reacción.)

La cantidad de ciclos en que cada una de estas etapas ocurre, depende de la cantidad inicial de DNA. Así en una muestra con más DNA, se detectara mas tempranamente el inicio de la fase exponencial, que en una muestra con menos DNA al principio. Es en dicha fase en la cual se debe escoger un punto representativo de la amplificación (al que comúnmente se le denomina *crossing point*) ello se realiza normalmente a través del método de la segunda derivada, en donde se calcula el máximo valor de la segunda derivada en la fase exponencial, que equivaldría teóricamente al último punto antes de que empiece a ejercer influencia algunos de los factores que conllevan al *plateau* ^[39].

Con los valores de *crossing point* se realiza la cuantificación, la que debe ser normalizada usando el nivel de expresión de un gen constitutivo. Para ello, este gen debe mostrar un cambio mínimo en su expresión bajo las condiciones en que se realiza el estudio. Existe una serie de genes que se ocupan para dicha función, sin embargo, estos genes podrían presentar cambios en su expresión si se aplican tratamientos que impliquen el estrés de mecanismos internos del organismo en estudio. Por ello se debe verificar para cada uno de los ensayos que estos genes conservan un nivel estable de expresión; por ejemplo, en algunos controles internos de uso común, tales como mRNA para actina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y ciclofilina, se ha encontrado que varían en los diferentes tejidos y pueden ser afectados por los tratamientos experimentales ^[41].

El método de qPCR es considerado como uno de los mejores métodos para la cuantificación de la expresión génica, dado que posee una alta sensibilidad y resolución. Además al amplificar las muestras, el efecto del ruido que pueda afectar las mediciones disminuye ostensiblemente entre mas ciclos transcurran en la reacción. Requiere bajas cantidades de material genético, es de un costo razonable y se puede verificar inespecificidades de amplificación mediante un ensayo inmediatamente posterior a la reacción, mediante el análisis de los puntos de *melting* de los productos generados ^[42]. Ello a través de mediciones constantes de intensidad de señal en un gradiente de temperaturas. Hay una temperatura en particular, en la cual existe un 50 % de hibridación de los amplicones y que es característica para cada secuencia nucleotídica. Ello se ve reflejado como un punto inflexión en la curva de intensidades de la señal del fluoroforo versus temperatura que definen el denominado punto de *melting*.

1.3. ANTECEDENTES DEL PROYECTO.

1.3.1. Genes candidatos.

En INIA se realizó -anterior a este trabajo- una identificación de genes candidatos con el propósito de explicar el fenómeno de apirenia en vid. Dichos genes fueron inicialmente integrados a un mapa genético y físico, con el objetivo de identificar variantes alélicas (marcadores del tipo SNPs) que puedan resultar de interés en la búsqueda de las condiciones deseadas de apirenia y alto calibre de baya. Dichos genes candidatos provienen de un proceso de selección relacionado con el carácter de apirenia a partir de 117 segregantes provenientes de un cruzamiento entre las variedades Thompson y Ruby Seedless. Estos segregantes fueron analizados mediante la técnica de búsqueda génica por QTLs, en diversas condiciones, y distintas etapas de desarrollo, usándose en el proceso 195 marcadores ^[43].

El mapeo de QTL es un procedimiento estandarizado ocupado en la genética cuantitativa ^[44] el cual comienza con la recolección de información genotípica, basada en marcadores moleculares, obtenida a partir de una población de segregantes con presencia en distintos niveles de expresión del rasgo de interés. Posteriormente, se ejecuta una serie de análisis estadísticos sobre la información fenotípica de cada uno de los segregantes, para revelar todos los posibles *loci*, donde la variación alélica se correlaciona con el fenotipo. Este permite un acercamiento de rasgos fenotípicos y genotípicos ^[45]. Sin embargo, este procedimiento permite mapear el genoma únicamente de manera aproximada (mapeo primario de QTL).

La resolución del método de mapeo por QTL depende del número de marcadores usados en la realización de la búsqueda, de esta manera entre más marcadores se utilicen, más exactitud adquiere este método, pues la distancia entre marcadores será de una menor magnitud en cM (centiMorgans). El ideal es poseer tantos marcadores como posibles recombinaciones presente el genoma en estudio ^[45]. Los procedimientos y estrategias para el mapeo primario de QTLs están bien establecidos y descritos en la literatura ^[47].

La base genómica para realizar el QTL y el mapeo genómico, que permitió la identificación de genes candidatos, se pudo trazar gracias a que, en Agosto de 2007, se liberó la secuencia genómica de un genotipo homocigoto de vid en un borrador de alta calidad ^[6] y en Diciembre de dicho año se publicó otro borrador de alta calidad generado a partir de un genotipo heterocigoto ^[46]. Mediante el mapeo génico indicado se encontraron 14 genes, los cuales se presume que participarían directamente en el proceso de crecimiento de semilla. Los genes con mayor varianza explicativa del fenómeno estudiado fueron *AGL11*, *PMEI-2*, y *SPY* en *Vitis vinifera*. Esta memoria estará centrada en estudiar dos de estos genes candidatos: *PMEI* y *SPY* (detalles en anexos A y B).

1.3.1.1. Inhibidor de Pectin Metilesterasa (PMEI).

Según el mapeo por QTL, este gen explicaría en un 19,0 % la variación fenotípica del peso seco de baya y en un 11,2% el carácter tamaño de semilla (ver anexo A). PMEI es una proteína inhibitoria que actúa por bloqueo de sitios sobre la proteína PME (pectinmetilesterasa), que sería la encargada de favorecer el accionar de otras enzimas, como por ejemplo la poligalacturonasa (PG). La acción de PME en la pared celular sería desmetilesterificar las cadenas de pectinas, en donde más específicamente extraería el grupo metilo de la posición 6 de los residuos de ácido galacturónico presentes en las pectinas de la pared. Normalmente, en las pectinas se establecen uniones no covalentes que conforman una red tridimensional que otorga firmeza y rigidez a la pared celular. El accionar de PME conllevaría a que en el momento de realizarse la extracción del grupo metilo se exponga la pared al ataque de otras enzimas con más facilidad ^[48]; es por ello que se ha relacionado el accionar de PME con diferentes fenómenos fisiológicos, tales como el crecimiento y la elongación celular. Por otra parte, se poseen antecedentes de que el accionar de esta proteína provocaría la liberación de grupos carboxilos, cambiando el pH y la carga de la pared celular, permitiendo la unión de ciertos polisacáridos mediante puentes de calcio que fortalecen la estructura de la pared ^[49].

Es por ambas razones (desmetilación y cambio de pH), que la función de la PMEI no se encuentra del todo clara dentro de la pared celular. Tal como se mencionó, por un lado, la presencia de los grupos metilos en las pectinas, entregaría rigidez a la pared celular, con lo que se dificultaría el crecimiento de baya; luego PMEI favorecería la rigidez de la pared; y por el otro lado PMEI regularía el cambio de pH, que produce la liberación de grupos carboxilos promovida por PME, y por ende regularía a otros factores que están relacionados con la extensión celular. Es por ello que gran parte de las hipótesis apuntan a que PMEI se encuentra supuestamente involucrada en el control de la expansión de la pared celular durante el desarrollo del fruto, maduración y desarrollo de las semillas ^[50].

En resumen se puede inferir que PMEI actuaría inhibiendo la actividad de la pectin metilesterasa; si esta proteína no está activa, entonces no se catalizaría la desmetilación de las pectinas, lo que implica que no existiría un crecimiento significativo de la baya. Como consecuencia de esto, el accionar de PMEI, evitaría el ablandamiento de la baya lo que le otorga resistencia al medio y permite el crecimiento adecuado de la baya; además PMEI actuaría como supuesto regulador del cambio de pH, consecuencias del accionar de PME ^[51]. Por último, a partir de la información disponible en la literatura ^[20] se puede presumir que PMEI poseería un alto grado de expresión en bayas tempranas, ello para proteger a dichas bayas de ataques del medio externo, evitándose así un ablandamiento temprano que afecte el desarrollo del fruto. Es por esto, que se esperaría que la mayor expresión de este gen se encuentre en las etapas tempranas del crecimiento de baya (baya de menos de 8 mm) ^[52].

1.3.1.2. Spindly (SPY).

Este gen fue reportado como el responsable que justificaría en un 12,9 % la variación fenotípica del carácter tamaño de baya en la vid, además de ser enunciado de manera indirecta como gen candidato para el carácter de tamaño de semilla (Ver anexo A). El regulador Spindly es una enzima que alteraría la actividad enzimática y que interrumpiría el mecanismo de respuesta a las giberelinas (GA) (Actuaría principalmente cómo regulador negativo de estas). Aunque también hay indicios de que en ciertas condiciones, regularía positivamente la respuesta de las giberelinas. Esta enzima estaría muy relacionada con la formación de semilla en la uva y con el desarrollo de baya ^[53]. El gen *SPY* es similar en secuencia a los genes que codifican las glucosilinas transferasa en animales, estas familias génicas realizan modificaciones en proteínas a través de la glucosilación de serinas o treoninas. La glucosilación que estas proteínas producen, modifica la actividad enzimática al bloquear sitios claves como los de fosforilación o sitios activos de las proteínas sobre la cuales actúan; se sospecha que el modo de operar de *SPY* sería similar al de las glucosilinas transferasas ^[54].

A partir de estudios en plantas como *Arabidopsis*, *SPY* actuaría en una etapa previa al accionar de las *GAI* (proteínas insensibilizadoras de giberelina) y *RGA* (proteínas represoras de giberelina), que serían factores claves de la transcripción en la cadena de transducción de señal de las giberelinas. El rol que ejercería *SPY* pareciese ser el de actuar como intermediario de la traducción de señal que activaría la expresión de *GAI* y *RGA* ^[55]. Ello se puede inferir a partir de un experimento en que se muestra que si se muta *SPY*, se produce un crecimiento de baya tan descontrolado, tal como si la uva hubiese recibido un tratamiento con giberelinas ^[56]. También se relaciona a *SPY* con la producción de proteínas DELLA (proteínas reguladoras negativas del crecimiento las cuales son reguladas a su vez por acción de las GA) ^[57] y con el accionar sobre citoquininas, compuesto que también es aplicado de manera exógena para favorecer el crecimiento de las bayas ^[56].

Se infiere bajo estos antecedentes que *SPY* en estados iniciales (estado de plena flor y bayas pequeñas) podría estar promoviendo la división celular y la diferenciación, mientras que en estados avanzados (pre y post envero) promovería la expansión celular a través de la vía de señalización de las giberelinas ^[58], siendo más fuerte la expresión en el primer caso (y en bayas pequeñas); el pico para su expresión se debiese producir en un tamaño de baya cercano a 4 mm.

1.3.2. Origen de las muestras en estudio.

El presente trabajo de Título se enmarca dentro del proyecto de investigación Fondef G0711002: “Identificación de genes relacionados con el desarrollo y crecimiento de bayas apirenas de vid mediante genómica funcional”. En la actualidad en INIA se está desarrollando una investigación multidisciplinaria en conjunto con la Universidad Andrés Bello y Universidad de Chile, suscrita al proyecto anteriormente enunciado, para lo cual se posee una población de segregantes (f_1 ; $n = 141$) ^[59], obtenidos a través de la recombinación de las variedades Ruby y Sultanina (Thompson Seedless). Ambas variedades progenitoras son apirénicas estenoespermocarpicas; en su descendencia se ha detectado fenotipos transgresivos extremos o contrastantes que están bajo estudio ^[59], es decir individuos semillados y apirenos, con baya grande y pequeña, los cuales se detallan en anexo E. Además de los 4 fenotipos estudiados, se realizarán las mismas pruebas sobre los parentales (f_0) es decir, las plantas que se utilizaron para obtener las variedades genéticas.

Todos estos fenotipos se presentaron en calidad de muestras a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ en diversas etapas desarrollo, que van desde el estado de flor hasta la etapa madura del fruto al momento de la cosecha, dichas etapas representan instancias importantes y diferenciables del desarrollo de uva (estados enunciados por Baggiolini en 1975) ^{[60][61]} que se detallan a continuación (más detalle de los estados fenológicos de Baggiolini en anexo C y sobre los estadios que se van a analizar en este estudio en anexo D):

1. **J (Plena Flor):** también llamada floración, corresponde a la etapa inmediatamente previa generarse la baya. En esta etapa el óvulo ya se encuentra fecundado, y los carpelos y otros elementos de la flor se encuentran listos para su transformación en lo que posteriormente adquirirá la forma de baya y que en la práctica no es más que un ovario fecundado en la vid.
2. **K Temprana (Baya 2-4 mm diámetro):** se detecta el nacimiento de la baya como tal. En esta etapa también denominada cuaja, se empieza a detectar una acumulación de clorofila en torno a al fruto, el cual es rico en ácidos y bajo en niveles de azúcar, en esta etapa comienza la captación de agua y el debilitamiento de la pared celular.
3. **L o K Tardía (Baya 8-10 mm diámetro):** sigue el crecimiento celular en la baya. En esta etapa toda la vid trabaja en el desarrollo de las uvas las que poseen grandes cantidades de ácidos tartáricos, málicos y en menor medida, cítricos. La baya sigue aumentando su volumen principalmente por la acción del desarrollo celular.
4. **M Temprana (15 días antes de envero):** en esta etapa disminuye el crecimiento celular que implica el aumento de tamaño de baya, este estado también es denominado “Receso de Verano” o “Apriete de Racimo” y se define en cuanto se deja de detectar crecimiento de la baya, lo que representa solo un estancamiento de crecimiento a nivel visible, ello porque internamente la fruta se está preparando para

la siguiente etapa en la cual se desarrollan importantes cambios y que corresponde a la denominada pinta.

5. **M (Envero o pinta):** es cuando la uva deja de crecer por desarrollo celular y empieza a generar crecimiento por elongación celular dado principalmente por la acumulación de agua (además de presentar otros cambios de interés agronómico como lo es cambio de color de la baya, desaparición de las haces xilemáticas funcionales¹, etc.). En esta etapa el fruto comienza a sintetizar azúcares los cuales van a ser característicos del fruto maduro.
6. **M tardía (15 días post-envero):** sigue la elongación celular y crecimiento de baya. A estas alturas, gran parte de los ácidos presentes han sido transformado en azúcares; además se puede detectar elasticidad de la pared vegetal, en esta etapa se desarrollan sustancias coloides y pigmentos que determinan el color de la baya.
7. **N (30 días post-envero):** la baya llega a un tamaño cercano de la uva madura, ésta deja de crecer y comienza a adquirir su constitución definitiva tanto en composición de azúcares y ácidos, además de denotarse la presencia del color definitivo y otros factores propios de la baya madura.

En resumen, si analizamos el crecimiento absoluto acumulado en peso fresco a lo largo de los estadios fenológicos, vemos que éste se ajusta a una curva sigmoidea (anexo D), en la cual el crecimiento del fruto se divide en 3 etapas: una primera etapa (etapas J a K tardío) que dura entre 20 y 40 días, y corresponde a crecimiento por división celular. Contiguo existe una segunda etapa de corta duración en la que se detecta un lento crecimiento (L y M temprano); y culmina con un último desarrollo en el cual ocurre la acumulación de agua y de hidratos de carbono, lo que provoca un aumento en la turgencia, ablandamiento, translucidez y pigmentación de la baya (estados M a N)^[60].

¹ Tejidos vasculares especializados que se encargan de circular los nutrientes desde las ramas hacia el fruto transportadas mediante Osmosis.

1.4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

1.4.1. Hipótesis de Trabajo.

Dada la relación negativa que presentan ambos genes con el crecimiento de la baya, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

Los mayores niveles de expresión tanto en *SPY* y *PMEI* se alcanzan en las etapas en las cuales se esté iniciando el crecimiento por multiplicación celular, es decir en etapas de plena flor y baya temprana.

Además se debiese cumplir que los niveles más altos de expresión debiesen ser mayores en magnitud en individuos apirénicos que en individuos semillados.

1.4.2. Alcances de esta memoria.

Uno de los objetivos que poseen los productores de uva de mesa, radica en la producción de un fenotipo de baya grande y ausencia de semilla, sin embargo, es de conocimiento que una semilla produce frutos con bayas y semillas idénticas a las que poseyó la semilla progenitora. Sin embargo, si se desea tener la condición de apirenia, dicha semilla no debe existir lo cual es una contradicción que se enfrenta mediante la plantación de injertos, lo que como ya se mencionó en la Introducción, genera problemas que vienen asociados con la variabilidad de la descendencia.

Por otra parte, el estudio de los caracteres de baya y semilla, responden a necesidades netamente comerciales no solo en uva de mesa, sino también en uva para pasas (gran parte de las pasas son generadas a partir de especies apirenas). Incluso podría llegar a ser de interés en la producción de vino, pues el tamaño de baya grande permitiría la obtención de mayor cantidad de jugo y la ausencia de semilla podría generar un mosto más limpio.

El estudio de *SPY* y *PMEI* permitiría entonces, determinar si ciertamente estos genes candidatos son responsables de estos caracteres, y además, contribuiría a tratar de generar un conocimiento global del fenómeno, que derivaría en la generación de los fenotipos deseados, lo que permitiría no solo generar marcadores tempranos que permitan una selección anticipada de las vides que conduzcan a los caracteres de interés, sino también permitiría orientar la formación de estos fenotipos mediante la generación de tratamientos adecuados sobre las plantas.

Este trabajo corresponde a una primera etapa introductoria al conocimiento de ambos genes y de esta experiencia se pretende obtener el máximo de información útil para la generación de herramientas que ayuden al agricultor en el afán de generar cultivos de vides apirenas y de tamaño de baya grande.

1.4.3. Objetivo principal.

El objetivo principal de esta memoria es: *encontrar las relaciones existentes entre la expresión de los genes *PMEI* y *SPY*, y el desarrollo de la baya y la semilla en vid.*

1.4.4. Objetivos específicos.

El logro de dicho objetivo se llevará a cabo mediante el estudio de perfiles de expresión en individuos contrastantes en diferentes etapas de desarrollo, utilizando diversas herramientas de biología molecular, herramientas computacionales, entre otras técnicas. Dentro del proyecto además se han identificado tareas que definen los siguientes objetivos secundarios (específicos).

- Identificar los genes *SPY* y *PMEI* en *Vitis vinifera* y verificar la secuencia de los transcritos codificantes.
- Realizar un análisis computacional de búsqueda en base datos y uso de software, para obtener información sobre otros genes pertenecientes a posibles familias génicas relacionadas con los genes candidatos y discutir dicho análisis.
- Establecer relaciones entre los niveles de expresión de los genes *SPY* y *PMEI* en los fenotipos contrastantes tanto para el carácter de tamaño de baya como el de semilla.
- Buscar y presentar posibles vías metabólicas relacionadas con los productos de los genes de interés e inferir la posible participación de estos productos en el desarrollo de la baya.

2. METODOLOGÍA.

2.1. BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA Y DE BASE DE DATOS.

Se realizó una búsqueda y lectura de material bibliográfico adecuado (Papers, Resumen del proyecto, textos y presentaciones varias, Etc.) para adaptarse a las terminologías agronómicas, conocer la fisiología de la uva, reconocer genes y mecanismos génicos en vid, además del estudio de posibles vías metabólicas en que participan los genes candidatos y de los protocolos usados durante el trabajo. Se realizaron búsquedas de las secuencias de los genes candidatos *PMEI-2* y *SPY* y secuencias homologas y/o ortólogas de dichos genes en las bases de datos: Genoscope ^[62], DIM ^[63], NCBI ^[64] y VvGDB ^[65] entre otras. Se revisaron entre otros parámetros, la similitud de secuencias aminoácidas/nucleotídicas, se buscaron isoformas proteicas y nucleotídicas. Finalmente, se realizó un ordenamiento de datos que permitió en una primera etapa diseñar partidores para qPCR y en una segunda etapa, realizar el análisis y discusión de los resultados.

2.2. OBTENCIÓN DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN.

2.2.1. Material vegetal.

Se utilizaron muestras de uvas de siete estados de desarrollo (J, K, K tardía, M Temprana, M, M tardía y N), pertenecientes a los cuatro fenotipos contrastantes con respecto a tamaño de baya y presencia/ausencia de semilla, y de muestras provenientes de los dos parentales en los mismos estadios (anexos D y E); Todas este material biológico fue obtenido durante la temporada 2008-2009.

Las muestras obtenidas fueron almacenadas a -80 °C para su estudio de expresión génica. Las evaluaciones se realizaron en la Unidad de Postcosecha de Frutas y Hortalizas del INIA - Centro Regional de Investigación La Platina.

2.2.2. Extracción de RNA de muestras, cuantificación y verificación de la integridad.

Se extrajo el RNA total de las muestras usando un Kit de purificación de RNA total para plantas leñosas (Favorgen) utilizando 0,1 g de muestra vegetal y siguiendo el protocolo descrito para dicho Kit. La integridad de los RNAs obtenidos se verificó mediante electroforesis en geles denaturantes de agarosa al 1 %, en donde se buscó detectar las subunidades 15S y 25S del RNA ribosomal. Cada una de las muestras fue cuantificada por espectrofotometría midiendo su absorbancia a 260 nm. A partir de ello se estimó la cantidad de RNA obtenido al relacionar las OD₂₆₀ con la concentración de RNA, según la

relación $1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$ de mRNA. Cada muestra fue evaluada según su pureza evaluando que la razón de absorbancias de 260/280 nm, fuese mayor o igual a 1,8.

2.2.3. Purificación de mRNA a partir de RNA total.

Se procedió a la obtención del mRNA presente en cada muestra, mediante la purificación del mRNA usando la tecnología de los Dynabeads (Oligo (dT)₂₅, Invitrogen). Para ello se prepararon los buffers indicados en el protocolo del manual de uso. La cantidad total de μg de RNA que se poseía por muestra, permitió determinar la cantidad de Dynabeads a ocupar, usando la regla de que para 75 μg de RNA se deben ocupar 1 mg de Dynabeads oligoDT, lo que equivale a 200 μl de Dynabeads. Por otra parte, la cantidad en volumen de buffers a usar, estaba en directa relación con la concentración a la cual se encontraba la solución de RNA. Una vez que se poseían estos valores, se podía proceder a la purificación de mRNA, siguiendo los protocolos del manual de instrucciones (anexo I) y con la ayuda de un magneto adecuado (Dyna MPC, Invitrogen) que capta los Dynabeads.

Una vez utilizados los Dynabeads estos eran lavados mediante la aplicación de buffers y posteriormente regenerados para su reutilización (para un rendimiento máximo se recomienda no regenerar más de 4 veces los Dynabeads).

2.2.4. Síntesis de cDNA y verificación.

Para los experimentos posteriores, se debió preparar diluciones de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de RNA, las cuales se utilizaron para la síntesis de cDNA de hebra simple mediante una reacción de transcripción reversa (Anexo K), utilizando 200 U de enzima MMLV-RT (Promega) y 0,5 ng de oligo dT (15 nucleótidos) (Promega) como partidor de la reacción, por otra parte se realizó la adición de 0,1 ng de mRNA (a la reacción de síntesis) del gen *DAP* (GenBank, L38424), el cual se usó para efectos de normalización de datos de expresión en qPCR, para facilitar la búsqueda de genes de expresión constitutiva, y como control de la síntesis de cDNA ^[66].

El cDNA fue cuantificado por espectrofotometría midiendo su absorbancia a 260 nm y relacionando las OD_{260} con la concentración de cDNA (según la relación $1 \text{ OD}_{260} = 30 \text{ } \mu\text{g/ml}$ de cDNA). Una vez finalizado lo anterior, se verificó la síntesis de cDNA. Para esto, se llevó a cabo una reacción PCR con los partidores sentido y antisentido que amplifican un segmento del gen de actina (el cual es un gen de expresión constitutiva en *Vitis vinifera*) cuya amplificación se verificó realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

2.2.5. Diseño de partidores.

Para diseñar partidores, se buscó información de la secuencias de los genes de interés a partir de los datos obtenidos en la fase anterior de este trabajo, en la literatura y en bases de datos diversas (específicas de *Vitis vinifera* y generales). De las secuencias ortólogas y homólogas identificadas se escogieron las más representativas y cercanas a las anotaciones de *SPY* y *PMEI* en la propia *Vitis vinifera*. En base a esas secuencias, se diseñaron partidores utilizando el software “Primer premier 5.1” (Primer Biosoft Internacional), teniendo como requerimiento que el tamaño del partidador fuese de entre 20 a 24 pb (pares de bases) y el contenido de GC estuviese entre un rango de 37 a 65 %, con una Tm teórica que corresponde a 66 °C.

2.2.6. Amplificación por PCR a partir de cDNAs.

Se usaron 50 ng de cDNA como templado, junto con los partidores diseñados en una concentración de 10 pmol/μl, dNTPs (5 mM), MgCl₂ (25 mM), Buffer PCR (5 X Green Go Taq Flexi, Promega), Taq Polimerasa (Go Taq Flexi, Promega) más agua libre de nucleasas hasta completar 25 μl. Dependiendo de las secuencias a amplificar, las reacciones de PCR, siguieron en general el siguiente esquema: denaturación: 94 °C por 30 segundos, alineamiento: 62 °C por 30 segundos (para Actina a 56 °C, factor de elongación 1 alfa (*EF1α*) a 58 °C y *DAP* a 60 °C), extensión: 72 °C por 1 a 3 minutos, y en algunos casos una extensión final a 72 °C por 10 minutos. La reacción generalmente constó de 30 ciclos. Finalmente los productos de cada reacción fueron sometidos a un análisis electroforético para comprobar la efectividad del PCR.

2.2.7. Análisis de expresión diferencial de Genes.

Se utilizó el cDNA simple hebra sintetizado a partir de las muestras extraídas anteriormente citadas, para llevar a cabo reacciones de PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) en el equipo Light Cycler Instrument de Roche, bajo las siguientes condiciones generales: MgCl₂ (2,5 mM), LC-FastStart DNA Master SYBR Green I 10x (Roche), 0,5 μM de cada partidador, 2 ng de cDNA, en 20 μl de reacción. Los programas de amplificación fueron diseñados en el software Light Cycle Software v3.5 (Roche). Este programa incluyó una etapa de activación de 10 minutos a 95 °C seguido de la amplificación con un total de 45 ciclos con una denaturación de 2 segundos a 95 °C, una alineamiento de 10 segundos a 62 °C (60 °C en *DAP*, 58 °C en *EF1α* y, 56 °C en actina) y 20 segundos de elongación a 72 °C; Se continuó con un análisis de punto de *melting* de los amplicones, con una medición continua que va desde los 62 °C hasta los 98 °C.

Los productos de la amplificación fueron verificados en geles de agarosa al 1% para analizar la aparición de amplificaciones inespecíficas. Para cuantificar los transcritos amplificados se utilizó el programa Light Cycler Software v3.5. Se calculó el número de moléculas por picogramo de producto, a través de una interpolación en una curva de calibración generada a partir de diluciones seriadas (10x) de DNA de concentración conocida de cada clon. Posterior a ello, se estableció la abundancia de cada gen en las muestras estudiadas.

2.2.8. Búsqueda de un gen de expresión constitutiva para los ensayos de qPCR.

Para poder determinar los cambios en la abundancia de los genes candidatos en las condiciones experimentales analizadas, ésta debió ser normalizada respecto de un gen cuya abundancia no cambió entre condiciones. Para ello, se realizó una cuantificación de los transcritos de genes de expresión constitutiva (en este estudio se estudiaron para este efecto los genes de Actina y *EF1 α*), en las muestras correspondientes a cada estado, mediante ensayos de qPCR y se normalizó respecto de un estándar externo (el mRNA del gen *DAP* de *Bacillus subtilis*). Posteriormente se cuantificó la abundancia de los transcritos de los genes mediante la interpolación en curvas de calibración construidas a partir de diluciones seriadas de DNA templado de concentración conocida.

2.2.9. Análisis estadístico.

Los resultados de la expresión de los transcritos de ambos genes y los niveles de actividad enzimática se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa Stat Graphics 5.1 y se determinó si existían diferencias significativas, usando la prueba de comparación múltiple de LSD (*Least significant difference test*) con un $p_{\text{value}} \leq 0,05$.

2.3. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES.

2.3.1. Obtención de los transcritos de largo completo mediante RACE PCR.

Es deseable conocer la secuencia completa de los genes, para ello se utilizó el kit de GeneRacer (Invitrogen) sobre el mRNA de diversas mezclas de las muestras de cada variedad en sus diferentes etapas de desarrollo. Dicho kit reemplaza la cola poli A y la cabeza “Cap” del mRNA por adaptadores, que permiten a través del seguimiento de un protocolo, obtener secuencias de cDNA completas y secuenciables.

2.3.2. Clonamiento, obtención y estudios de secuencias.

Los productos de PCR obtenidos anteriormente fueron purificados y clonados en vectores del tipo pGEM-T Easy (Promega), siguiendo protocolos del fabricante. Los clones seleccionados positivamente fueron secuenciados mediante un sistema automatizado (Macrogen-Korea) y las secuencias fueron analizadas usando herramientas bioinformáticas (BLAST, Herramientas de alineamientos propias de las bases de datos, Multiple Alignment ^[64], etc.). Por último, se realizó un alineamiento de secuencias y análisis de similitud (ClustalW y MEGA 4.1), desde el cual se realizó una búsqueda de dominios proteicos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA Y DE BASE DE DATOS.

3.1.1. Búsqueda de Secuencias de genes candidatos.

Inicialmente y a partir de los datos encontrados en la búsqueda genómica, se obtuvo que los genes candidatos encontrados por QTL corresponden al gen *SPY* (Id genoscope GSVIVT00021566001) y a la isoforma 2 del gen *PMEI* (Id genoscope GSVIVT00007282001). A partir de estos dos códigos de identificación (Id) se inició la búsqueda de las secuencias de los 2 genes candidatos en estudio en la base de datos genoscope ^[62]. De esta base de datos se extrajeron las anotaciones entregadas por la herramienta interna de la web denominada GAZE ^[67], de allí se obtuvo la secuencia exónica y el cDNA virtual (ver archivo pdf en CD adjunto). De estas anotaciones, se pudo determinar que la secuencia exónica en *SPY* presenta un largo de 2.763 pb y un total de 18 exones, en un espacio que ocupa más de 18 kb dentro del cromosoma 8 de *Vitis vinifera*. Por otra parte *PMEI-2* presenta un largo de secuencia exónica de 729 pb, con solo 2 exones, en un espacio que ocupa más de 6 kb dentro del cromosoma 2.

Dentro de la búsqueda anterior, se pudo obtener la secuencia nucleotídica en formato FASTA (Ver anexo L) de ambos genes. Sobre dicha secuencia se realizó una búsqueda de datos en la misma página web encontrándose, que se reportaban dos isoformas adicionales de *PMEI* presentes en el genoma de *Vitis*, que corresponden a *PMEI* en sus isoformas 1 (Id genoscope GSVIVT00007281001) y 4 (Id genoscope GSVIVT00007280001).

Dada la presencia de estas dos isoformas, se inició una búsqueda bibliográfica para encontrar otras isoformas de *PMEI*. De esta manera, se encontró de que en algunos estudios proteómicos en papa (*Solanum tuberosum*) se han reportado más de 10 isoformas de *PMEI* ^[68]; además, en otras publicaciones se menciona que ciertos fragmentos de secuencias son altamente conservados en diversas especies, ello se obtuvo a partir de un estudio realizado en *Arabidopsis thaliana* ^[69]. Estos fragmentos podrían resultar de utilidad en la búsqueda de nuevas isoformas de *PMEI*.

Por otra parte, se procedió a realizar una búsqueda BLAST en sitio Genoscope ^[62], a partir de las secuencias exónicas y con el cDNA virtual obtenidos en las etapas anteriores, con el propósito de obtener más datos sobre ambos genes de interés y encontrar más isoformas de dichos genes candidatos. Esta búsqueda fue complementada por un análisis el programa BLAST en el sitio NCBI ^[64], a partir de ello se realizó una exploración de las secuencias presentes en *Vitis vinifera*, encontrándose en los resultados altos porcentajes de identidad y de coincidencias «positivas». Sin embargo, al analizar los largos de la

secuencias en estos casos, se logró separar estos datos en dos grupos, en los cuales, por un lado habían secuencias de tamaño muy similar -y con alta similitud- a las secuencias iniciales de la búsqueda, ello es justificable básicamente al considerar que se está analizando al mismo gen, pero con mutaciones puntuales, que pueden ser inherentes de cada variedad de vid. Por otra parte, se detectaron secuencias coincidentes con gran similitud de estas, en fragmentos muy cortos de no más de 30 pb (presumiblemente fragmentos conservados de las secuencias internas del gen) que no generaban cDNA, con lo cual se podría sospechar que corresponden artefactos recombinatorios evolutivos, por lo que fueron rápidamente descartados en su utilización en las etapas siguientes.

Posteriormente, se repitió los pasos anteriormente descritos usando la base de datos del Centro de Modelamiento Matemático del Departamento de Ingeniería Matemática de la Universidad de Chile (DIM)^[63] y en la *Vitis vinifera* Genome Data Base (VvGDB)^[65] en la cual se encontró otras secuencias de tamaño prácticamente idéntico al del cDNA virtual y que presentan una muy alta similitud de secuencias y una gran cantidad de fragmentos pequeños de pocos pares de bases, que se pueden justificar por lo planteado en el párrafo anterior. Además, estas búsquedas (en ambas bases de datos) permitieron confirmar la presencia de los genes *PMEI* en el cromosoma 2 y *SPY* en el cromosoma 8 de *Vitis vinifera*.

Una duda natural, que se generó al analizar el gen *PMEI* es que si presenta isoformas 1, 2 y 4, puede que exista una isoforma 3. Ello debido a que dicha numeración no representa ninguna formulación exclusiva o secuencia proteica en particular y tan solo constituye una nomenclatura distintiva dentro de las isoformas de una misma especie^[68]. Para responder esta inquietud, se realizó una búsqueda de secuencias de este gen en otras especies vegetales, en la cual se encontró un mayor número de datos disponibles en las especies de *Arabidopsis thaliana*, *Ricini communis* (Ricino), *Actinidia chinensis* (Kiwi) y *Triticum aestivum* (trigo).

Posteriormente, haciendo una búsqueda de dichas secuencias en el genoma de *Vitis vinifera*, se logró encontrar una posible isoforma de *PMEI* en *Arabidopsis thaliana* (en algunas publicaciones se presenta a esta secuencia como la isoforma 14 de *PMEI* en la especie)^[70], que según el BLAST realizado en el sitio NCBI, mostraba que esta secuencia existía en el genoma de *Vitis*, con un alto grado de homología en el cromosoma 19, que correspondía a una posible secuencia codificante de *PMEI* (proteína putativa con posible función de pectin metilesterasa) A dicha secuencia se le otorgó arbitrariamente la denominación de isoforma 3 de *PMEI* (*PMEI-3*).

Así, se realizó una serie de búsquedas con el objetivo de obtener nuevas isoformas, no solo de *PMEI*, sino también de secuencias que pudiesen transcribir *SPY*. Cada vez que se encontraba una nueva secuencia candidata a ser isoforma, ya sea por búsqueda bibliográfica o por el análisis anterior en bases de datos, ésta era analizada a través de una serie de pasos los que se iniciaban con la búsqueda de la

secuencia en el genoma de *Vitis* (genoscope), lo que conllevaba la posterior obtención de cDNA virtuales. A partir de las secuencias de cDNA encontradas se hacía un BLAST (en NCBI, DIM y vvGDB) en el cual se pretendía comprobar que la secuencia candidata correspondiera a la superfamilia génica de Pectin metilesterasas o Spindly, dependiendo el caso. Posterior a ello, se buscaban las secuencias (entre las que presentaban mayor grado de homología) más representativas para cada candidato en *Vitis vinifera*. De los resultados con menor homología se realizaban nuevas exploraciones con el propósito de encontrar posibles isoformas, los cuales entraban nuevamente al ciclo de comprobación. Como resultado de estos mismos procedimientos se detectó dos nuevas isoformas de secuencia nucleotídica de *SPY*, a las que se denominó para distinguirlas *SPY-B* y *SPY-C* de manera arbitraria. De igual forma se denominó *SPY-A* al gen candidato con el cual se inició la búsqueda.

Una de las dificultades que se encontró en dicha búsqueda radicó en el hecho que se detectaron anotaciones equívocas en donde, por ejemplo, en ciertas bases de datos se indicaban que las secuencias correspondían a *PMEI* siendo que codificaban para *PME*. Se descubrió posteriormente que dicha confusión podría generarse ya que las secuencias de ambos genes se encuentran por lo general relativamente juntas formando una suerte de «operón». Ello correspondería a la regulación propia de *PMEI*, y de *PME*, en dónde esta última debe de producirse inhibida y solo perdería esta inhibición en el momento en que se necesite su accionar dentro de la célula ^{[20][68]}.

Otra confusión en las anotaciones se producía en relación a su funcionalidad, en ellas *PMEI* era descrita por ciertos autores como un potencial inhibidor de invertasas. Ello se podría deber, ya que la gran mayoría de los estudios de *PMEI* son realizados a nivel proteómico, y a que las invertasas (proteínas que catalizan la hidrólisis de componentes tipo azúcares de membrana, como fructosa, glucosa y pentosas) son proteínas de alta similitud a nivel de secuencia aminoacídica con *PME*; más aún, su modo de accionar sería además, muy similar al de *PME* y poseería una estructura terciaria con alto grado de similitud ^[71].

Otro punto que hay que tener en cuenta en el estudio de *PMEI*, se relaciona con la nomenclatura de las isoformas de *PME*, pues algunos autores se refieren a su numeración con números romanos haciendo que la isoforma 1 de *PME* se denote «*PMEI*» idéntico a como se abrevia al inhibidor de *PME* (*PMEI*). Ello conlleva a encontrar secuencias erróneas que deben ser correctamente filtradas para no recaer en errores que condujesen al estudio del gen equivocado.

En el caso de Spindly no se presentaron mayores complicaciones en su búsqueda y estudio, salvo que en algunos casos, *SPY* era considerada como una glucosamiltransferasa ^[72] que corresponde al UDP-N-acetilglucosamina--N péptido- acetilglucosaminiltransferasa.

Posteriormente a las 4 isoformas de *PMEI* (1, 2, 3 y 4) y las 3 de *SPY* (*A*, *B* y *C*), se les realizó un estudio de similitud de secuencias nucleotídicas (usando la herramienta BLAST del sitio NCBI), encontrándose que *PMEI* 3 era la que mas difería del resto, presentado tan solo una similitud de secuencias que no superaba el 7 % con las otras isoformas. El resumen de los resultados de similitud entre secuencias nucleotídicas de *PMEI* y *SPY*, se muestra en las tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1: Similitud de secuencias nucleotídicas entre la secuencias que transcriben el gen inhibidor de pectín metilesterasas.

	<i>PMEI-2</i>	<i>PMEI-3</i>	<i>PMEI-4</i>
<i>PMEI-1</i>	17 %	< 5 %	54 %
<i>PMEI-2</i>	-	7 %	19 %
<i>PMEI-3</i>	-	-	< 5 %

Tabla 2: Similitud de secuencias nucleotídicas entre la secuencias que transcriben el gen Spindly.

	<i>SPY-B</i>	<i>SPY-C</i>
<i>SPY-A</i>	43 %	19 %
<i>SPY-B</i>	-	52 %

Por otra parte, si se realiza un estudio sobre el nivel de similitud presente entre las secuencias aminoacídicas que codifican para las proteínas correspondientes a cada gen, se observa que los grados de similitud se incrementan considerablemente. En el caso de *PMEI* se detecta que el promedio de similitud de secuencias sobre las isoformas es cercana al 60 % (ver Tabla 3). Esta diferencia se detecta en gran parte sobre los sitios activos (sitios de unión a *PME*) lo que sugeriría que cada isoforma posee una región propia y característica de interacción con una isoforma particular de *PME*, lo cual sustenta la hipótesis de que por un lado cada isoforma de *PMEI* inhibe solo una forma de *PME*, de manera 100 % complementaria, existen reportes de que entre otras isoformas también producen inhibición, pero esta es más débil y por ende menos estable que la unión entre proteínas de secuencias contiguas en el genoma ^[73].

Tabla 3: Similitud de secuencias aminoacídicas de la isoformas de la proteína *PMEI*.

	<i>PMEI-2</i>	<i>PMEI-3</i>	<i>PMEI-4</i>
<i>PMEI-1</i>	58 %	23 %	67 %
<i>PMEI-2</i>	-	27 %	57 %
<i>PMEI-3</i>	-	-	26 %

Al revisar la similitud presente entre los transcritos que generan las 3 formas de *SPY*, lo primero que se observa es que las isoformas B y C presentan un 100 % de similitud a nivel de secuencia aminoacídica. Así, dos secuencias que difieren en casi un 50 % en su secuencia nucleotídica, generan una misma proteína. Similar es el análisis al comparar estas secuencias con la secuencia aminoacídica de *SPY* en su forma A, en el cual se detecta un alto grado de similitud; siendo el 7 % de diferencia, principalmente asignable a aminoácidos que no participan en la conformación estructural de la proteína. El detalle del resumen de las similitudes se adjunta en la tabla 4.

Tabla 4: Similitud de secuencias aminoacídicas de la isoformas de la proteína *SPY*

	<i>SPY-A</i>	<i>SPY-B</i>	<i>SPY-C</i>
<i>SPY-A</i>	-	93 %	93 %
<i>SPY-B</i>	93 %	-	100 %

Por otra parte, al analizar la posición de las isoformas génicas dentro de los respectivos cromosomas (Tabla 5), se ve que las 3 formas génicas de *SPY* se encuentran en regiones genómicas colindantes entre sí, en las cuales cada una de estas secuencias se encuentran dentro de un mismo registro de identidad en la base de datos de Genoscope^[62] (ID Genoscope GSVIVT00021566001), lo cual da una primera sugerencia de que el mapeo por QTL realizado anteriormente presenta una baja resolución^[59], lo que se discutirá más adelante. En el caso de *PMEI*, se puede observar que las isoformas 1 y 4 se encuentran cercanas con respecto a la isoforma 2 (que es el gen candidato en cuestión). Por último, es interesante mencionar que la isoforma 3 de *PMEI* es la única forma que no está presente en las cercanías relativas del gen candidato, estando presente en el cromosoma 19.

Tabla 5: Resumen de ubicación y largos de las formas génicas de *PMEI* y *SPY*

Gen	Cromosoma	Posición en cromosoma	Largo de secuencia EST
<i>SPY-a</i> *	8	15,901,999 a 15,913,707	870 pb
<i>SPY-b</i>	8	14,031,405 a 14,033,430	895 pb
<i>SPY-c</i>	8	15,900,258 a 15,901,914	873 pb
<i>PMEI-1</i> *	2	4,861,219 a 4,868,698	908 pb
<i>PMEI-2</i> *	2	4,644,498 a 4,646,027	841 pb
<i>PMEI-3</i>	19	7,377,174 a 7,377,906	732 pb
<i>PMEI-4</i> *	2	4,857,189 a 4,858,045	749 pb

EST =*expressed sequence tag*, son secuencias obtenidas a partir del secuenciamiento de mRNA generalmente sobre el producto de una síntesis de cDNA

* Genes reportados en la base de datos de Genoscope.

De manera gráfica tenemos:

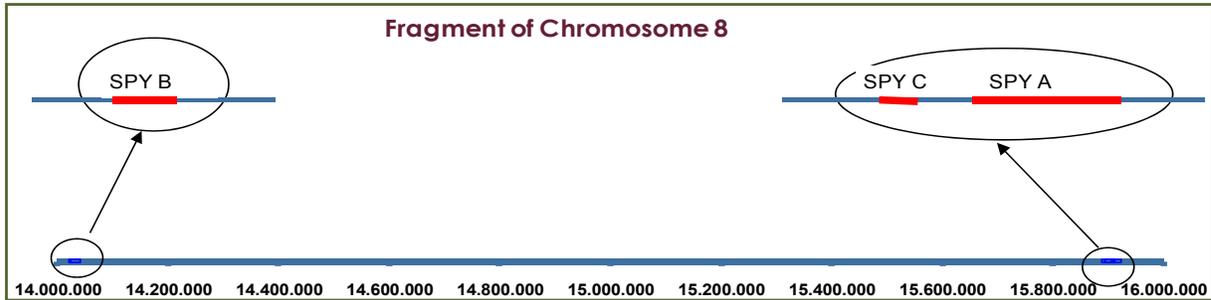


Figura 1: Posición de los genes que codifican *SPY* en sus formas A, B y C dentro del cromosoma 8 de *Vitis vinifera*: los números muestran la posición con respecto al extremo inicial del cromosoma; las líneas rojas indican la secuencia genómica (exones mas intrones) de los genes en cuestión.

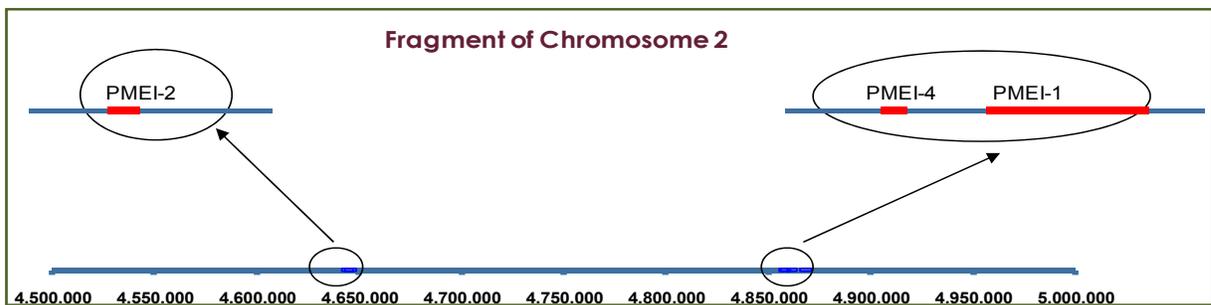


Figura 2: Posición de los genes que codifican *PMEI* en sus formas 1, 2 y 4 dentro del cromosoma 2 de *Vitis vinifera*: los números muestran la posición con respecto al extremo inicial del cromosoma; las líneas rojas indican la secuencia genómica (exones mas intrones) de los genes en cuestión.

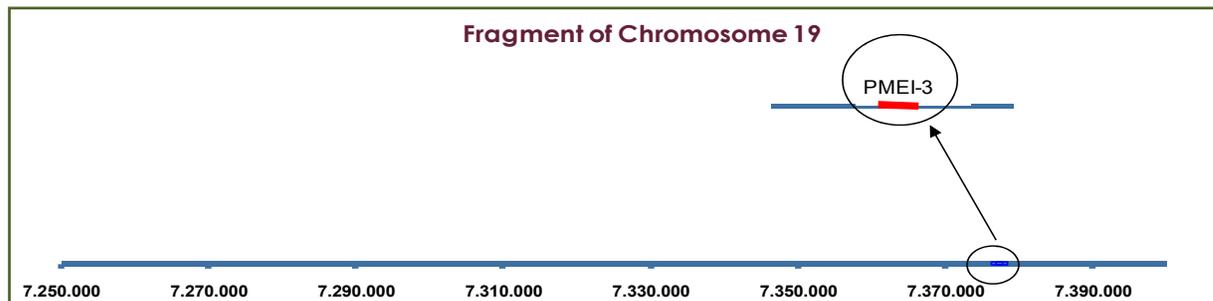


Figura 3: Posición del gen que codifican *PMEI-3* dentro del cromosoma 19 de *Vitis vinifera*: los números muestran la posición con respecto al extremo inicial del cromosoma, las líneas rojas indican la secuencia genómica (exones mas intrones) de los genes en cuestión.

Un punto importante a destacar, es que el único gen que no registra presencia de intrones dentro de su secuencia genómica es *PMEI-3*. Ello podría justificarse por efectos de recombinación que han favorecido la eliminación intrónica o que no han permitido la inclusión de intrones. El resto de las

secuencias presentan intrones y exones, por ende el tamaño de los mRNA es menor que el DNA genómico correspondiente.

3.1.2. Construcción de arboles filogenéticos.

Otra manera de comparar las secuencias aminoacídicas de las proteínas en estudio, es mediante la elaboración de arboles filogenéticos; en los que no solo se comparan homologías sino que se realiza un alineamiento de secuencias, mediante el uso de diferentes convenciones que se expresan en formas de coordenadas, las que representan las diferencias y/o similitudes existentes entre dos o más proteínas ^[74].

En la Figura 4, se presenta el árbol filogenético radial correspondiente a las isoformas de PME1, generado bajo el software Mega 4.1, desde donde se observa que las isoformas más cercanas corresponden a las formas 4 y 1, tal como lo indica el estudio de similitudes. De estas dos proteínas, la isoforma 1 es la más cercana a la isoforma 2. Por último, la isoforma 3, es el más lejano de los genes con relación a las otras formas de PME1. Esta distancia de PME1-3 va a ser nuevamente mencionada más adelante en este capítulo y será un factor de interés en relación a otros resultados obtenidos.

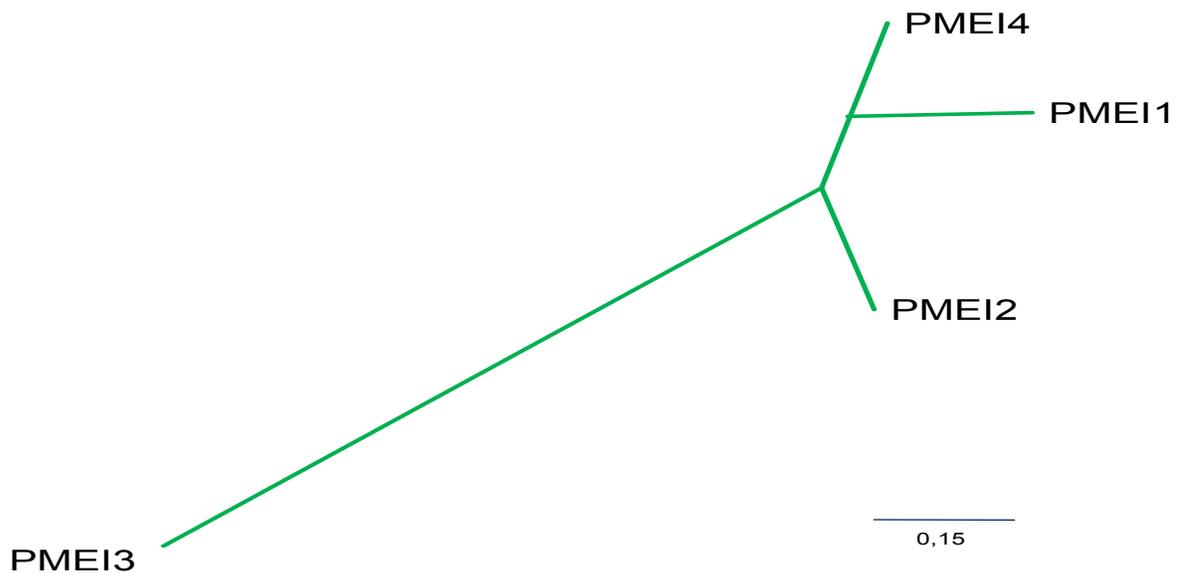


Figura 4: Árbol filogenético radial de las isoformas de *PME1* detectadas en *Vitis vinifera*

En el análisis de SPY, vemos que el árbol filogenético asociado a este gen presenta un área menor al del árbol visto para PME1, básicamente por la similitud que tienen las formas de SPY entre sí. Al analizar más al fondo el árbol, se observa que SPY-B y SPY-C están literalmente juntas en una misma recta vertical, por ende son prácticamente la misma proteína. Por otra parte, *SPY-A* se encuentra más distante filogenéticamente a las otras dos formas proteicas (Ver figura 5).

Otro aspecto que se puede destacar al comparar el análisis de similitud de secuencias con la ubicación cromosómica de estas; es que si bien las formas A y C son las más cercanas entre sí, ambas están localizadas en una región distante del genoma con respecto a la forma B; sin embargo, en cuanto a la similitud de secuencias, las formas B y C son más cercanas entre sí, que ellas con respecto a la forma A.

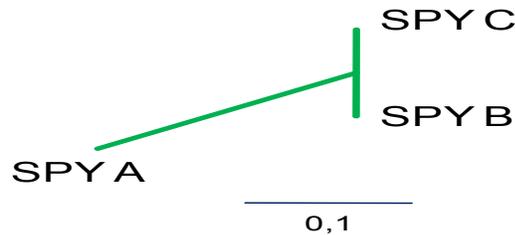


Figura 5: Árbol filogenético radial de las proteínas *SPY* detectadas en *Vitis vinifera*

Para conocer un poco más sobre estos genes, se construyeron árboles filogenéticos para cada uno de los genes los cuales fueron diseñados con el programa Mega 4.1.

Del análisis del árbol filogenético de PME1 (figura 6) se observa que las isoformas 1 y 4 de PME1 presentan la menor distancia entre sí. Por otra parte, PME1-4 tiene una forma que se asemeja más a las formas de PME1 presentes en la familia Solanaceae entre las cuales se encuentran presentes *Nicotiana tabacum* (Tabaco) y *Nicotiana benthamiana*, y también a la proteína PME1 presente en *Capsicum annuum* (Pimentón). Todas estas especies, solo coinciden a nivel de clase con *Vitis vinifera*. En cambio PME1-1 presenta cercanía con especies más leñosas como *Populus trichocarpa* (Álamo) o arbustos como *Ricinus communis* (ricino, también denominado como higuera del diablo) [75].

La isoforma 2, también posee cercanía de secuencias con otras isoformas de PME1 en álamo y ricino, y un poco más lejano presenta relación con un tipo de papa *Solanum phureja* y con un tipo de leguminosa (*Medicago truncatula*). La diversidad de familias presentes en el árbol filogénico y su orden muestran que no existe una conservación de isoformas relacionado con alguna familia u orden. Otro aspecto destacable es el hecho que dentro de las anotaciones no se encontraron otros miembros de la familia *Vitaceae* con los cuales realizar comparaciones de similitud.

En el caso de PME1-3 nuevamente se muestra que es la isoforma más lejana de las secuencias encontradas, presentando cierta cercanía con una forma de PME1 en *Arabidopsis thaliana*, pero siendo nuevamente más cercana a una forma de PME1 en ricino. Pasa a ser un tópico interesante la cercanía de cada una de las isoforma de *Vitis* con las de ricino, en la cual la única coincidencia de estas especies es el nivel de clase, ya que ambas plantas pertenecen a la clase Magnoliopsida [75].

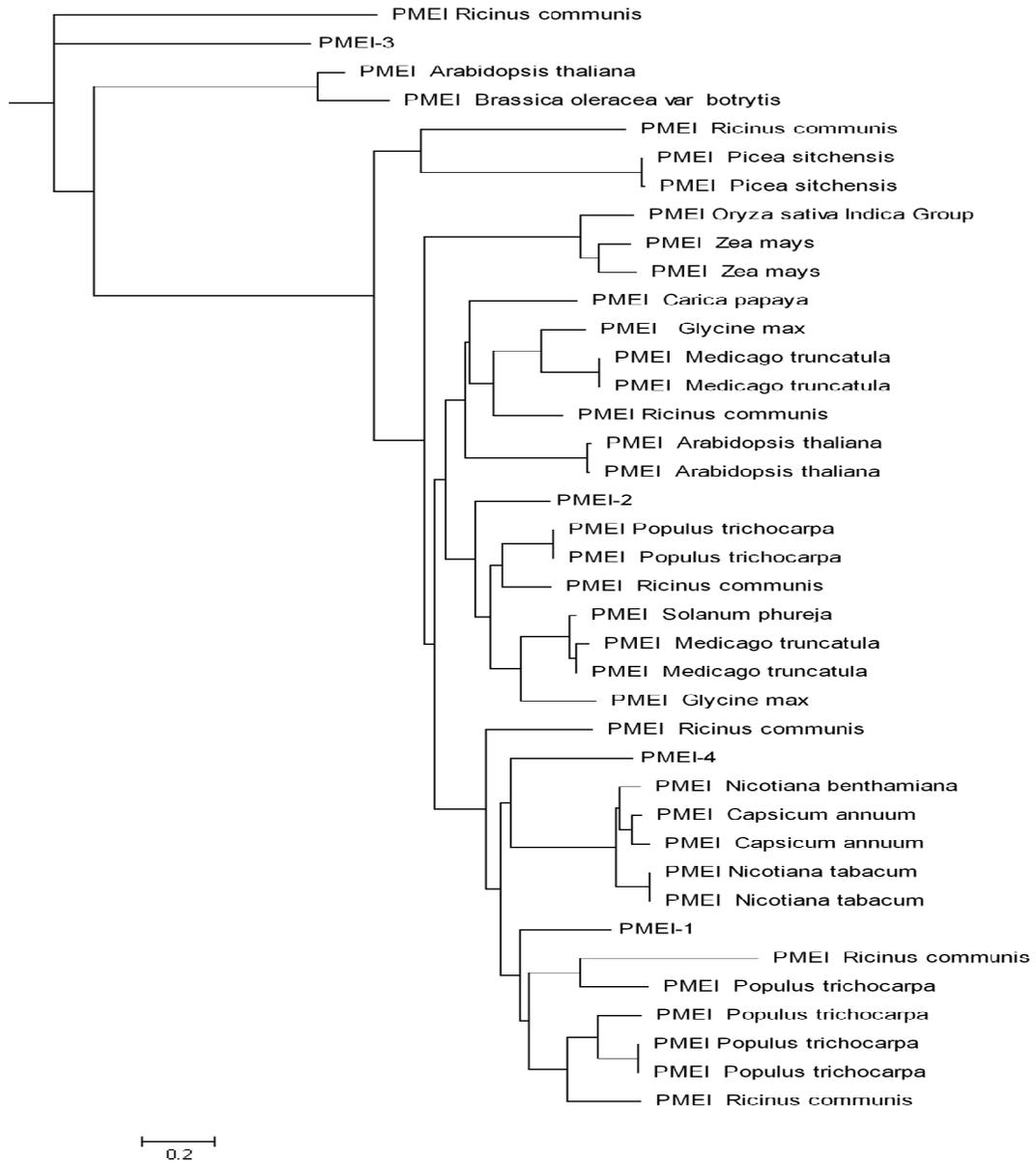


Figura 6: Árbol filogenético para las formas de *PMEI*

En el caso de SPY (figura 7), se detectan dos agrupaciones principales, una en la cual se incluyen las 3 secuencias que codifican a SPY en *Vitis*, las cuales presentan cercanía con la proteína SPY presente en *Rosa luciae* (una flor pariente de la rosa) y en *Sinningia speciosa* (Sinigia o Gloxinia) ambas de la clase Magnoliopsida; En esta misma rama pero más alejado, se encuentra el arroz (*Oryza sativa*) el maíz (*Zea mays*) y otras plantas de la división Magnoliophyta^[75].

La otra agrupación de secuencias familiares a SPY corresponde a bacterias de suelos profundos tales como *Gallionella ferruginea*, *Ostreococcus lucimarinus* y *tauris* entre otros; aunque esta rama puede

deberse a una confusión funcional propia de las secuencias en estas proteínas. Pues, si se realiza un análisis más a fondo, se encuentra que estas secuencias también registran anotaciones como Tetratriopeptido o superfamilia *TPR*, y estarían superponiéndose en secuencia con la superfamilia génica *SPY*.

Pese a ello existe una alta conservación de secuencias que se detecta en la corta longitud de las ramas, en unidades filogenéticas, distancia que converge más aun al analizar solamente las especies que pertenecen al reino *plantae*, lo que entrega una idea de la alta conservación que se reporta acerca de las secuencias de *SPY* en las plantas.

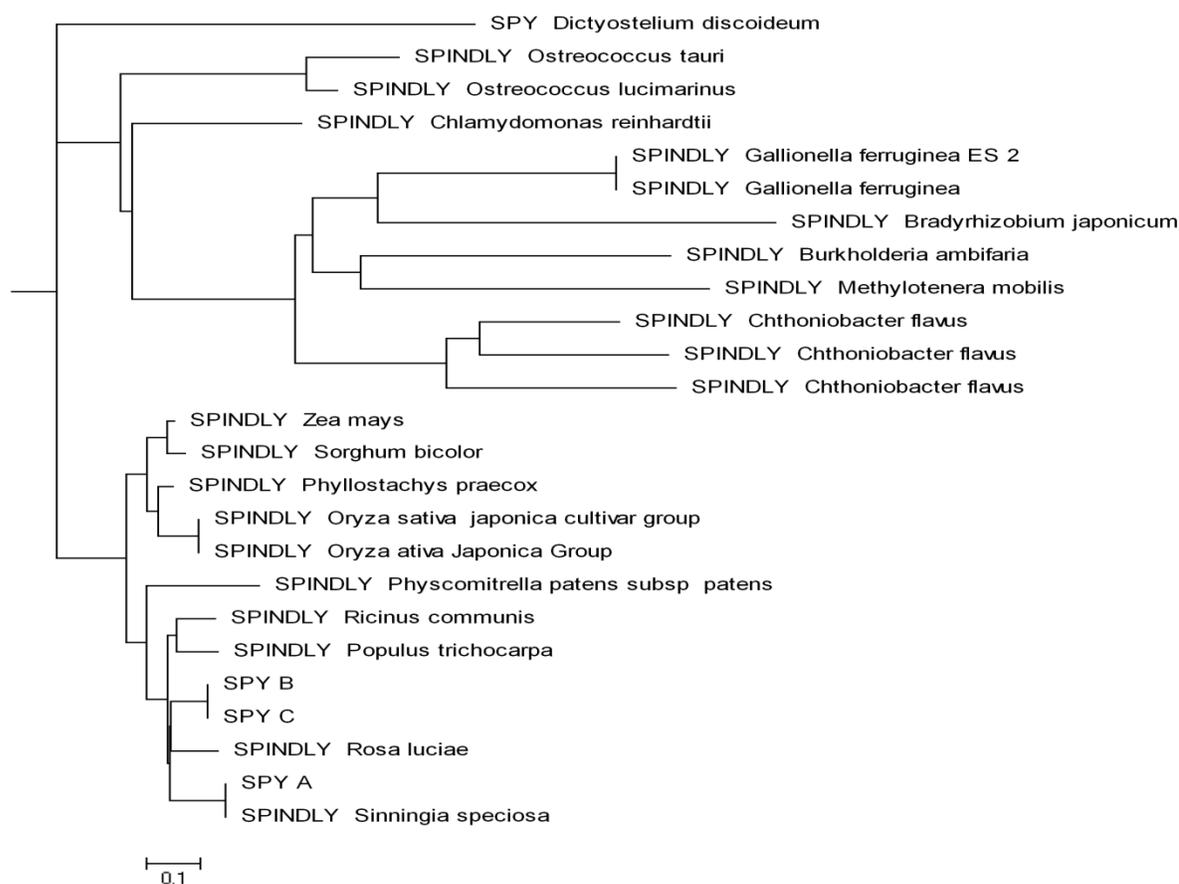


Figura 7: Árbol filogenético para las formas de *SPY*

3.1.3. *PMEI* y *SPY*: posibles vías metabólicas involucradas.

A partir de la búsqueda en base de datos y en bibliografía (enunciada en la metodología) se puede determinar en cuales vías metabólicas podrían participar cada una de las proteínas estudiadas, de estas observaciones se desprende que el accionar de *PMEI* estaría inserto en las vías en las que actúa *PME*, participando en la regulación del sistema encargado de la degradación de pectinas de membrana, ya que

PME (que es la proteína inhibida por PMEI) se encargaría de la desmetilesterificación de las pectinas de pared celular ^[76].

El debilitamiento de la pared, causado por la desmetilesterificación, permite una posterior acción de enzimas de desesterificación (como por ejemplo la polimetilgalacturonato esterasa (PMGE)) que terminan de desbloquear sitios claves sobre los que actúan las enzimas despolimerizantes. Estas se encargan de degradar las pectinas presentes en la pared celular, reduciéndolas a unidades más sencillas como son por ejemplo el ácido péctico ^[77].

Dentro de esta vía, se puede mencionar que entre las enzimas del tipo despolimerizantes destacan dos grupos: por un lado algunas hidrolasas, entre las cuales se cuentan las poligalacturonasas (PG), que a su vez se dividen en dos grupos según su modo de acción: las endogalacturonasas que son las enzimas que realizan degradación en posiciones azarasas en la cadena de pectinas, y las exogalacturonasas que realizan su degradación sólo en los extremos terminales de la cadena ^[75]. Dentro del grupo hidrolasas destacan también las polimetilgalacturonasas (PMG), también denominadas pectino-hidrolasas, que también se presentan en formas endo y exo ^[78].

Por último, el otro grupo de enzimas despolimerizantes que es destacable mencionar, son las denominadas liasas entre las cuales se distinguen las pectato liasas y pectina liasas, y en las que destaca los poligalacturonatos liasa (PGL) y los polimetilgalacturonatos liasa (PMGL) ^[68].

Por otra parte, ciertos autores ^{[71][80][90]} enuncian otra vía en la cual podría actuar PMEI, La que relaciona a este gen con la concentración de protones (H^+), bajo la hipótesis de que el mayor grado de activación que alcanzaría la PME sería bajo condiciones de pH neutros; sin embargo tal como se mencionó en el capítulo de Introducción, el accionar de PME provocaría la alcalinización del medio; este cambio de pH por un lado, inhibiría a las PME y posiblemente activaría las PMEI. Esta condición de pH permitiría además, que tanto las glicosilasas y glicosiltransferasas (enzimas relacionadas con la elongación celular) actúen en su pH óptimo, lo que implicaría una mayor actividad de estas enzimas. Por otra parte, el accionar de estas proteínas liberaría protones los que tenderían a neutralizar el pH, con lo cual se volvería a activar las PME y se originaría así un ciclo regulatorio dominado por las variaciones de pH ^[80].

En forma adicional, habría que indicar que PMEI es una proteína que estaría siendo regulada por la actividad de poligalacturonasas y pectato liasas. Ambas proteínas participarían de una regulación no competitiva interponiéndose con la conformación del complejo reversible que se forma tras la unión de PME y PMEI en proporción de 1:1 ^[81], mediante esta interacción, PMEI bloquearía sitios claves del accionar de PME, en particular, actuaría sobre el sitio activo responsable de la metilesterificación en una suerte de impedimento estérico ^[68].

Pese a que anteriormente se mencionó la especificidad de cada isoforma de PME y PMEI, existen antecedentes que apuntan hacia una conservación de las estructuras de PMEI dentro del reino *Plantae* en general. En los cuales por ejemplo, se reportan datos de ciertas proteínas de PMEI extraídas de Kiwi (*Actinidia chinensis*) que presentan actividad sobre PME de otras especies vegetales conservando la función propia del gen, aunque presentando una menor efectividad en el accionar proteico [73].

Con respecto a la regulación de la expresión de *PMEI*, existen muy pocos antecedentes; rescatándose tan solo la presencia de una posible caja MADS (de regulación por interacción con el DNA) y la caja de consenso AtTATA (CCCATAT) rio abajo a la secuencia génica de *PMEI* [82], existiendo entre dichas posiciones la presencia de la isoforma de *PME* respectiva. Lo que corroboraría la hipótesis de que tanto PMEI como PME son proteínas que se activan en conjunto en el aparato de Golgi. Si PME surgiese sin la inhibición provocada por PMEI, esta induciría un daño serio en las paredes del Golgi, lo que conllevaría a un rompimiento de la membrana de dicho organelo con consecuencias a nivel celular [68].

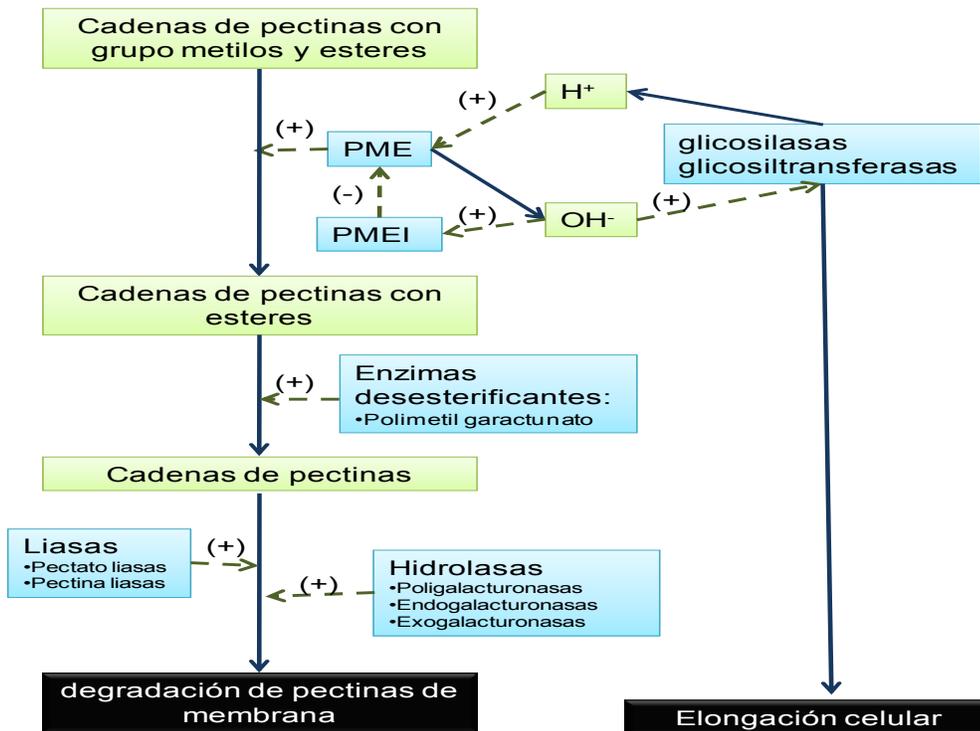


Figura 8: Posibles vías de participación de *PMEI* en los procesos de degradación de pectinas y elongación celular. Las flechas continuas muestran las etapas de las vías, las flechas discontinuas indican el accionar de los reguladores, el signo junto a estas flechas indica la regulación, (+) es positiva, (-) es negativa, los cuadros verdes muestran productos/sustratos, los cuadros azules reguladores y los cuadros negros muestran el proceso sobre el cual derivan las vías presentadas.

En el caso de *SPY*, esta proteína participaría en el proceso de regulación de la respuesta a giberelina. Por ello, se va a presentar una revisión de las vías metabólicas que se relacionan directamente

con el accionar de las giberelinas y en particular, al mecanismo de respuesta frente a GA₃. Aun no existen registros que reporten de la identificación de algún receptor que capte las GA, aunque existen indicios de que estos receptores se encuentran en la membrana plasmática celular, en particular dentro de una capa proteica denominada aleurona, que es una reserva de nutrientes para la semilla durante su desarrollo [83]. Una vez que dichos receptores reciben las giberelinas, ocurriría una cascada de transducción de señales, en la que supuestamente participaría la denominada proteína G, sobre la cual ocurre un posterior proceso de activación por GTP, desde donde posiblemente se replicaría un segundo mensajero aún no identificado. En este punto, la señal puede seguir dos rutas: la primera, relacionada con el accionar de las alfa-amilasas de la capa aleurona la cual presenta la participación de ion calcio (vía dependiente de Calcio) [84]. Y la segunda ruta, que es la que estaría relacionada directamente con el gen *SPY*, es la denominada vía independiente de calcio. Esta vía también concluye con la formación de α-amilasas, previo a una serie de etapas en la que actúan factores de transcripción sobre las vías de regulación. Previo a esta etapa se realiza la síntesis de las proteínas Leafy (LFY) las que están relacionadas con el desarrollo de baya (donde destaca la regulación generada por los Mieloblastosistos de Giberelinas GA-MYB) [53].

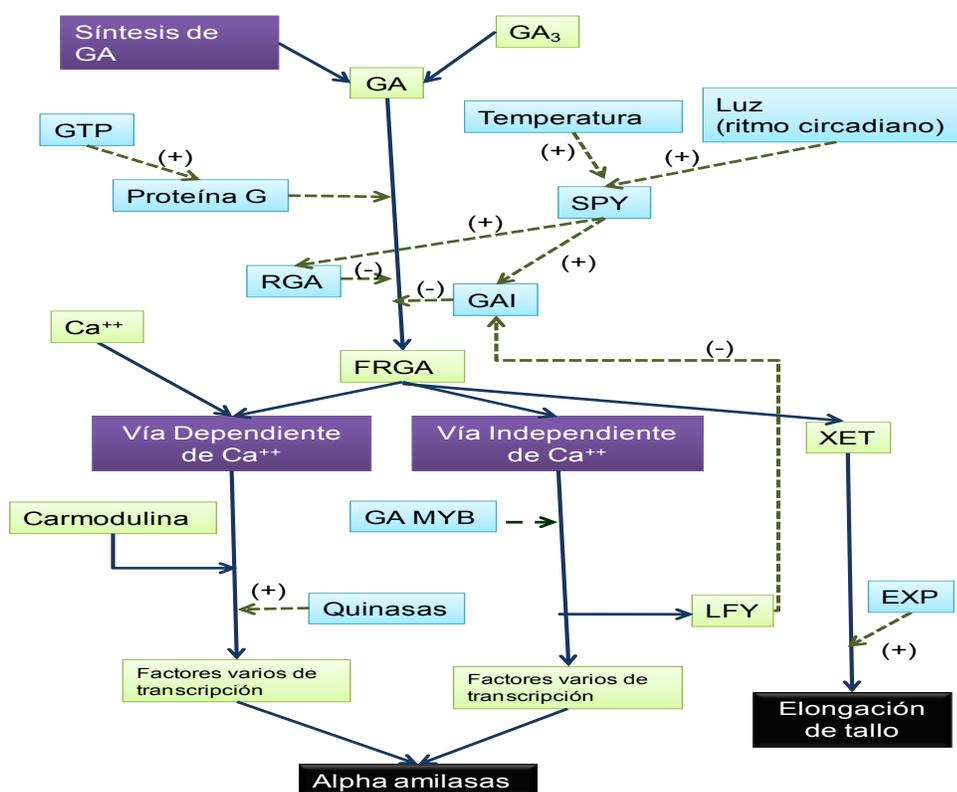


Figura 9: Posibles vías de participación de *SPY* sobre las vías de las giberelinas. Las flechas continuas muestran las etapas de las vías, las flechas discontinuas indican el accionar de los reguladores, el signo junto a estas flechas indica la regulación, (+) es positiva, (-) es negativa, los cuadros verdes muestran productos/sustratos, los cuadros azules reguladores, los cuadros morados indican vías involucradas y los cuadros negros muestran el proceso sobre el cual derivan las vías presentadas.

En el caso particular de *SPY*, este gen interactúa con algunos mensajeros secundarios, activando una cascada regulatoria, en el cual se activan tanto represores como insensibilizadores de la respuesta a giberelina; el origen de los mensajeros antes mencionados es en parte desconocido. Por otra parte, en algunos trabajos en *Arabidopsis thaliana*, se ha encontrado una relación entre el largo de los periodos de foto-exposición y de los cambios de temperatura durante el día con el accionar de ésta proteína (*SPY*)^[85]. Ello se ha realizado observando la respuesta a GA y la síntesis de ésta, así se sugiere que la actividad de las proteínas involucradas con el accionar de *SPY* dependen del ritmo circadiano, lo cual podría traer como consecuencia que la generación de *SPY* pueda depender también de este ciclo. Sin embargo esta hipótesis no ha podido ser demostrada para esta proteína (Spindly) en particular^[86].

Por último, en el plano regulatorio, los genes relacionados con la respuesta al accionar de *SPY* presentan ciertos grupos de secuencias de regulación en común, denominadas secuencias GARE (de respuesta a giberelinas) y cajas como las TAACAAA TATCCAC C/TCTTTC/T, en particular *SPY* podría registrar regulación por la presencia de las caja C/TCTTTC/T^[87]. También existen evidencias de la presencia de una posible secuencia a la que se le podría atribuir la condición de caja MADS^[87].

3.1.4. Identificación de secuencias y diseño de partidores.

En el caso de los genes a utilizar para la normalización de datos de expresión, uno de estos corresponde al gen *DAP*, el cual es un gen de origen bacterial, el que no ha sido reportado en *Vitis vinifera*, ni en otras especies del reino vegetal. Este gen ya había sido ocupado en otras experiencias en el laboratorio^[66], por lo cual se utilizó el par de partidores (el que genera un amplicón de 202 pb) que ya estaba diseñado para tales efectos y cuya secuencia de partidores se presenta a continuación.

<i>DAP Sense</i>	(DAP-s)	5' TTGCATTAGAGCACGGAGTC 3'
<i>DAP Antisense</i>	(DAP-a)	5' GCGTATCTGAAGCGTTTGG 3'

Como genes de expresión constitutiva propias del genoma de *Vitis* se ocuparon 2 genes de los que existían reportes de un comportamiento de expresión constante^[27]. Estos genes son el factor de elongación 1 alfa (*EF1α*) con un amplicón de 431 pb y el gen que codifica para Actina (*ACT*) con un amplicón de 189 pb. La secuencia y nomenclatura de dichos partidores es la siguiente.

<i>EF1α Sense</i>	(EF1R-s)	5' AGGATGGACAAACCCGTGAG 3'
<i>EF1α Antisense</i>	(EF1R-a)	5' TTTGTCCCCATCTCTGGCTT 3'
<i>ACT-C Sense</i>	(ACT(2)-s)	5' ACTGCTGAACGGGAAATTGT 3'
<i>ACT-C Antisense</i>	(ACT(2)-a)	5' AGATGGCTGGAAGAGGACT 3'

En el caso de los genes en estudio, los partidores se generaron utilizando una sistematización en la que se priorizaba el criterio de presentar una T_m teórica de 66 °C. El siguiente criterio correspondía a evitar degeneraciones tales como hibridaciones inespecíficas inter o intra partidores, lo que concluyó con el diseño y la obtención de partidores convenientes para la amplificación de cada una de las secuencias de los genes. Para el caso de *PMEI* se diseñaron 4 pares de partidores (secuencias 1, 2, 3 y 4) y para *SPY* 3 pares de partidores (secuencias A, B, C). Sus secuencias se detallan a continuación:

<i>PMEI-1 Sense</i>	(PMEI1-s)	5' CAGCCGCACACACCAACACG 3'
<i>PMEI-1 Antisense</i>	(PMEI1-a)	5' TCATCAACTGAGTCTGCCACCT 3'
<i>PMEI-2 Sense</i>	(PMEI2-s)	5' CCGAATGGCTTAACCTGTCTAC 3'
<i>PMEI-2 Antisense</i>	(PMEI2-a)	5' CCTGTCCCTGCTACTTGTCTG 3'
<i>PMEI-3 Sense</i>	(PMEI3-s)	5' ACGTTTCCGTGTATCTATCATA 3'
<i>PMEI-3 Antisense</i>	(PMEI3-a)	5' GACTCCTCCATCGCGTTTCAG 3'
<i>PMEI-4 Sense</i>	(PMEI4-s)	5' AGCTCACAACCTCACATGAACACA 3'
<i>PMEI-4 Antisense</i>	(PMEI4-a)	5' TCGCCTAAGACCTCCACACAAT 3'
<i>SPY-A Sense</i>	(SPYA-s)	5' GGGCAGGCGATTTATGAGGTTA 3'
<i>SPY-A Antisense</i>	(SPYA-a)	5' CCCAACTTGTTATTAGCAGTATGA 3'
<i>SPY-B Sense</i>	(SPYB-s)	5' GAACTCACTGGTCATACTGCTAA 3'
<i>SPY-B Antisense</i>	(SPYB-a)	5' AGTAATAAAGCCATTGGAAAGTGC 3'
<i>SPY-C Sense</i>	(SPYC-s)	5' ATGCGGGAACAACACTACGACATG 3'
<i>SPY-C Antisense</i>	(SPYC-a)	5' GACTCCAAAGCAAGGGCGAAG 3'

El tamaño de los amplicones que genera cada uno de los pares de partidores, fue planeado para una mejor realización de los experimentos de qPCR. El largo del amplicón de *PMEI-1* es 268 pb, para *PMEI-2* es 344 pb, para *PMEI-3* es 268 pb, para *PMEI-4* es 298 pb, para *SPY-A* es 357 pb, para *SPY-B* es 270 pb y para *SPY-C* es 274 pb.

3.1.5. RACE PCR.

Dentro del trabajo de identificación y caracterización de secuencias mediante método RACE, se logró el secuenciamiento de 4 secuencias (SPY A y C y PMEI 1 y 2) hacia la cola poli-A (región 3'-UTR); sin embargo, estas secuencias no aportaban en demasía a las anotaciones existentes, pues no agregaban más de 10 nucleótidos a las secuencias existentes en las bases de datos.

El objetivo principal por el cual se analizó las secuencias, fue la verificación de que se estuviera amplificando y estudiando los genes correctos y de forma adicional generar anotaciones a partir de las secuencias obtenidas. Se realizó la identificación de los fragmentos amplificados, comprobándose que

todas las secuencias amplificadas en los PCR correspondían ciertamente a las formas de los genes estudiados, al encontrarse prácticamente las mismas secuencias obtenidas a partir de las bases de datos, con no más de 15 nucleótidos de divergencia en la secuencia de cada gen.

Durante este trabajo de memoria hubo una dificultad intrínseca en el procesamiento del método RACE ya que no se consiguió una síntesis correcta de todos los RACE cDNA (cDNA que en sus extremos tiene los adaptadores que permiten el secuenciamiento completo del mensajero). El posible motivo responsable de esta dificultad se asocia a los tamaños de los cDNA y la posición de los partidores los cuales involucrarían fragmentos muy pequeños que caen dentro de la banda mínima de funcionamiento del método. No se descarta sin embargo, posibles errores en el método, los cuales son minimizados con repeticiones de la experiencia.

3.2. OBTENCIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE LOS GENES ANALIZADOS.

3.2.1. De la extracción del RNA.

Para la extracción del RNA de la baya o flor (dependiendo del estadio) se pensó en una serie de métodos, sin embargo solo se probaron dos de éstos, dada una limitación del material biológico, pues solo se poseían tres vides en etapa juvenil de su desarrollo por cada fenotipo, lo que implica no más de 10 racimos por vid y que el material biológico está destinado además a otras investigaciones.

Los métodos probados fueron un kit de extracción de RNA total para plantas leñosas (Favogen) basado en el método de Chomczynski ^[79] y el método de extracción de borato caliente «*Hot Borate*» (de uso común en el laboratorio) (ver anexo J). El primero de ellos presentó el problema de que dejaba restos de ácidos nucleicos en particular DNA, lo cual implicaría serios problemas si se desea estudiar la expresión génica, pues el DNA «contaminante» traería consigo un ruido que aumentaría los niveles de expresión génica que se captan en los real time PCR posteriores. Este ruido incluso podría derivar en la entrega de falsos positivos en la medición o una sobre-valoración de los valores de mRNA.

Por otra parte, se verificó la presencia de DNA genómico contaminante en las primeras extracciones de RNA realizadas. Ello se realizó mediante un ensayo en el que se sintetizó cDNA a partir de estas extracciones, y realizando una posterior reacción de PCR usando los partidores para la amplificación de *ACT*, el cual se conoce es un gen de expresión constitutiva en vides. Por otra parte, se practicó una PCR utilizando RNA como material nucleico; esta reacción no debiese generar amplificación ya que la Taq polimerasa (Go Taq Flexi, Promega) usada solo actúa sobre hebras de DNA y no de RNA.

En la Figura 10 se muestra el resultado de la electroforesis en gel en el que se cargaron las muestras antes descritas. Se puede observar que en ambas muestras en que se uso RNA existió amplificación, lo cual implica que estas poseen un grado de contaminación por DNA. La amplificación de cDNA en este caso cumplió un rol de control positivo de la reacción de PCR.

La diferencia de tamaño de los amplicones de *ACT* entre las reacciones que usaron como sustrato tanto extracto de RNA y cDNA (Ver Figura 10), se le puede atribuir al hecho de que en el segundo caso se utilizaron cDNAs provenientes de mRNA, luego, este material nucleico no presenta intrones en su secuencia; mientras que en el caso del extracto de RNA se sospecha que el contaminante es DNA genómico, pues presentaría tanto secuencias exónicas e intrónicas que lo harían más extenso en pares de bases.

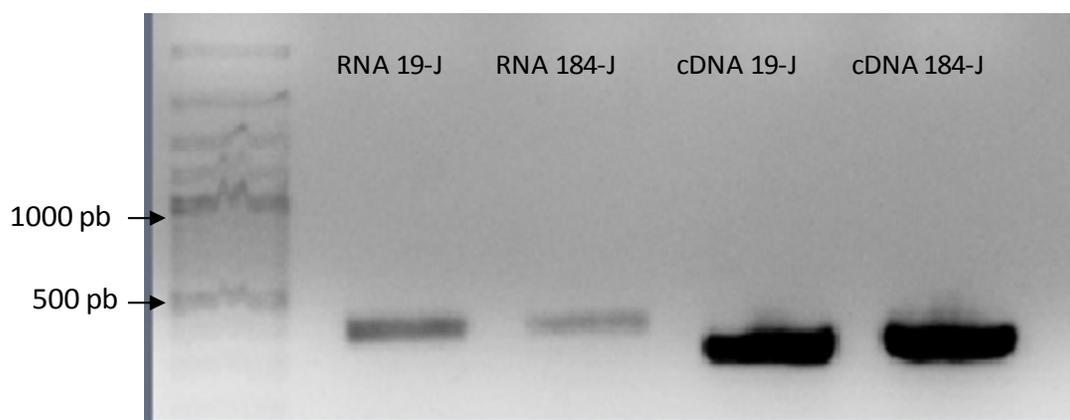


Figura 10: Ensayo de amplificación de RNA y cDNA obtenidos mediante uso de kit: (método de Chomczynski) los dos primeros carriles corresponden al PCR usando el RNA extraído como sustrato; los dos últimos carriles corresponden al PCR usando el cDNA sintetizado como sustrato.

A causa de este inconveniente se probó nuevamente la extracción de RNA mediante el método de Chomczynski (Kit), ahora agregando una etapa de aplicación de DNAsas, añadiendo DNAsas RQ₁-RNase Free DNase (Promega), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (el que incluía una etapa de inactivación).

Posterior al tratamiento con DNAsas, se realizó un procedimiento de amplificación y electroforesis similar al anterior en el que se detectó que se eliminó efectivamente el DNA contaminante de las muestras de RNA extraído, sin embargo la acción de estas DNAsas no se logró neutralizar, lo que llevó consigo el problema de que estas actuaron posterior a la síntesis de cDNA. Es por ello, que este método fue descartado, a causa de la pérdida de información que dicho problema genera (Ver Figura A-5 en Anexo M).

Posteriormente, se realizó una nueva prueba usando DNasa 1 (DNase I RNase Free, Epicentre Biotechnologies), bajo el mismo procedimiento. Se comprobó que este método no es del todo eficaz para la eliminación de DNA durante la extracción de RNA, nuevamente detectándose trazas de DNA en su amplificación con partidores de actina (Ver Figura A-6 en Anexo M).

Bajo estas circunstancias, se optó por usar otro método de extracción de RNA ocupándose el protocolo de *hot borate*, el cual destaca por ser una técnica muy confiable no solo en la obtención de RNA, sino también en su purificación en presencia de orgánicos solubles y polifenoles que dificultan la extracción. Esto permitiría extraer el RNA sin la presencia de contaminación por DNAs. Sin embargo, este método tiene la desventaja de que requiere de grandes cantidades de material biológico, y posee una baja eficiencia. Al analizar la eficiencia de ambos métodos mediante una cuantificación por espectrofotometría, se observó que en el método de *hot borate* se obtienen en promedio 60 µg de RNA

total a partir de de 3 g de tejido vegetal (es decir, 20 μg de RNA por gramo de material vegetal) en cambio el uso de kit producía en promedio 8 μg de RNA total, a partir de 0,1 g de tejido vegetal (80 μg de RNA por gramo de material vegetal).

Dadas estas diferencias de eficiencia y el limitado material vegetal disponible, se optó por utilizar el kit (método de Chomczynski) sin utilización de DNAsas, para realizar una posterior purificación, probándose el método de Dynabeads. Esta metodología consiste en una cromatografía de lecho móvil por afinidad al mRNA, en la cual se aprovecha la presencia de la cola poli-A en los mensajeros, para retener los RNA en esferas magnéticas, las que son separadas del resto de los contaminantes bajo la acción de magnetismo y lavados sucesivos. El uso de esta técnica permitió la eliminación de los DNAs contaminantes (Figura A-7 en Anexo M).

Ya estandarizada la metodología de trabajo se procedió a realizar la extracción de RNA. Sin embargo y como consecuencia de que la cantidad de RNA total que se obtiene de la extracción por kit no era suficiente para realizar la síntesis de cDNA. Se debió realizar 4 extracciones de cada muestra. Estas se juntaban y se analizaban en un gel denaturante donde se comprobaba la presencia de rRNA 18s (aprox. 2000 pb) y 28s (aprox. 5100 pb), que son las moléculas de RNA más abundantes y por ende se detectan en el gel denaturante simple (Figura 11).

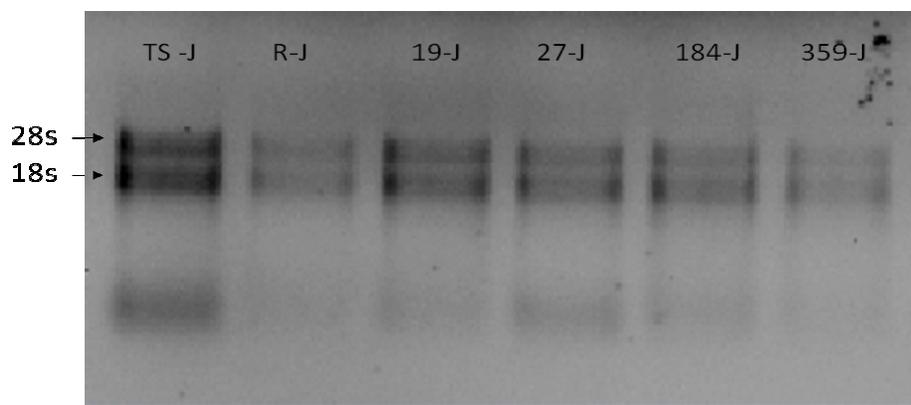


Figura 11: Verificación de la extracción de RNA total en gel denaturante: Se observa los rRNA 18s y 28s y posiblemente el fragmento 5s en la parte inferior de la imagen. Para cada uno de los segregantes en el estado J

También se realizó sobre dichas muestras un análisis espectrofotométrico, con el cual las absorbancias obtenidas por cada muestra, fueron transformadas a unidades de densidad óptica (O.D.) y posteriormente estas se convirtieron a unidades concentración (Ver anexo G).

3.2.2. Síntesis de cDNA.

La siguiente etapa fue la síntesis de cDNA (Anexo K). Para corroborar la correcta realización de este procedimiento, se realizaron reacciones de PCR usando como partidores los genes *DAP* (que sirven de control en esta etapa) y *ACT* (que es un gen constitutivo presente en el genoma de *Vitis vinifera*); si ambos genes amplifican, entonces se puede suponer que la síntesis fue realizada de modo correcto (Ver figura 12).

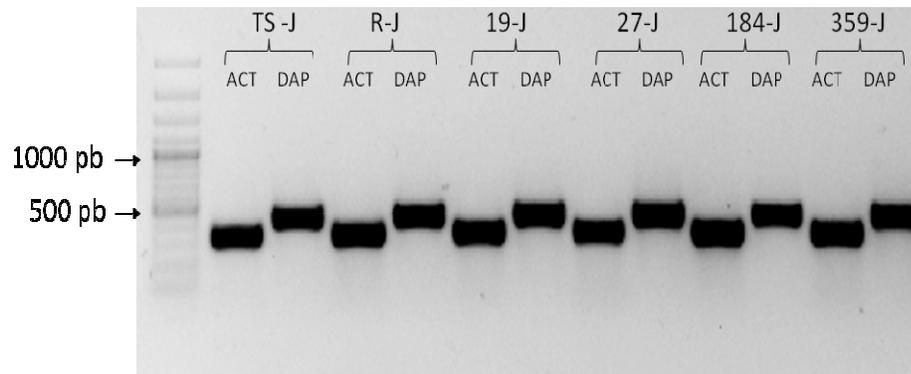


Figura 12: Comprobación síntesis de cDNA, para muestras de los 4 segregantes y parentales: Se detecta la presencia de amplificación de *ACT* y *DAP* para cada uno de los segregantes en el estado J

Posterior a la corroboración de la síntesis de cDNA, se procedió a determinar la concentración del cDNA obtenido. Para ello se realizó un análisis espectrofotométrico, cuyos resultados se encuentran en el anexo H.

3.2.3. Prueba de partidores.

Los partidores fueron diluidos y alicuotados en porciones de 100 μ l con concentración de 100 picomoles por μ l y probados en una reacción de PCR común con temperatura de alineamiento de 62 $^{\circ}$ C, en este ensayo se detectó, a través de los gels correspondientes, la amplificación de todas las formas *PMEI* y *SPY* salvo la isoforma 3 de *PMEI*.

Debido a que existían bandas tenues, y en el afán de la búsqueda de *PMEI-3*, es que se realizó otra amplificación disminuyendo en dos grados centígrados la temperatura de alineamiento, es decir 60 $^{\circ}$ C. Tras esta amplificación, se logró detectar bandas más notorias de las isoformas de *SPY* y *PMEI* salvo *PMEI-3* que no se detectó (Figura 13). Con este resultado, se estableció que la temperatura de alineamiento para los PCR, de las secuencias génicas en este estudio, se definiera en 60 $^{\circ}$ C. Posteriormente, se realizaron pruebas a diversas temperaturas para verificar la presencia de *PMEI-3*, sin encontrar resultados positivos

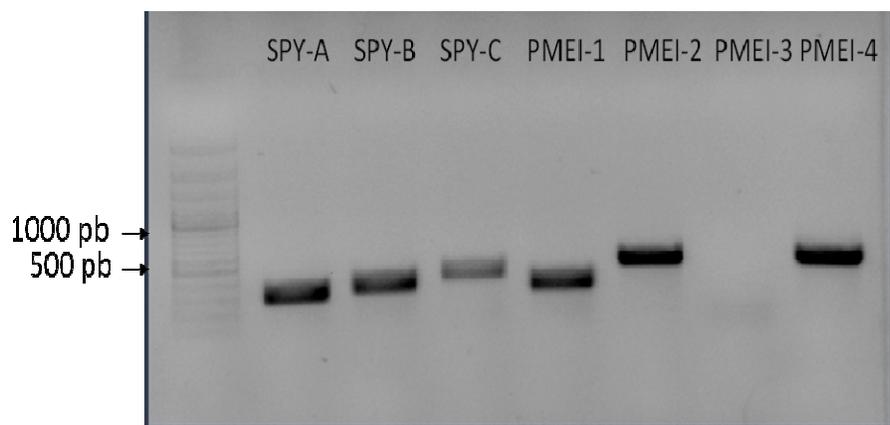


Figura 13: Prueba de partidores de *PMEI* y *SPY* ($T_a=60\text{ }^\circ\text{C}$): Se denota amplificaciones de las todos los genes en estudio salvo la presencia de producto PCR de la isoforma 3.

Faltando por determinar la presencia de *PMEI-3* en *Vitis*, se procedió a realizar una búsqueda de las isoforma de *PMEI-3* en diversos tejidos. Se analizó la presencia de *PMEI-3* y de los otros genes de interés en flor, raquis y hoja, nuevamente no encontrándose presencia de este transcrito en las muestras analizadas. Como último camino en la búsqueda de la isoforma 3 de *PMEI* se procedió a realizar una reacción de PCR sobre muestras de DNA genómico de Vid en el que no se detectó la presencia de dicha isoforma.

A modo de ejemplo, se muestra el caso correspondiente al cDNA obtenido de hoja, el cual se presenta como el resultado de mayor interés para una discusión, el gel de este ensayo se observa en la Figura 14.

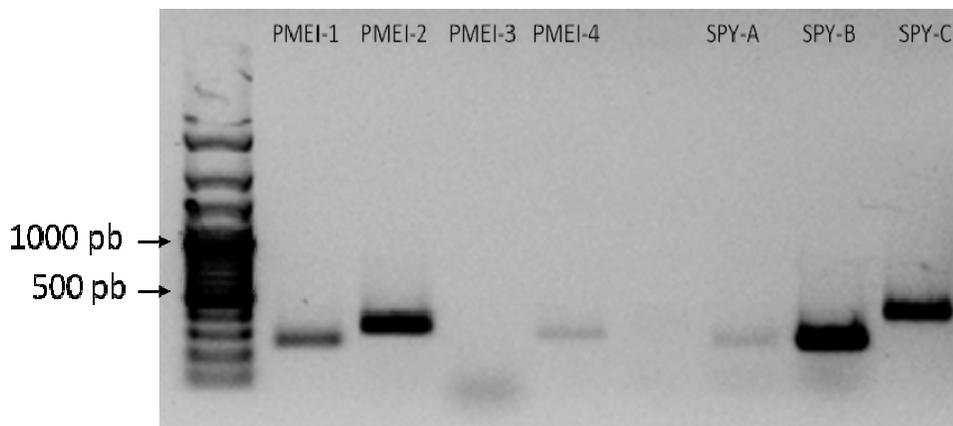


Figura 14: Prueba de partidores de *PMEI* y *SPY* en cDNA obtenido a partir de RNA de Hoja: de izquierda a derecha se posee el marcador de peso molecular, las isoformas de *PMEI* (1, 2, 3 y 4), luego un espacio y las tres isoformas de *SPY* (A, B y C)

Es útil hacer notar que *PMEI-4* y *SPY-C* en el análisis de muestras de hojas presentado, muestran visualmente un menor nivel de expresión en este tejido, lo cual hace a estos genes interesantes, ya que tendrían una supuesta mayor expresión a nivel de baya. Esta diferencia podría estar indicando que estas isoformas se expresan mayormente en procesos que están ocurriendo en la baya, la cual está en pleno proceso de desarrollo (en los estadios que se están estudiando). Luego, estos genes podrían estar principalmente relacionados con el proceso desarrollo de baya y no con otros procesos que ocurren a nivel de hoja, justificándose así las diferencias de nivel de expresión detectadas.

En resumen, y como consecuencia de que la forma de *PMEI-3* no fue posible de localizar en ninguna de las experiencias realizadas, es que se procedió a descartar a esta isoforma. Lo que es consistente con la baja homología nucleotídica y aminoacídica de esta proteína con las otras isoformas. Además, esta proteína se encuentra muy alejada filogenéticamente y distante en su posición cromosomal con respecto a sus pares en *Vitis vinifera*. Por otra parte, dada la carencia de información ya sea de secuencias (cajas) que indiquen una posibilidad de existencia de transcrito o de estudios proteómicos que confirmen la presencia cierta y positiva de *PMEI-3* en uvas ^[68], se determinó realizar los perfiles de expresión correspondiente solo de las seis secuencias identificadas mediante amplificación y posterior secuenciamiento.

3.2.4. Confección de curvas estándar para qPCR.

Cumplida la etapa anterior se procedió a realizar un ajuste para conocer las condiciones de operación de los futuros qPCR. Para ello se realizó una mezcla de diversos cDNA, generados a partir de los parentales en los diversos estadios de desarrollo en estudio, con la cual se efectuó una amplificación de PCR en tiempo real para corroborar que bajo las condiciones descritas anteriormente en la Metodología y utilizando una temperatura de alineamiento de 60 °C, los genes de interés amplificaban de manera adecuada.

En cuanto ya se poseían las condiciones de operación, se procedió a realizar los estándares respectivos que se ocuparon en la cuantificación de cada uno de los genes. Para ello se realizó una cuantificación mediante espectrofotometría sobre los productos de PCR generados en la etapa anterior. A partir de las concentraciones moleculares calculadas en dicho ensayo, se procedió a preparar para cada gen, estándares de concentración de 10.000 picogramos por microlitro de material nucleico, éstos se usaron en la confección de las respectivas curvas estándar de cada gen, las que permitieron relacionar los tiempos de *crossing point* con dichas concentraciones. Obteniéndose las curvas representativas (ver en planillas en el CD adjunto) de las que se puede calcular la concentración y posteriormente el número de moléculas presentes en las diferentes muestras ^[39].

3.2.5. Perfiles de Expresión.

Una vez que se poseían estos valores característicos se procedió a elaborar el perfil de expresión, mediante PCR en tiempo real sobre las muestras. A partir de interpolaciones en la curva de calibración y los valores de *crossing point* (ver en planillas en el CD adjunto) se procedió a determinar la concentración de mRNA específico presente en la muestras; luego, utilizando la densidad másica se obtuvo el número de moléculas por unidad de volumen cuyo resumen de valores se muestra en el anexo F.

Previo a este cálculo, y a modo de control de calidad de las amplificaciones, se verificaba que en cada una de las reacciones realizadas no se hubieran generado productos inespecíficos. De ser así el método falla y la medición no es válida, pues se estaría registrando la señal que genera el gen de interés y la que genera el producto inespecífico en conjunto. Para ello se revisaban las curvas de *melting*, las que se obtenían a partir de una medición continua de la intensidad de señal frente un gradiente de temperatura de 62° C a 98° C [39].

Para las muestras estudiadas no se presentaron variaciones en el punto de *melting*; sin embargo en algunas muestras que presentaban niveles bajos de moléculas de mRNA, se detectó presencia de producto inespecífico. Ello se corrigió acercando la temperatura de medición de intensidad del fluoróforo, a la temperatura de *melting* característica de cada amplicón, lo que garantizaba que el efecto del producto inespecífico interno al gen (el cual posee una temperatura de *melting* menor que el gen en cuestión) tendiera numéricamente cero.

Posteriormente, se realizó un análisis de expresión de los genes de expresión constitutiva (*ACT* y *EF1a*); encontrándose que *ACT* presentaba su rango de valores cercano a un mismo promedio de expresión. Sin embargo, habían algunas muestras en las cuales dicho nivel, difería en más de una desviación estándar con respecto al promedio, lo que otorgaba una cantidad considerable de ruido en la medición. Al enfrentarse a un análisis estadístico de varianza (ANOVA) se demostró que existían cambios entre la expresión de los genes, lo cual no es deseable para un gen involucrado en la normalización de datos. En el caso de *EF1a*, este gen registró niveles inferiores de ruido que *ACT* y una tendencia que *a priori* hacía pensar que no existían cambios significativos de expresión. Sin embargo, luego de un análisis estadístico de varianza, se concluyó que sí existían cambios significativos, por lo cual se tuvo que descartar el uso de este gen como elemento de normalización. Frente a estas dos situaciones se procedió a recurrir a la utilización del gen *DAP*, el que se agregó a las muestras con concentración conocida para garantizar una cantidad constante de este gen, lo que permitió la normalización de los datos, ya que mostró una expresión sin variaciones significativas tras la prueba de ANOVA. Una vez definido el gen a ocupar para la normalización se procedió a calcular la expresión relativa de los genes de interés lo que se ve reflejado en las gráficos 2 al 7.

Perfil de expresión de *PMEI-1*

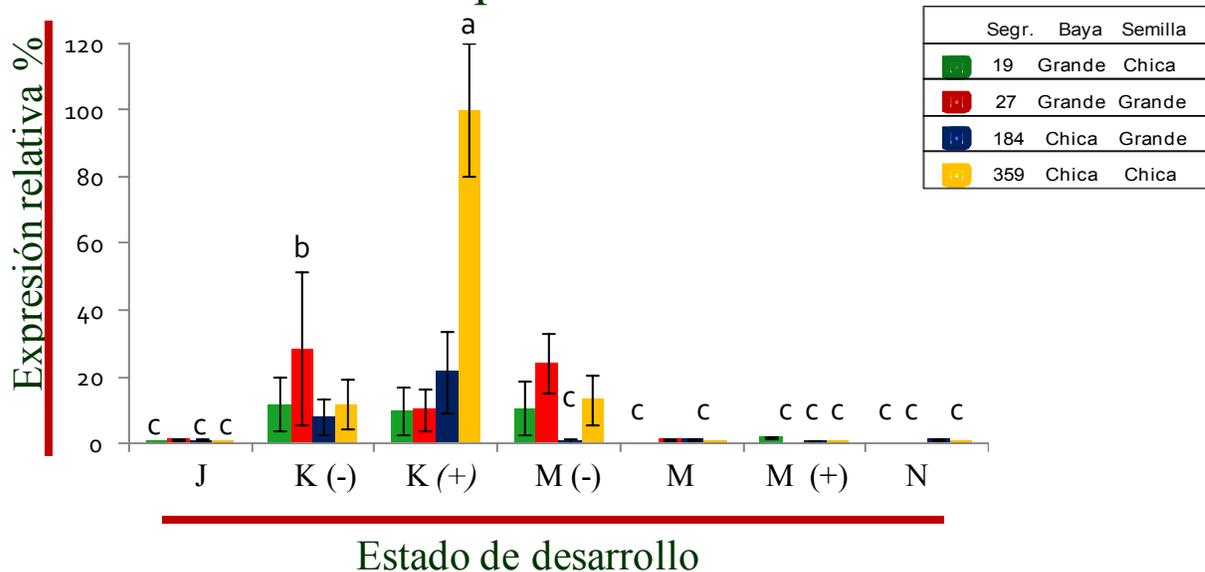


Gráfico 2: Perfil de expresión de *PMEI-1*: en verde se presenta la expresión relativa del segregante 19 correspondiente al fenotipo: baya grande, semilla grande; en rojo el segregante 27: baya grande, semilla grande; en azul el segregante 184 baya chica, semilla grande, y en amarillo el segregante 359: baya chica, semilla chica. Las letras representan agrupaciones de muestras que presentan diferencias significativas con respecto a las otras muestras según análisis LSD con $p_{\text{value}} < 0,05$.

Perfil de expresión de *PMEI-2*

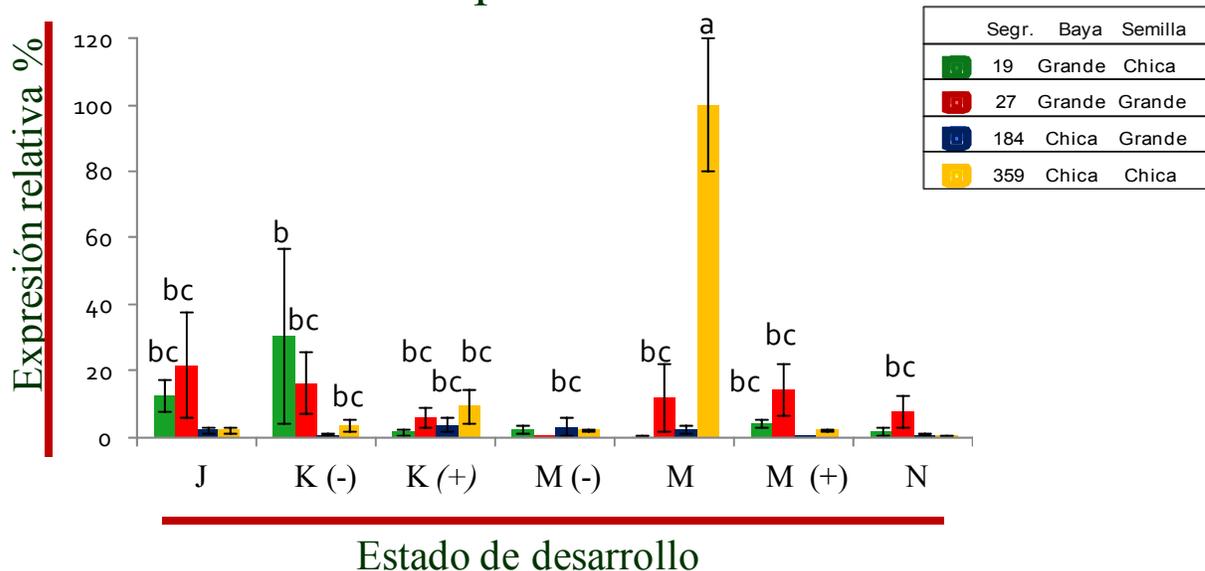


Gráfico 3: Perfil de expresión de *PMEI-2*: en verde se presenta la expresión relativa del segregante 19 correspondiente al fenotipo: baya grande, semilla grande; en rojo el segregante 27: baya grande, semilla grande; en azul el segregante 184 baya chica, semilla grande, y en amarillo el segregante 359: baya chica, semilla chica. Las letras representan agrupaciones de muestras que presentan diferencias significativas con respecto a las otras muestras según análisis LSD con $p_{\text{value}} < 0,05$.

Perfil de expresión de *PMEI-4*

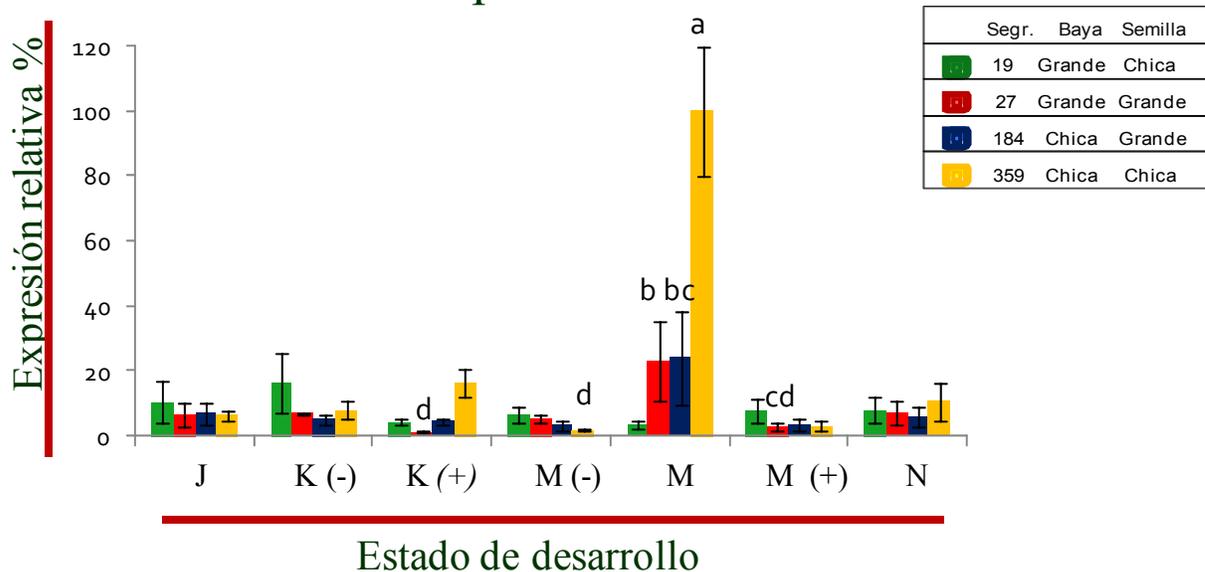


Gráfico 4: Perfil de expresión de *PMEI-4*: en verde se presenta la expresión relativa del segregante 19 correspondiente al fenotipo: baya grande, semilla grande; en rojo el segregante 27: baya grande, semilla grande; en azul el segregante 184 baya chica, semilla grande, y en amarillo el segregante 359: baya chica, semilla chica. Las letras representan agrupaciones de muestras que presentan diferencias significativas con respecto a las otras muestras según análisis LSD con $p_{\text{value}} < 0,05$.

Perfil de expresión de *SPY-A*

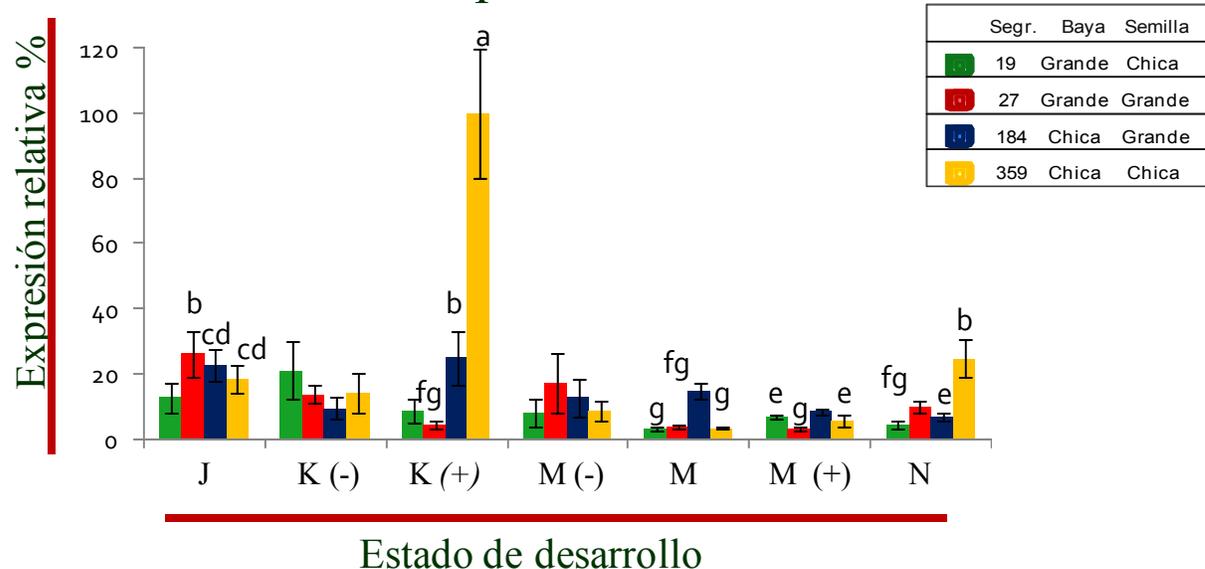


Gráfico 5: Perfil de expresión de *SPY-A*: en verde se presenta la expresión relativa del segregante 19 correspondiente al fenotipo: baya grande, semilla grande; en rojo el segregante 27: baya grande, semilla grande; en azul el segregante 184 baya chica, semilla grande, y en amarillo el segregante 359: baya chica, semilla chica. Las letras representan agrupaciones de muestras que presentan diferencias significativas con respecto a las otras muestras según análisis LSD con $p_{\text{value}} < 0,05$.

Perfil de expresión de *SPY-B*

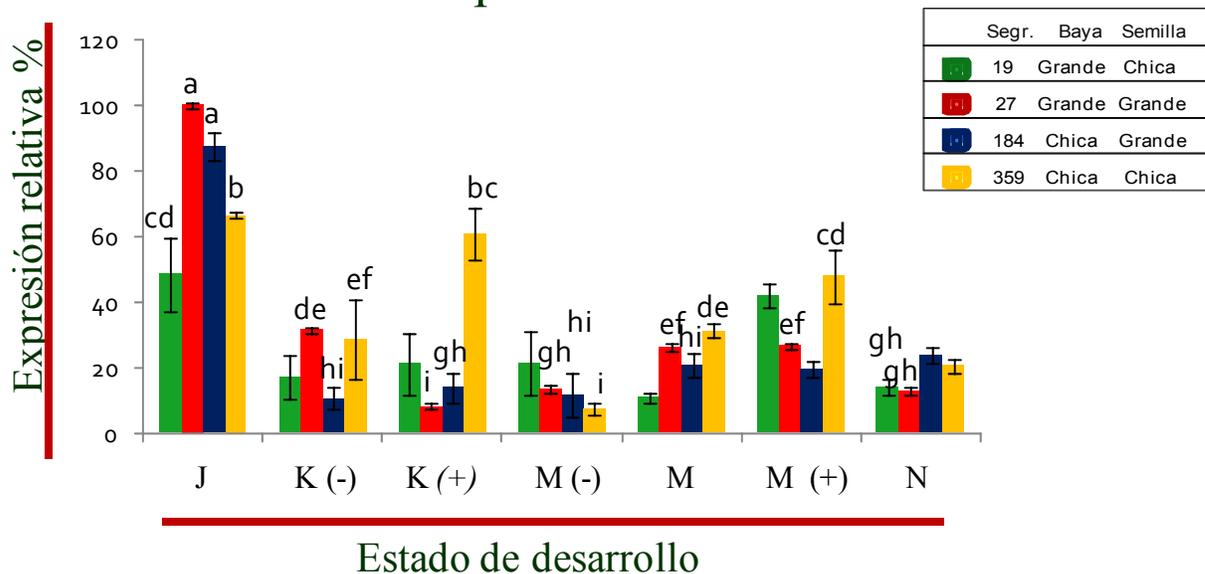


Gráfico 6: Perfil de expresión de *SPY-B*: en verde se presenta la expresión relativa del segregante 19 correspondiente al fenotipo: baya grande, semilla grande; en rojo el segregante 27: baya grande, semilla grande; en azul el segregante 184 baya chica, semilla grande, y en amarillo el segregante 359: baya chica, semilla chica. Las letras representan agrupaciones de muestras que presentan diferencias significativas con respecto a las otras muestras según análisis LSD con $p_{\text{value}} < 0,05$.

Perfil de expresión de *SPY-C*

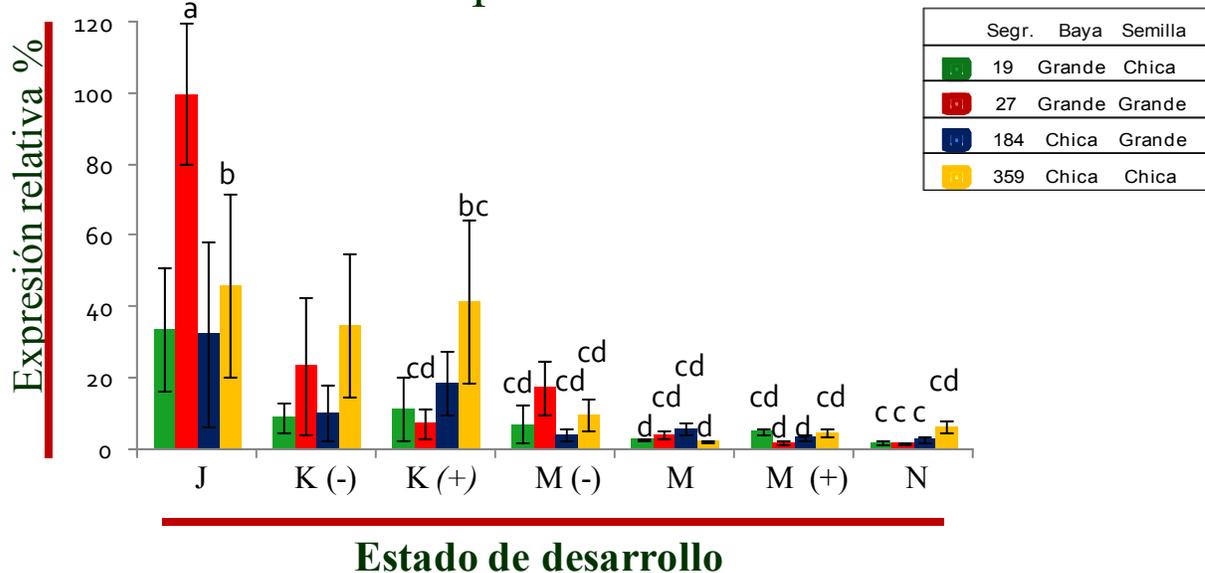


Gráfico 7: Perfil de expresión de *SPY-C*: en verde se presenta la expresión relativa del segregante 19 correspondiente al fenotipo: baya grande, semilla grande; en rojo el segregante 27: baya grande, semilla grande; en azul el segregante 184 baya chica, semilla grande, y en amarillo el segregante 359: baya chica, semilla chica. Las letras representan agrupaciones de muestras que presentan diferencias significativas con respecto a las otras muestras según análisis LSD con $p_{\text{value}} < 0,05$.

Antes de entrar en una discusión más exhaustiva sobre la forma de dichos perfiles de expresión, es interesante mencionar que en el caso de *PMEI* las isoformas 2 y 4 presentan tendencias similares de comportamiento, a diferencia de la isoforma 1, en el cual el perfil muestra una tendencia de comportamiento diferente a las otras dos isoformas. Caso similar se compara con las secuencias que codifican *SPY* en el que las isoformas B y C presentan un perfil de expresión similar y sin embargo al comparar ambas con la isoforma A, se ve que ésta presenta una expresión aparentemente distinta a las otras dos secuencias.

En el caso de *PMEI* en sus formas 2 y 4, se observa que existe una mayor expresión en el segregante 359 (baya chica, semilla chica) en el estadio M. Sin embargo, al presentarse los datos en escala de expresión relativa, se genera una especie de amortiguamiento, por sobre los otros datos, en los cuales no se detectan mayores cambios que muestren tendencias claras de comportamiento; lo mismo pasa con la muestra en estadio K tardío del segregante 359 en *PMEI-1* y en *SPY-A*; un análisis similar se puede deducir a partir de los estados de desarrollos iniciales del gen *SPY* para las formas B y C.

En los gráficos 8 al 13 se presenta el mismo perfil de expresión, pero ahora cada segregante será evaluado de manera independiente lo que permite una comparación más directa de cada fenotipo. Para ello se agrupan los 4 segregantes ordenados estratégicamente en donde en la parte superior se presenta la expresión relativa de los segregantes con fenotipo de semilla grande (27 y 184) y en la parte inferior los segregantes con fenotipo de semilla chica (19 y 359) del mismo modo se puede observar que a la izquierda se encuentran los fenotipos de baya grande (19 y 27), y a la derecha se encuentran los fenotipos de baya chica (184 y 359) lo que permite relacionar fenotipos con genotipos al comparar los caracteres de tamaño de baya y semilla con el perfil de expresión de los genes de interés.

El primer perfil analizado corresponde a *PMEI-1* (Gráfico 8) en el cual al revisar la expresión relativa se detecta que existe un cierto comportamiento que se puede relacionar con el carácter de tamaño de baya, ello se fundamenta en que se puede observar que las isoformas 27 y 19 (ambas representantes del fenotipo baya grande) registran niveles altos de expresión entre los estadios K temprano y M Temprano y niveles bajos de expresión en el resto de los otros estados. Mientras que en el caso de las bayas pequeñas (184 y 359) se puede detectar que solo en el estadio K tardío existen niveles altos de expresión génica, en cambio en el resto de los estadios se presentan niveles bajos de expresión, salvo en el caso de k temprano del segregante 184 donde se detecta una expresión media, pero con alto niveles de incertidumbre (desviación estándar alta) asociados.

Perfil de expresión de *PMEI-1* separado por segregante

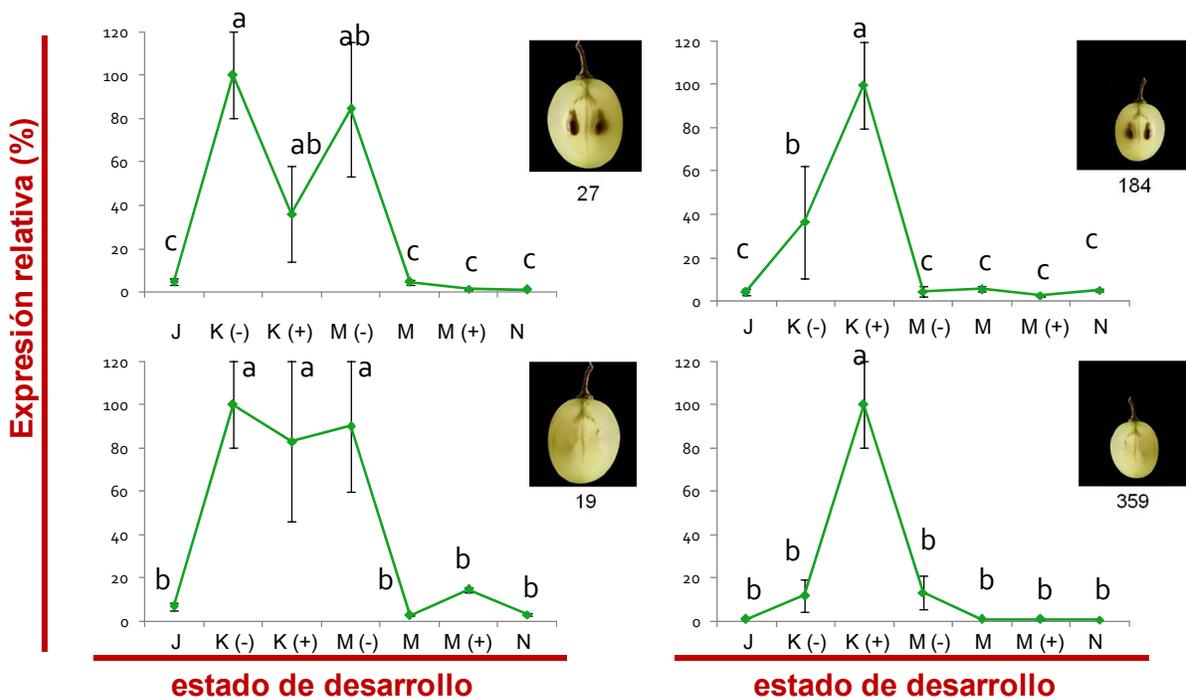


Gráfico 8: Perfil de expresión de *PMEI-1* separado por segregante: en el cuadro superior izquierdo se muestra la expresión relativa del segregante 27 (fenotipo baya grande, semilla grande), en el cuadro superior derecho el segregante 184 (baya chica, semilla grande), en el cuadro inferior izquierdo el segregante 19 (baya grande, semilla grande) y en cuadro inferior derecho el segregante 359 (baya chica, semilla chica), las letras representan agrupaciones de muestras que presentan diferencias significativas según análisis LSD con $p_{\text{value}} < 0,05$.

En resumen, de los resultados anteriores se puede inferir que las bayas grandes presentan una expresión génica similar entre ellas, al igual que las bayas pequeñas, pero no existe relación en la expresión entre tamaños de baya distintos. Por otra parte, si se trata de buscar alguna tendencia común entre los perfiles con respecto a los diferentes tamaños de semilla, no es posible encontrar alguna relación tan directa como en el caso de las bayas. Estos resultados sugieren una relación entre los cambios existentes en el perfil de *PMEI-1* y el carácter de tamaño de baya.

Otro detalle que se podría inferir observando más detenidamente los perfiles, es que pudiese existir un leve efecto de adición de ambos factores (baya y semilla) ello se puede inferir realizando la suma de las intensidades de los fenotipos 27 y 184, lo que entrega un perfil similar al segregante 19. En conclusión, tendríamos que el perfil de esta isoforma de *PMEI* estaría relacionado mayormente con el carácter de baya, con una posible tendencia aditiva hacia el carácter asemillado.

Perfil de expresión de *PMEI-2* separado por segregante

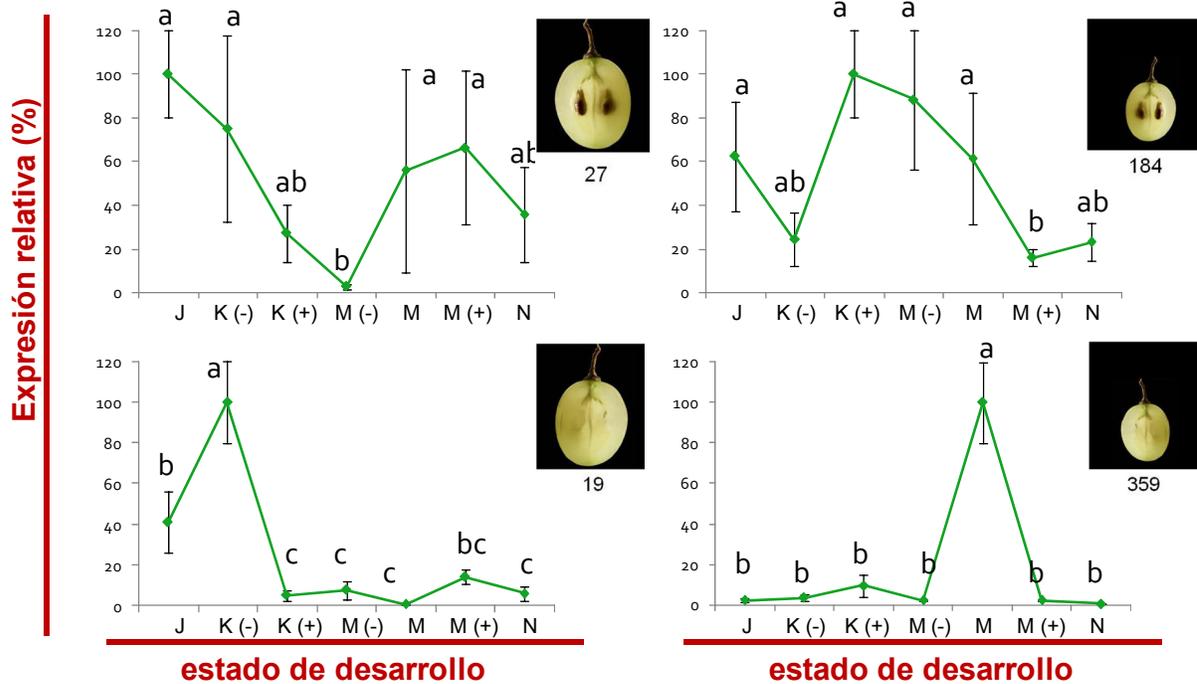


Gráfico 9: Perfil de expresión de *PMEI-2* separado por segregante: en el cuadro superior izquierdo se muestra la expresión relativa del segregante 27 de fenotipo baya grande, semilla grande; en el cuadro superior derecho el segregante 184, baya chica, semilla grande; en el cuadro inferior izquierdo el segregante 19: baya grande, semilla grande y en cuadro inferior derecho el segregante 359: baya chica, semilla chica, las letras representan agrupaciones de muestras que presentan diferencias significativas según análisis LSD con $p_{\text{value}} < 0,05$.

El caso de *PMEI-2* (Gráfico 9) parece interesante dado que no es posible establecer una relación cierta entre los tamaños de baya o semilla y los patrones de expresión génicos reportados. Tampoco combinaciones aditivas ni inversas, a partir de las cuales solo se podrían generar elucubraciones carentes de fondo estadístico. Este resultado adquiere mayor trascendencia al recordar que esta isoforma corresponde al gen candidato responsable del carácter tamaño de baya y semillas según el análisis de QTL, el que indicaría que esta forma debiese en teoría, dado el nivel de justificación estadística, poseer perfiles, que sí tengan relación cierta y positiva con el carácter de tamaño de baya y semilla; lo que refleja una evidente contradicción entre los métodos ya que sus resultados no son consistentes entre sí.

Las única conclusión sobre la marcha que se pueden inferir, es que en las especies semilladas existen cambios de menor magnitud que en especies apirenas. Ello se ve reflejado en que en los segregantes con semilla existen grupos homólogos que se intersectan (presencia del grupo AB), ello se corrobora aún más al ver estos dos segregantes solos en el perfil de expresión global (gráfico 3). En cambio, en el caso de los individuos asemillados, ante un mismo análisis, se presentan grupos homólogos definidos y diferencias más notorias de expresión en el perfil global. En resumen *PMEI-2* no presenta un

perfil en el cual los cambios de expresión sean representativos de algún fenotipo. Eso sí, solo se detectó diferencias entre la amplitud de dichos cambios entre los individuos semillados y carentes de semilla.

Perfil de expresión de *PMEI-4* separado por segregante

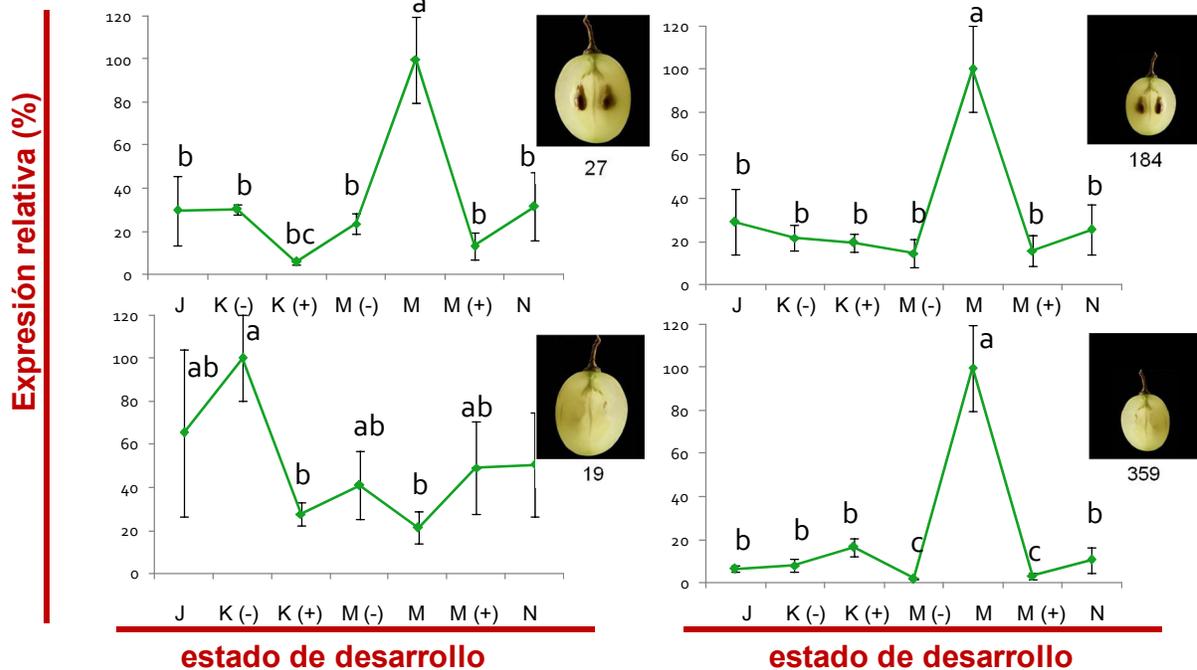


Gráfico 10: Perfil de expresión de *PMEI-4* separado por segregante: en el cuadro superior izquierdo se muestra la expresión relativa del segregante 27: baya grande, semilla grande; en el cuadro superior derecho el segregante 184: baya chica, semilla grande; en el cuadro inferior izquierdo el segregante 19: baya grande, semilla grande y en cuadro inferior derecho el segregante 359: baya chica, semilla chica, las letras representan agrupaciones de muestras que presentan diferencias significativas según análisis LSD con $p_{\text{value}} < 0,05$.

En este caso al comparar los perfiles de expresión tampoco es posible establecer relación entre los patrones de los perfiles de expresión *PMEI-4* y los fenotipos en estudios (Gráfico 10). Sin embargo, si se descarta el segregante 19; es decir, se compara solamente los perfiles de expresión de los fenotipos 27, 184 y 359, se detecta que estos presentan perfiles relativamente similares, con niveles bajos de expresión en todos los estadios menos en envero (estado M), donde se registra un pico de expresión. De aquí nace una inquietud y que radica en pensar si estos perfiles similares corresponden a un efecto generado por la suma de los factores apirenia y tamaño de baya o por el contrario es totalmente independiente de estos fenotipos.

El hecho de que existan tres fenotipos con perfiles con altos grados de similitud, podría ser un fuerte indicador de que existe un comportamiento característico propio de la isoforma. Sin embargo, la completa diferencia con el segregante 19 pone en jaque dicha hipótesis; una posible respuesta de lo que podría estar ocurriendo, es que posiblemente este perfil podría ser un artefacto del fenotipo, el cual esté

influenciado por algún factor externo como puede ser un virus, algún desorden interno o por ejemplo cambios de expresión de citoquinas o auxinas, que son otras moléculas también relacionadas con el crecimiento celular y que podrían alterar el perfil de expresión génica.

Perfil de expresión de *SPY-A* separado por segregante

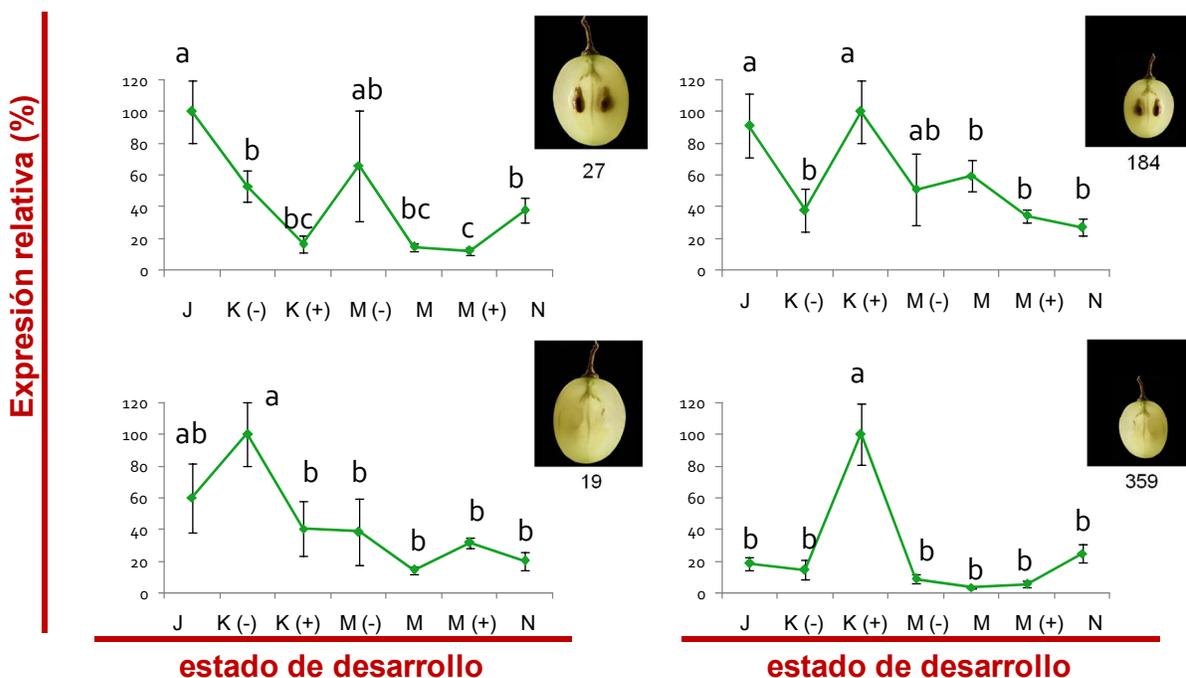


Gráfico 11: Perfil de expresión de *SPY-A* separado por segregante, en el cuadro superior izquierdo se muestra la expresión relativa del segregante 27 de fenotipo baya grande, semilla grande; en el cuadro superior derecho el segregante 184: baya chica, semilla grande; en el cuadro inferior izquierdo el segregante 19: baya grande, semilla grande y en cuadro inferior derecho el segregante 359: baya chica, semilla chica, las letras representan agrupaciones de muestras que presentan diferencias significativas según análisis LSD con $p_{\text{value}} < 0,05$.

Para la secuencia que codifica a *SPY-A* (Gráfico 11), se detecta que los perfiles no presentan relación evidente de sus cambios con los rasgos fenotípicos. Al observarse el perfil general (Gráfico 5) tampoco puede determinarse una relación que permita justificar estos perfiles. Todos los antecedentes parecieran mostrar que el comportamiento de estos genes es independiente de los dos caracteres estudiados. Sin embargo, existe la posibilidad de que este gen participe en procesos que generen caracteres que no estén siendo evaluados en este estudio.

Lo más importante es que cada segregante presenta perfiles distintos, en los que se podrían encontrar ciertos factores en común, pero no un comportamiento propio a un fenotipo. Luego, si se analiza que este gen corresponde al gen candidato que fue reportado como responsable del carácter tamaño de baya en el mapeo por QTL, se llega a la disyuntiva (al igual que en el caso de *PMEI-2*) de saber si ciertamente estos genes (tanto *PMEI-2* y *SPY-A*) son los responsables de los caracteres estudiados y de

pensar que tal vez, dicha varianza sería justificada por otros genes cercanos a la posición de QTL detectada en el mapeo, como pueden ser las otras isoformas, o bien podría darse que esta varianza sea el resultado del accionar en conjunto de una serie de genes que están presente dentro del rango que cubre el marcador molecular con que se hizo el QTL.

Perfil de expresión de *SPY-B* separado por segregante

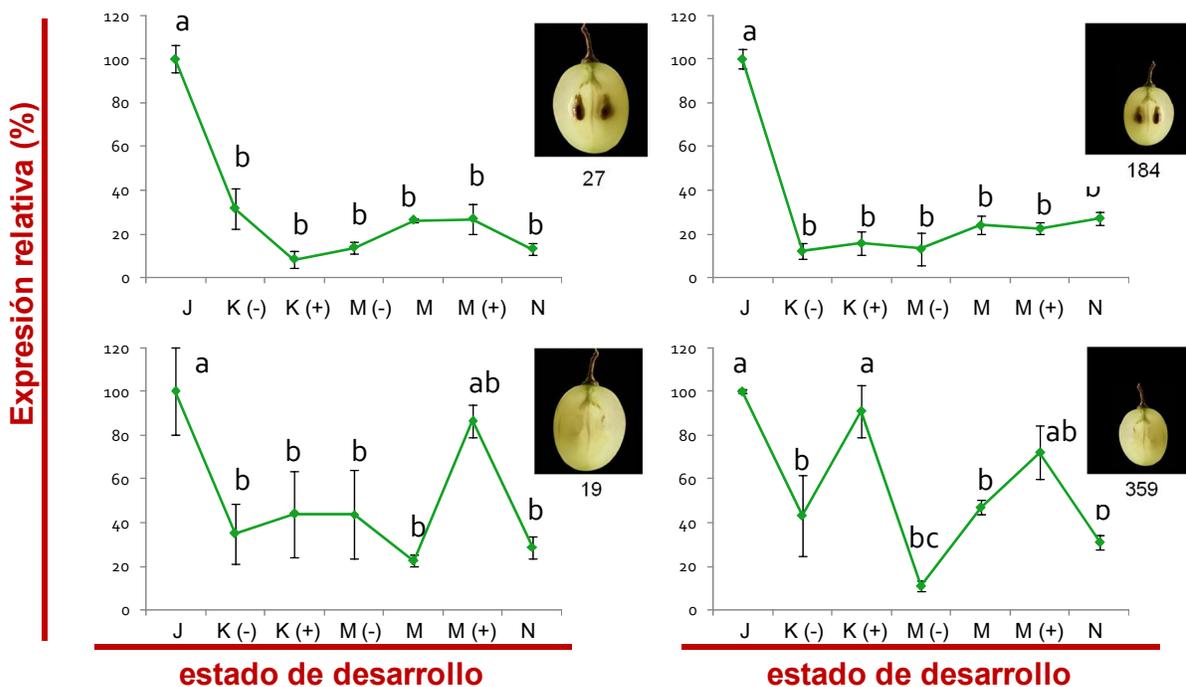


Gráfico 12: Perfil de expresión de *SPY-B* separado por segregante, en el cuadro superior izquierdo se muestra la expresión relativa del segregante 27 de fenotipo baya grande, semilla grande; en el cuadro superior derecho el segregante 184: baya chica, semilla grande; en el cuadro inferior izquierdo el segregante 19: baya grande, semilla grande y en cuadro inferior derecho el segregante 359: baya chica, semilla chica, las letras representan agrupaciones de muestras que presentan diferencias significativas según análisis LSD con $p_{\text{value}} < 0,05$.

En el caso de *SPY-B* (Gráfico 12) tenemos que se detecta una relación notoria entre el perfil de expresión y carácter de tamaño de semilla. Se puede observar que los segregantes 27 y 184 (fenotipos semillados) presentan perfiles de expresión muy similares entre sí, en el caso de los segregantes asemillados (19 y 359), la similitud no es tan evidente. Sin embargo al analizarse el perfil global (Gráfico 6), se puede notar que estos dos segregantes presentan niveles de expresión similares entre sí.

En otro análisis, si se revisa los perfiles (Gráfico 12) de los segregante de baya grande y el del segregante 359, se puede encontrar un aumento de expresión en el estado M tardío, que es más marcado en el segregante 19, ello es justificable principalmente debido a la expresión porcentual con que se presentan los datos; pero que al compararlo a nivel global (Gráfico 6) son de dimensiones similares entre ellas.

En resumen, la expresión de este gen estaría presentando un patrón notorio frente a la presencia de semilla. Y ante la ausencia de semilla dicho comportamiento se vuelve anómalo, a tal punto que a nivel del segregante 359 (baya y semilla chica), el perfil se puede considerar prácticamente oscilante, lo que sugiere que el comportamiento de *SPY-B* está relacionado con el carácter tamaño de semilla.

Perfil de expresión de *SPY-C* separado por segregante

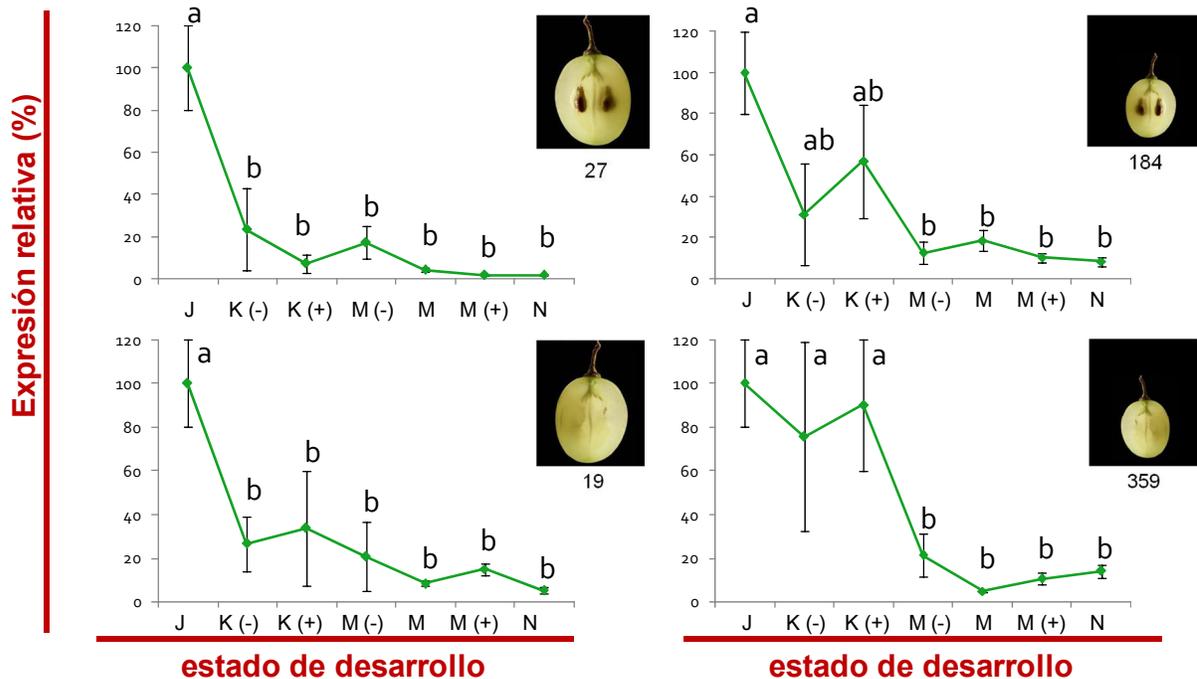


Gráfico 13: Perfil de expresión de *SPY-C* separado por segregante, en el cuadro superior izquierdo se muestra la expresión relativa del segregante 27 de fenotipo baya grande, semilla grande; en el cuadro superior derecho el segregante 184: baya chica, semilla grande; en el cuadro inferior izquierdo el segregante 19: baya grande, semilla grande y en cuadro inferior derecho el segregante 359: baya chica, semilla chica, las letras representan agrupaciones de muestras que presentan diferencias significativas según análisis LSD con $p_{\text{value}} < 0,05$.

SPY-C (Gráfico 13) se presenta como un gen de comportamiento acorde a lo esperable según las hipótesis planteadas en este trabajo, ya que en los estados iniciales se detecta una mayor expresión génica y en estados tardíos su expresión es prácticamente nula; además se puede detectar que en los segregantes con presencia de baya grande, la expresión de *SPY* decae rápidamente, lo cual concuerda con la idea de que en estos casos, la ruta de las giberelinas se inhibe en menor magnitud y por ende los niveles de crecimiento de la baya aumentan; en las bayas pequeñas la expresión de este gen decae de una manera más pausada, lo cual podría estar generado por el hecho de que las bayas más pequeñas podrían tener más reprimida la vía de respuesta a giberelinas, lo que implicaría tamaño de bayas pequeños.

Más aún, si se analiza los segregantes contrastantes más extremos, es decir 359 (semilla y baya chica) y 27(semilla y baya grande), se puede ver que existe una relación entre el desarrollo de éstos y los perfiles de expresión, presentándose como combinaciones de los segregantes con caracteres mixtos (19 y

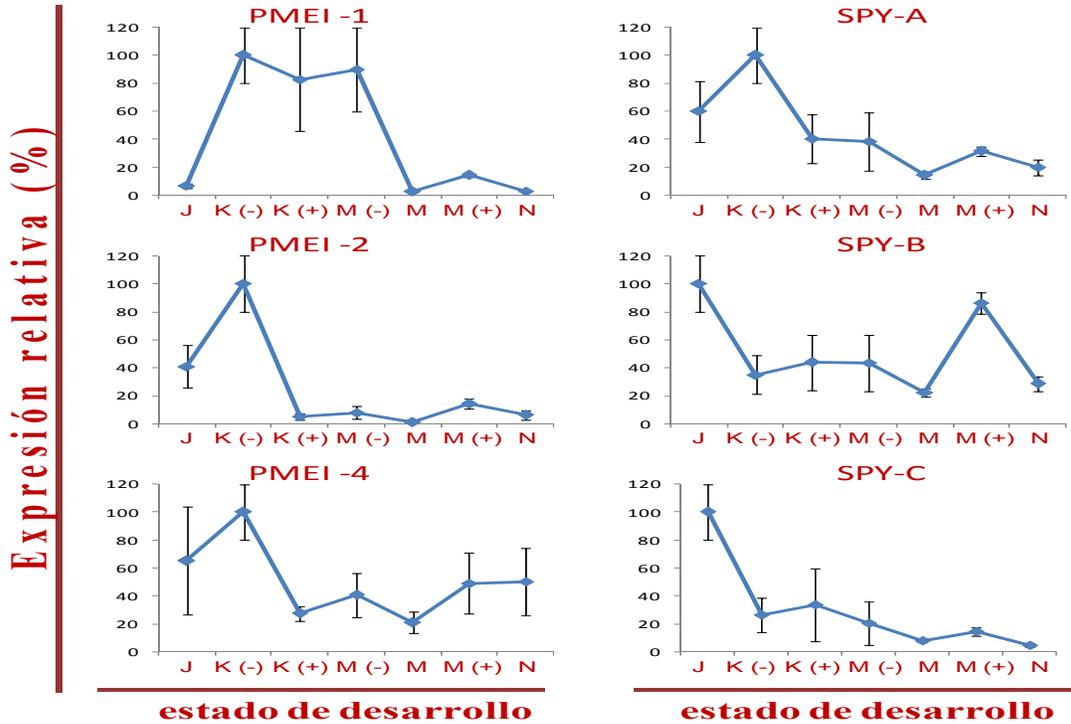
184). Así el segregante 359 presenta el decaimiento más lento de la expresión de *SPY-C* después vendría el segregante 184 (baya chica y semilla grande) con niveles de decaimiento levemente más rápido, subsiguiente aparece el segregante 19 (baya grande y semilla chica) y el segregante que presenta el decaimiento de expresión más notorio es el 27.

La idea anterior lleva a sospechar que existe una posible relación entre los cambios en los patrones de perfiles de expresión con el carácter tamaño de semilla; eso sí, este efecto tendría menor intensidad que la relación con el carácter tamaño de baya.

A lo largo del análisis realizado anteriormente se han obtenido relaciones que podrían estar justificando la forma que presentan cada uno de los perfiles de expresión expuestos.

A continuación, se presentará un análisis realizado sobre los perfiles de expresión de los segregantes, comparando los niveles de expresión entre las isoformas, (ver gráficos 14 al 17). Este ejercicio lleva a obtener un comportamiento más global de lo que ocurre a nivel de cada segregante y desde donde se puede rescatar información útil. En las siguientes gráficas a la izquierda se presentan las isoformas de *PMEI* y a la derecha las de *SPY*. En particular el gráfico 14 corresponde los perfiles del segregante 19, el gráfico 15 a los perfiles del segregante 27, el gráfico 16 a los perfiles del segregante 184 y el gráfico 17 a los perfiles del segregante 359.

Perfil de expresión del segregante 19



Perfil de expresión del segregante 27

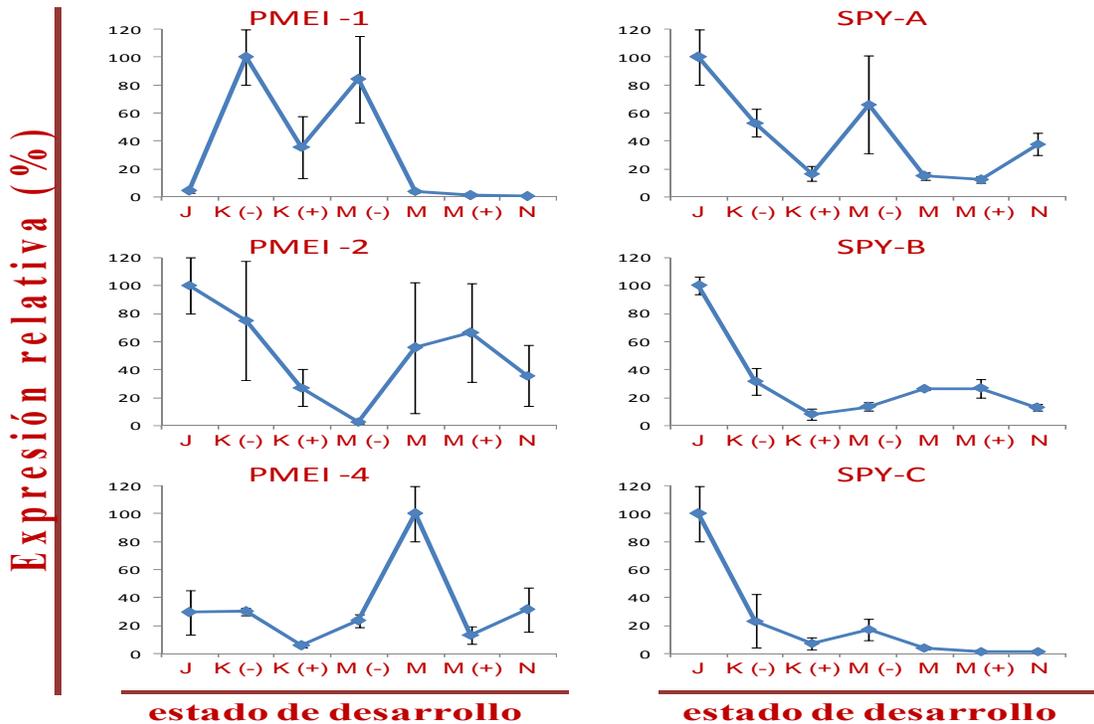
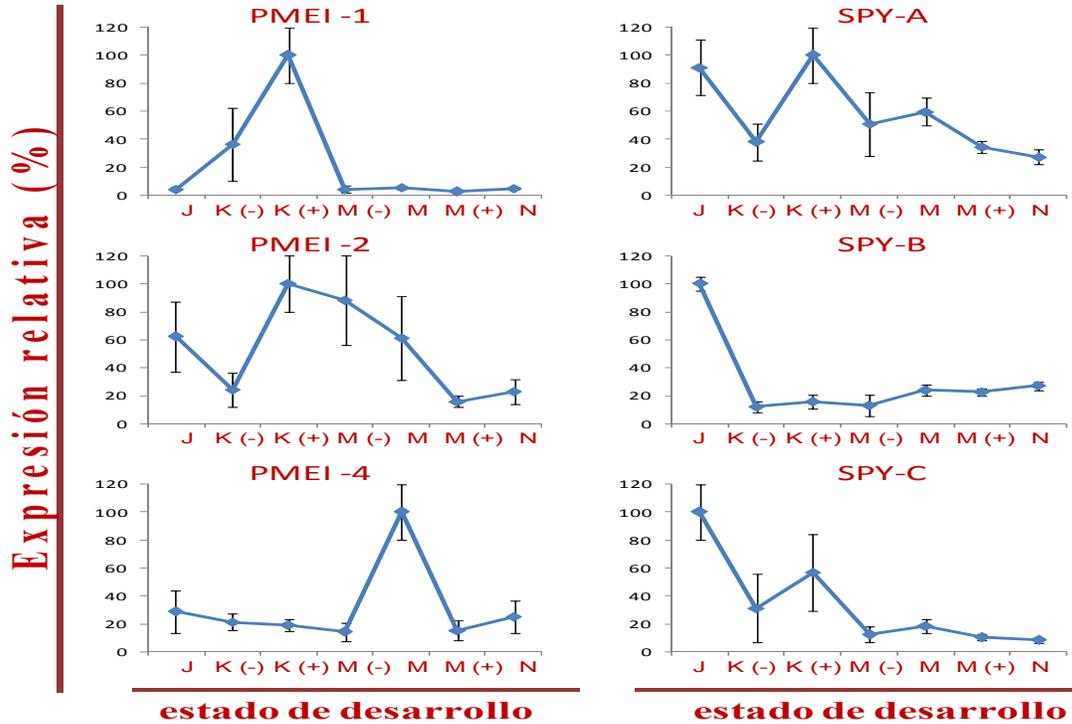
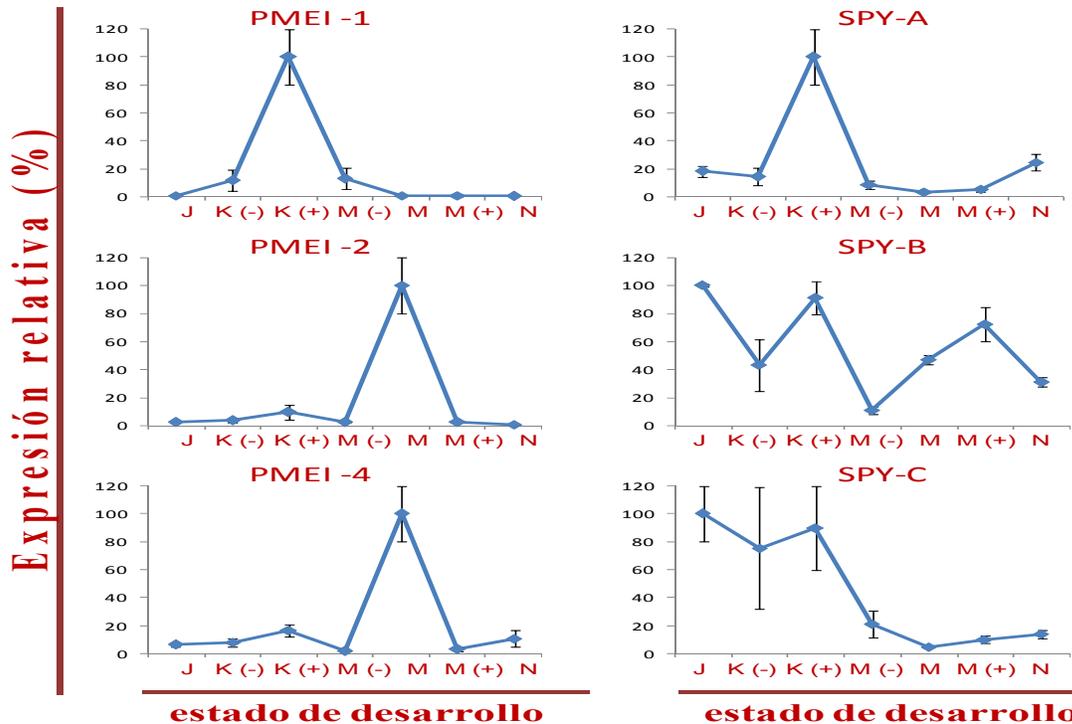


Gráfico 14 y 15: Perfiles de expresión de los segregantes 19 y 27: en el lado izquierdo de arriba hacia abajo se presentan los perfiles de las isoformas de *PMEI* 1, 2 y 4 en el costado derecho se presentan los perfiles de las secuencias que codifican para *SPY* A, B y C, las letras representan agrupaciones de muestras que presentan diferencias significativas según análisis LSD con $p_{\text{value}} < 0,05$.

Perfil de expresión del segregante 184



Perfil de expresión del segregante 359



Gráficos 16 y 17: Perfiles de expresión de los segregantes 184 y 359: en el lado izquierdo de arriba hacia abajo se presentan los perfiles de las isoformas de *PMEI* 1, 2 y 4 en el costado derecho se presentan los perfiles de las secuencias que codifican para *SPY* A, B y C, las letras representan agrupaciones de muestras que presentan diferencias significativas según análisis LSD con $p_{\text{value}} < 0,05$.

A partir de las gráficas por segregante, se puede observar que se detectan mayores niveles de expresión en las etapas iniciales de desarrollo para el fenotipo baya grande, semilla chica (segregante 19) en las tres isoformas de *PMEI*. En la que la isoforma 1 presenta niveles de expresión altos que se mantienen hasta el envero (Estado M). En el caso de *SPY B* y *C* se detecta, en el estado J, una alta expresión de dichos genes, la que disminuye en los estados siguientes. En el caso de la forma A se detecta que la expresión alta perdura hasta el estado K temprano desde donde decae a una expresión intermedia que dura hasta el apriete de racimo (M temprano). Esto permite suponer que *SPY-A* presenta un comportamiento similar a las otras dos isoformas de *SPY* (B y C). Sin embargo, este comportamiento se denotaría mas amortiguado para el caso de *SPY-A*.

En el caso del segregante 27 nuevamente *SPY B* y *C* presentan un comportamiento similar con respecto a los cambios de expresión que conforman el perfil, donde nuevamente se detecta un decaimiento de la expresión a partir del estado K temprano; eso sí, en el caso de *SPY-B*, se detecta un leve aumento significativo de expresión en los estados finales que no se observa en la isoforma C, Por otra parte, *SPY-A* presenta un comportamiento diferente pero que también presenta su pico de expresión en el estado K. Para las formas génicas de *PMEI* no existe un patrón de comportamiento que represente a este segregante. Así, la isoforma 1 presenta una alta expresión temprana, la isoforma 4 presenta niveles altos de expresión en torno al envero y la isoforma 2 presenta un comportamiento con tendencia constante.

Al analizar el segregante 184, se detecta que en el gen *SPY* las formas A y C, presentan perfiles similares entre sí, a diferencia de la forma B. En los tres casos la mayor expresión se da en los estadios tempranos y la forma en que decae dicha expresión es la que varía entre cada isoforma. En *PMEI* nuevamente se detecta un comportamiento independiente entre cada una de las isoformas, en el cual existen picos de expresión en torno a los estados intermedios (K tardío, M temprano y M respectivamente) en las isoformas 1,2 y 4 de dicho gen.

El caso más singular se da frente al segregante de baya y semilla pequeña (359), en el cual a diferencia de los segregantes anteriores, para las secuencias que codifican a *SPY* no presentan ningún patrón de comportamiento común entre las distintas formas de este gen. Por el contrario, las formas de *PMEI* 2 y 4 presentan un patrón evidentemente similar entre ellos, detectándose una mayor expresión génica en torno al estado M (envero); por último, la isoforma 1 presenta un comportamiento dispar a las otras isoformas mostrando una mayor expresión en el estado K tardío.

Ya presentados todos los resultados con sus respectivas discusiones realizadas *a priori* del análisis de comportamiento general, se presentara a continuación un análisis más global de los factores que afectan la expresión génica de los genes en estudio, el cual se pasa a detallar en los siguientes párrafos.

Una primera observación que se genera al observar los perfiles anteriores, va en el hecho que cada isoforma posee un comportamiento independiente entre sí, en otras palabras, las tres isoformas de *SPY* presentan perfiles de expresión distintos para cada segregante, lo mismo ocurre para las formas de *PMEI*, lo cual podría significar que cada una de estas secuencias estaría siendo regulada de manera distinta.

Una explicación que justificaría dicha observación, sería presumir que cada isoforma está condicionada a diferentes procesos que requieren de distintos grados de expresión de los genes en estudio. Esto podría deberse al diseño de la experiencia, en la que se analizó la expresión del conjunto baya (o conjunto flor dependiendo el estadio de desarrollo), lo que involucraría las diferentes capas cárpicas que componen la uva (exocarpio, mesocarpio y endocarpio). Es decir se está midiendo la expresión génica de la piel y de la «pulpa» de la uva, junto con todos sus elementos propios como son los haces xilemáticos, el lóculo y otras cadenas vasculares que están presentes en baya. Entonces se podría estar subvalorando la expresión que se genere en tejidos específicos de la baya y que podrían ser de mayor interés de estudiar para explicar los caracteres en estudio ^[88]. Lo recomendable es realizar distinciones de tejidos, estudiando cada uno de los elementos que componen la baya por separado. Esta dificultad fue prevista durante el proceso del diseño de esta investigación. Sin embargo, existía una cierta limitación de material biológico (enunciada anteriormente en este Capítulo) que impidió hacer un análisis por tejido. Sería entonces, interesante estudiar la expresión en piel, en pulpa y en semilla (o trazas de estas) por separado. Es por ello que se recomienda la realización de dichos ensayos en experiencias futuras en las cuales se disponga de material vegetal suficiente para un análisis por tejido.

Otro aspecto importante de destacar, es que se presentan algunos perfiles en que sus cambios no tienen relación con algún fenotipo en cuestión. Ello se podría entender si se analiza que menos de un 20 % de la varianza estaría asociada al carácter tamaño de baya para *PMEI* y *SPY*, en el cual la magnitud de estos porcentajes no implica *per se* que la expresión de estos genes esté del todo relacionada con estos caracteres a lo largo de todas las etapas de desarrollo de la vida; de hecho existe cerca de un 80% de varianza que no está justificada para estos genes y que influiría también sobre el fenotipo.

Otra suposición que se podría hacer sobre la expresión de estos genes, es que podrían existir estadios puntuales en los cuales la expresión de estos genes tomase mayor relevancia para el desarrollo de los caracteres estudiados (tamaño de baya y semilla). En otras palabras, existe una posibilidad de que se presenten momentos claves en los cuales la expresión se relacione con la cascada de sucesos que definen los caracteres en estudio; sobre los cuales, los datos bibliográficos sugieren que estos momentos se generan en los estadios tempranos del desarrollo de la vida. Más aún existen autores que identifican que el fenómeno de estenoespermocarpia se determina principalmente entre el inicio de la floración hasta la definición de la baya (estadios I hasta K) ^{[68][69]}.

Otro aspecto que es interesante analizar a partir de los resultados, consiste en cuestionarse si los perfiles obtenidos corresponden a un perfil asociado a un fenotipo o representan a un artefacto propio del segregante estudiado. Sobre esta misma idea, existe una gran heterogeneidad de rasgos en la población de segregantes, en los cuales por ejemplo existe variación de color, que van desde tonos rojizos similares a los de Ruby y bayas verdes como Thompson Seedless, lógicamente el color de la baya no debiese influir sobre las condiciones de apirenia y el desarrollo de la baya, pero sí factores como el potencial de reacción frente a las giberelinas, el cual es contrastante entre los parentales (Thompson presenta respuesta fuerte ante el tratamiento con GA₃ y Ruby dicha respuesta baja) ^[88]. Otro factor podría ser la necesidad de aplicación de GA₃ para alcanzar un tamaño comercial de uva. Cada segregante estudiado posee diferentes grados de expresión de estos caracteres, que pueden determinar la expresión génica y por ende el perfil de expresión génica.

Para entender un poco más los resultados se presentara un análisis que consiste en relacionar caracteres fenológicos con el perfil de expresión génica, analizando los sucesos que ocurren en cada estadio de desarrollo y compararlo con los resultados obtenidos. Para ello, analizaremos primero los factores que se relacionan con el accionar de *PMEI*. La baya empieza a desarrollarse posterior a la fecundación de la semilla, y en una primera etapa se presenta como una estructura compacta, de capas duras y firmes, lo que vendría acompañado con una fuerte inhibición de la PME, ello ocurre desde la floración hasta la conformación final de la estructura básica de baya a la que se denomina cuaja ^[52] y que fenológicamente corresponde a cuando la baya alcanza el estadio K temprano ^[89]. Existe una segunda etapa, en la cual debiese haber un aumento expresión de *PMEI* y que corresponde al periodo entre el apriete del racimo y el envero (estados M temprano y M). En esta etapa existe una disminución del crecimiento y la consistencia de la uva no varía, la baya literalmente se aprieta y se rigidiza. Posterior a esta etapa la producción de *PMEI* debiese alcanzar niveles basales de producción pues el fruto está orientado a un crecimiento por elongación celular ^[89].

En el caso de *SPY*, este gen está relacionado con la presencia de GA. Es por ello que antes de analizar la expresión de este gen se discutirá el perfil de la síntesis de GA, esta hormona se empieza a generar en conjunto con la gemación de las ramas de la parra; el nivel de síntesis se mantiene bajo hasta el proceso de fecundación del ovulo, donde se registra un aumento en la síntesis de GA. Los niveles de GA bajan a niveles basales posteriores al estado K tardío ^[17]. Del enfoque anterior se tiene que durante los estadios de floración se generaría un gran cantidad de GA las cuales impulsan el desarrollo de la baya hasta la maduración de esta, es por ello, que en las fases inmediatamente posteriores existe una respuesta de control (mediante la expresión de *SPY*) que partiría en el estado L tardío y terminaría con el estado K tardío. Al analizar los resultados obtenidos en las isoformas B y C de *SPY* vemos que dicha expresión génica es de menor duración en bayas grandes que en bayas pequeñas, lo cual es esperable, dado que al

haber un apagamiento más rápido del gen *SPY*, las GA actúan sin mayor represión lo que deriva en la formación de baya grande.

Una dificultad que se podría encontrar en el caso de *SPY*, es que este gen al pertenecer a la ruta de las GA, posee ciertos caminos en común con las vías de respuesta a la temperatura y a los periodos de foto-exposición. En particular existen reportes que involucran la expresión de *SPY* con estos dos factores, e incluso existen sospechas de que el accionar de este gen ésta regulado de manera indirecta por el reloj circadiano cambiando sus niveles de expresión de acuerdo a factores externos que varían a lo largo del día (principalmente temperatura y luz). Sin embargo, esta relación con el ritmo circadiano, no ha sido posible demostrarla y de hecho esta idea presenta más detractores que adherentes ^[84].

Un aspecto ya discutido, es que los resultados que entregó el método de mapeo por QTL, no hayan sido coherentes con los resultados de esta investigación al no detectarse una relación cierta entre los caracteres de interés y las formas de los perfiles de expresión generados por qPCR. Esta idea permite sospechar que el mapeo de QTLs se realizó con una baja resolución. Sugiriéndose, que es recomendable realizar una mayor saturación con marcadores en dicha búsqueda, lo que permitiría indicar con más certeza cuál es el gen responsable y con qué varianza de justificación. Ello porque la saturación permitiría reducir el espacio físico que representa un QTL en el mapa de cromosomas y con ello se reduce el número de genes asociados a un QTL que podrían ser candidatos para justificar un determinado fenotipo ^[88].

Un aspecto que podría alterar en parte las conclusiones de este estudio, es el fenotipo del segregante 184, el cual pese a que ha sido caracterizado como de semilla grande y baya pequeña, en la realidad este segregante se aproxima más a un fenotipo de semilla grande y baya grande ^[59]. Bajo condiciones naturales este fenotipo es muy complejo de lograr, ya que por un lado la presencia de una semilla grande implica *per se* producción de GA y como ya se ha mencionado dicha producción estaría relacionada con el tamaño de semilla, luego más GA implica una baya grande ^[17]. Es así que dentro de la población de segregantes no se detectan individuos que representen a este extraño fenotipo, siendo el 184 el más cercano a estas características. Otro punto que se podría considerar, es que este segregante presentó ciertas anomalías en las mediciones de evolución de pH y presencia de sólidos solubles, los cuales permiten dudar de los resultados asociados a este segregante ^[88].

El otro fenotipo que no es común en la naturaleza, es el fenotipo de semilla pequeña y baya grande representado por el segregante 19 y que corresponde al fenotipo de interés comercial. Como ya se dijo la semilla es la principal fuente de GA, luego si esta hormona no está presente en abundancia es poco probable que la baya sea grande. A diferencia del fenotipo semilla grande y baya chica, este tipo de fenotipo (baya grande, semilla chica) es algo más frecuente. Ello se adjudicaría a que las semillas no son

la única fuente de GA, existiendo otros tejidos que podrían suplir la carencia de hormonas que causa la ausencia de semilla ^[17].

Si se quisiera seguir mencionando factores que afectan a los resultados de los perfiles de expresión génica se podría hacer un ensayo mucho más extenso. Sin embargo, solo se han expuestos los más importantes que podrían afectar los resultados obtenidos.

Otro hecho a destacar, es que pese a que las condiciones de campo (en los que se encuentran las vides en estudio) se tratan de controlar para que sean prácticamente iguales para todos los individuos, se tiene que estas condiciones no son idénticas y que la posición de las parras influye sobre el desarrollo de los segregantes, afectando en algunos casos, factores como la protección frente al viento, cantidad de agua disponible, exposición solar y otros factores. La sumatoria de estas condiciones influiría en la determinación final de un fenotipo como tal. Es por ello que dentro del contexto de este estudio, se han hecho investigaciones con el afán de ver si estas condiciones ambientales influyen en favorecer algún fenotipo en particular, analizando la distribución de los segregantes y sus características fenotípicas. ^{[59][88]}. Lo importante a rescatar, radica en que estos factores podrían alterar los segregantes que representen un fenotipo y por ende se fortalece la idea anteriormente expuesta de que se recomienda hacer un estudio con al menos 3 segregantes por fenotipo.

Una última disyuntiva sobre los perfiles de expresión consiste en responder a la pregunta de por qué los principales genes responsables de las características fenotípicas estudiadas, son reguladores proteicos y no efectores como tal; y la respuesta al parecer no es trivial y podría basarse en que las proteínas cumplen ciertas funciones las cuales no tienen relación directa con los niveles de expresión de dicha proteína, sino con la cantidad de proteína activa disponible para efectuar la labor proteica. Dicha disponibilidad se asocia al accionar de activadores y represores de las proteínas, es decir reguladores de actividad proteica. En particular *PMEI* y *SPY*, son reguladores y en particular reguladores tempranos (actúan regulando las primeras etapas de las vías en que participan) de la degradación de pectinas de pared celular y en la respuesta a giberelinas respectivamente. Más aún ambos reguladores actúan de manera negativa en las vías en que participan, lo que implica que ambos genes al interrumpir las vías respectivas, favorecerían el desarrollo de los caracteres de interés de apirenia y tamaño de baya grande.

4. CONCLUSIONES.

En este trabajo de memoria se logró identificar y caracterizar en forma adicional a las dos secuencias génicas candidatas obtenidas previamente mediante mapeo por QTL (*PMEI-2* y *SPY-A*), a 2 isoformas de *SPY* (-B y -C) y 3 isoformas *PMEI* (-1, -3 y -4). En el caso de *SPY*, las 3 secuencias nucleotídicas analizadas codificarían prácticamente la misma proteína, siendo las formas -B y -C las que poseen la secuencia aminoacídica mas parecida entre sí. En el caso de *PMEI*, los niveles de similitud fueron menores que los de *SPY*, presentando una similitud nucleotídica solo del 20% y una similitud aminoacídica del orden del 60%, siendo las isoformas 1 y 4 las más parecidas. Además, se detectaron diferencias a nivel del sitio de unión a PME, las que serían características de cada isoforma y darían especificidad a cada isoforma de *PMEI*.

Se logró determinar también la posición de las isoformas de *SPY* y *PMEI* en el cromosoma de *Vitis vinifera*, detectándose que para cada gen, las isoformas se encontraban en ubicaciones cercanas dentro del genoma (A con C y 1 con 4, eran las isoformas más cercanas entre ellas), llamando la atención que la isoforma 3 de *PMEI* se encontrase aislada del resto. Conforme se desarrolló este trabajo se detectó que *PMEI-3* no estaba presente en el DNA genómico de las muestras en estudio, por lo cual fue descartada.

Con respecto a los métodos escogidos en el diseño experimental, estos resultaron ser adecuados, requiriéndose sin embargo, la aplicación de pequeños ajustes. En el método de obtención de los mRNA; destaca la utilización de los Dynabeads como una opción satisfactoria para la purificación de mRNA. Por otra parte, se diseñó partidores específicos para la amplificación de los segmentos génicos deseados, que no generaban productos inespecíficos en el Real Time PCR y que permitieron la obtención de los perfiles de expresión de los genes en estudio. Los datos obtenidos a partir de los ensayos de qPCR presentan una precisión discutible, dado los altos niveles de desviación estándar presentes en algunas muestras -algo no tan poco frecuente según múltiples ensayos anteriores realizados en el Laboratorio-. Sin embargo, el tratamiento de los datos y las respectivas repeticiones permiten asegurar que existe exactitud en los valores con los que se construyeron los perfiles de expresión.

En relación con los perfiles de expresión génica, se detectaron en 3 isoformas de *PMEI* y 3 de *SPY* en *Vitis vinifera*, cambios en los niveles de expresión de los fenotipos estudiados. Sin embargo, los dos genes candidatos obtenidos de los estudios por QTL (*PMEI-2* y *SPY-A*), no presentaron cambio alguno en su perfil de expresión que se pueda asociar al fenotipo tamaño de baya o semilla; en cambio los otros nuevos genes identificados en este estudio, como *PMEI-1* y *SPY-C* estarían relacionados con el desarrollo de la baya, y *SPY-B* estaría asociado a los cambios relacionados con el tamaño de la semilla. El hecho de

que los genes candidatos *PMEI-2* y *SPY-A* no presenten un perfil de expresión que se pueda relacionar con algún carácter en estudio, genera una contradicción que sugiere que el método de QTL realizado con anterioridad, no contaba con la resolución suficiente para detectar con exactitud los genes responsables del tamaño de semilla y/o baya. Es por esto, que se recomienda realizar esta técnica con una mayor saturación, para así encontrar ciertamente a los genes responsables de los caracteres analizados. En otro análisis, se sugiere que los distintos patrones detectados en los perfiles de expresión, corresponderían a un promedio de los fenómenos que ocurrirían en los diferentes tejidos que se ocuparon en la experiencia, recomendándose a futuro aplicar la técnica a diferentes tejidos (baya, piel y semilla), pues cada uno de estos podrían presentar distintos patrones de expresión para cada gen.

Con respecto a la participación de ambos genes (*SPY* y *PMEI*) en sus respectivas vías metabólicas, se postula que ambos genes actuarían como reguladores de estas. En particular se ha encontrado que *PMEI* participaría en la vía de degradación de pectinas en la pared celular, regulando la actividad de *PME*; en el caso de *SPY* se postula que ésta proteína podría estar involucrada en la vía de respuesta frente a las giberelinas, actuando sobre los represores e inhibidores de GA. Otra conclusión que se obtiene como consecuencia de este análisis y que se debería tener en cuenta, es la posible influencia que hay sobre *SPY* de factores ambientales como la cantidad de horas luz-día, temperaturas y ritmo circadiano, que podrían estar alterando su expresión bajo ciertas condiciones.

Al considerar el objetivo de identificar, corroborar y caracterizar las secuencias de los transcritos codificantes de cada uno de los genes en estudio, se puede destacar que esta meta fue lograda, confirmándose que se trabajó efectivamente con secuencias correspondientes a los genes *SPY* y *PMEI* de *Vitis vinifera*. Sin embargo, no se logró obtener la secuencia completa de los genes, principalmente por limitaciones en la realización del método RACE, lográndose identificar solo algunos extremos terminales 3' de las secuencias codificantes.

Con respecto a la hipótesis de trabajo, se encontró que las isoformas de *SPY* presentan un comportamiento que en parte se ajustaría a dicha hipótesis, lo que no ocurre con las isoformas de *PMEI*.

Por último, cabe mencionar con respecto al objetivo del proyecto en su contexto global, de realizar una primera aproximación al estudio de los genes candidatos, obtener los perfiles de expresión génica y de generar conocimiento acerca de los genes, ha sido logrado de manera satisfactoria, quedando pequeñas observaciones que estarán presentes en un estudio más profundo a realizarse en la siguiente temporada y que serán consecuencia del trabajo realizado en esta Memoria de Título.

5. RECOMENDACIONES Y COMENTARIOS.

Como ya se mencionó anteriormente se recomienda repetir el trabajo realizado (Análisis de todas las isoformas tanto de *SPY* como de *PMEI*) en la siguiente temporada usando 3 o más representantes por fenotipo, en dicho ensayo se deben tomar en cuenta, factores tales como considerar una mayor cantidad de estadíos durante el proceso de floración. En esta nueva experiencia existe una posibilidad de que no se presente una fiel repetitividad de los datos obtenidos en esta temporada, debido a que las condiciones de suelo, clima, radiación solar y otros factores varían. Sin embargo, ambos trabajos en conjunto permitirían confirmar las principales ideas obtenidas en este informe y corroborar tendencias de comportamiento. También es deseable, si es que la disposición de material biológico lo permite, realizar un estudio diferenciado de tejido, donde se separe al menos piel, pulpa y semilla.

De los métodos aplicados, según apreciación personal, la extracción de RNA es el método que mayor complejidad presentó a lo largo de este trabajo, en el cual, la presencia de contaminantes, polifenoles y sólidos solubles dificultan dicha etapa. Es por ello, que se recomienda realizar pruebas con material biológico adicional al estudio en sí, con el objetivo de detectar algún método de extracción de RNA que presente altos rendimientos, además permitir obtener mRNA con altos grados pureza, y presentar altas eficiencias de cada etapa.

Por último, sería recomendable a nivel de proyecto global, dado que existen ciertos segregantes que se han detectado que representan a un fenotipo (entre toda la población), realizar una nueva plantación más limitada en tamaño, pero más regulada en factores ambientales con el fin de eliminar la sospecha de sesgo existente sobre la distribución de las plantaciones de campo y en particular en los segregantes en estudio.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- [1] Aragón investiga, Portal Aragón Investiga DGA [en línea] <http://www.aragoninvestiga.org/investigacion/tema_imprimir.asp?id_tem a=187> [consultado en 4 de Noviembre de 2009].
- [2] Infoagro, Agricultura el cultivo de la vid [en línea] <<http://www.infoagro.com/viticultura/vinas.htm>> [consultado en 11 de Noviembre de 2009].
- [3] Hinrichsen R. Patricio, (2008). Trazabilidad genética de Variedades frutales mediante Herramientas moleculares. Revista Tierra Adentro INIA, N°82 Nov-Dic 2008, Santiago, Chile.
- [4] Vassari B. (2005). Historia de la uva, En: seminario de vides, Murcia, España, Junio de 2005.
- [5] González Hernández, G. (2003). El vino: fundamentos químicos y análisis. Arte Comunicación Visual, 119 pp, Santa Cruz de Tenerife, España.
- [6] Jaillon O, Aury JM, Noel B, et al. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. Nature 449:463-467.
- [7] Lodhi M. y Reisch. B. (1995). Nuclear DNA content of Vitis species, cultivars, and other genera of the Vitaceae. Theor Appl Genet 90:11-16.
- [8] Muñoz I, Valenzuela J (1995). Principales variedades de uva de mesa en Chile Ruby Seedless. Ficha no. 4. IPA La Platina. (no. 85), Tierra Adentro. (no. 2) p. 16. (May-Jun 1995).
- [9] Valenzuela, J., Lobato A. (2000). Uva de mesa en Chile. Colección Libros INIA N°5. 338 pp Santiago Chile.
- [10] Muñoz I, Valenzuela J (1994). Principales variedades de uva de mesa en Chile: Var Sultanina. Ficha no. 5 Investigacion y Progreso Agropecuario La Platina. (no. 85) p. 10. (Nov-Dic 1994).
- [11] Asoex (2008). Oportunidades de negocios para la uva de mesa y su Promoción Internacional. En Seminario de Uva de Mesa 2008 de ASOEX, 13-14 de mayo, La Serena, Chile.
- [12] Chile Agrícola, SNA [en línea] <<http://www.sna.cl/web/admin/spaw2/uploads/files/Microsoft%20PowerPoint%20-%20CHILE%20AGRICOLA.pdf>> [revisado el 20 de mayo de 2009].
- [13] Nuevo agro, Uva de mesa, dulce conflicto [en línea] <<http://www.nuevoagro.cl/content/view/883/29/>> [revisado el 19 de mayo de 2009].
- [14] Uva de mesa, investigación y comercio en uva de mesa [en línea] <<http://www.uvademesa.cl/index2.htm#>> [revisado el 20 de mayo de 2009].
- [15] Hewstone O., N, Valenzuela J., Muñoz S. C., (2007). Isela-INIA, a New Table Grape Cultivar. Agricultura Técnica. vol.67, n.2, pp201-204, Chile .
- [16] Valenzuela J., Hewstone O., Muñoz C., (2007) . Ilusión-INIA, a New Early Table Grape Cultivar Agricultura Técnica vol.67, n.2, pp205-209, Chile.

- [17] Kucera B., Cohn, Leubner-Metzger., (2005). Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research* 15: 281–307.
- [18] Fennimore, S. y Foley, M. (1998). Genetic and physiological evidence for the role of gibberellic acid in the germination of dormant *Avena fatua* seeds. *Journal of Experimental Botany* 49, 89–94.
- [19] Fernandez L, Torregrosa L, Terrier N, Sreekantan L, Grimplet J, Davies C, Thomas MR, Romieu C, Ageorges A (2007) Identification of genes associated with flesh morphogenesis during grapevine fruit development. *Plant Mol Biol* 63:307-323.
- [20] Da Silva Goes, *et al.*, (2005). Characterizing the Grape Transcriptome Analysis of Expressed Sequence Tags from Multiple *Vitis* Species and Development of a Compendium of Gene Expression during Berry Development. *Plant Physiol* 139:574-597.
- [21] Terrier N, Glissant D, Grimplet J, Barrieu F, Abbal P, Couture C, Ageorges A, Atanassova R, Léon C, Renaudin JP, Dédaldéchamp 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.
- [22] Bouquet, A., Danglot Y. (1996). Inheritance of seedlessness in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, 35:35-42.
- [23] Varoquaux F, Blanvillain R, Delseny M, Gallois P (2000). Less is better: new approaches for seedless fruit production. *Trends Biotech* 18:233-242.
- [24] Spiegel-Roy, P., Y. Baron, y N. Sahar. (1990). Inheritance of seedlessness in seeded x seedless progeny of *Vitis vinifera* L. *Vitis* 29: 79-83.
- [25] Pospisilova, D., V. Palenik. 1988. Heredity of seedlessness in grapes. *Genet Slechteni* 24:325-332.
- [26] Sato, A., H. Yamane, M. Yamada, y K. Yoshinaga. 1994. Inheritance of seedlessness in grapes. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 63:1-7.
- [27] Mejia Nilo, Hinrichsen Patricio et al (2007). Identification of QTLs for seedlessness, Berry size, and ripening Date in a Seedless x Seedles. Table Grape Progeny. *American Society for Enology and Viticulture*. 58: 4-9 2007.
- [28] Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977, 74:5350-4.
- [29] Freeman, W.; Robertson, D.; Vrana, K. (2000). Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *BioTechniques* 29: 1042-1055.
- [30] Valoczi, A., Hornyik, C., Varga, N., Burgyan, J., Kauppinen, S., Havelda, Z. (2004). Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide. *Nucleic Acids Research* 2004 32(22):e175.

- [31] Matsuhisa Akio, Kishi Yuichiro y Shiba Kiyotaka (1994). A Simple Staining Method for DNA and RNA Blotted on a Membrane Using a Polyethyleneimine-Enzyme Conjugate. *J. Biochem*, 1994, Vol. 116, No. 3 478-481.
- [32] Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995, 270:467-70.
- [33] Kane MD, Jatkoe TA, Stumpf CR, Lu J, Thomas JD, Madore SJ (2000) Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50 mer) microarrays. *Nucl Acids Res* 2000, 28:4552-4557.
- [34] Eisen, M.; Brown, P. (1999). DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods Enzymol.* 303: 179-205.
- [35] Bertucci F.; *et al.* (1999). Sensitivity issues in DNA arrays based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples. *Hum. Mol. Genet.* 8: 1715-1722.
- [36] Powell LM, Wallis SC, Pease RJ, Edwards YH, Knott TJ, Scott J. (1987) A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell*. Sep 11; 50(6):831-40.
- [37] Higuchi R, Fokler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic (1993) PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology*; Vol 11: 1026-1030.
- [38] Roche Diagnostics (2006). Roche PCR Applications Manual, 3rd edition.
- [39] Araya A., (2008). Introducción al PCR en tiempo real, qPCR Roche Chile en seminario de interpretación del diagnóstico de virus ISAV por PCR, diciembre de 2008, Puerto Montt, Chile.
- [40] Zipper H. et al (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nuc. Acid Res.* 32,103-108.
- [41] Stürzenbaum, S.R. y Kille, P. (2001). Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 130: 281-289.
- [42] Ririe, K.M.; Rasmussen, R.P.; Wittwer, C.T. (1997). Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction *Anal Biochem.* 1997 Feb 15; 245(2):154-60.
- [43] Mejía Nilo (2008). Identificación de la arquitectura genética que determina el desarrollo de semillas y baya en vid de mesa mediante la integración de análisis genómicos y cuantitativos” Trabajo para optar al grado de doctor en ciencias mención ingeniería genética vegetal. U de Talca, Chile.
- [44] Lynch M, Walsh B (1998). *Genetic and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. USA.
- [45] Dávalos G. (2002), Detección de QTLs de importancia económica y análisis de genes candidatos en poblaciones porcinas comerciales españolas. Memoria para obtener el grado de doctor en veterinaria Universidad de Barcelona, España.
- [46] Velasco R, et al. (2007). A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE* 2:e1326.

- [47] Collard B.C.Y., Jahufer M.Z.Z., Brouwer J.B., Pang E.C.K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142:169-196.
- [48] Irifune K, Nishida T, Egawa H, Nagatani A (2004). Pectin methylesterase inhibitor cDNA from kiwi fruit. *Plant Cell Rep*, 23:333-338.
- [49] Carpita NC, Gibeaut DM (1993). Structural models of primary cellwalls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* 3:1–30.
- [50] Giovane A, Servillo L, et al. (2004). Pectin methylesterase inhibitor. [Review]. *Proteins & Proteomics* Volume 1696, Issue 2, 12 February 2004, Pages 245-252.
- [51] Ciardiello, M., Tamburrini M., Tuppo L., Carratore Vito., *et al* (2004). Pectin Methylesterase from Kiwi and Kaki Fruits: Purification, Characterization, and Role of pH in the Enzyme Regulation and Interaction with the Kiwi Proteinaceous Inhibitor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52 (25), 7700-7703.
- [52] Barnavon L., Doco T., Terrier N., Ageorges A., Romieu C., Pellerin P. (2001). Involvement of pectin methyl-esterase during the ripening of grape berries: partial cDNA isolation, transcript expression and changes in the degree of methyl-esterification of cell wall pectins. *Phytochemistry* 58:693-701.
- [53] Lee S., Cheng H., King K. E., Wang W., He Y., Hussain A., Lo J., Harberd N. P., y Peng J. (2002). Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via *RGL2*, a *GAI/RGA*-like gene whose expression is up-regulated following imbibitions. *Genes Dev.* 2002 March 1; 16(5): 646–658.
- [54] Hartweck LM, Scott CL, Olszewski NE (2002). Two *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase genes of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh, *Genetics* 161: 1279–1291.
- [55] Silverstone AL, Jung H-S, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y, Sun T-p (2001). Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13 1555–1566.
- [56] King K, Moritz T, Harberd N (2001). Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of GAI and RGA. *Genetics* 159:767–776.
- [57] Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Sakamoto T, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Sazuka T, Ashikari M, Matsuoka M (2006). The rice SPINDLY gene functions as a negative regulator of gibberellin signaling by controlling the suppressive function of the DELLA protein, SLR1, and modulating brassinosteroid synthesis. *Plant J* 48:390-402.
- [58] Dokoozlian N (2001) CPPU: A potential new plant growth regulator for California table grapes. En: Extension UoCC (Ed) Grape Notes, Tulare Country. California, USA.
- [59] Casanueva, X., González-Agüero, M., Aliaga, R., Aravena, A., Hinrichsen, P. (2009) Identification of genes related to ovule development in stenospermocarpic table grape (*Vitis vinifera* L.). En IV Reunión de biología vegetal, 14 al 16 de Octubre de 2009, La Serena, Chile.
- [60] Coombe, B. (1976). The development of fleshy fruits. *Ann. Rev. Plant Physiology.* 27: 207-228.

- [61] Dry P., Coombe (1995) Grapevine growth stages- the modified E-L system. *Viticulture* 1, Resources 2nd Edition 2004.
- [62] Genoscope, Grape Genome Browser Genoscope [En línea] <<http://www.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>> [consultado ultima vez 9 de Noviembre de 2009]
- [63] DIM, Centro de Modelamiento Matemático del Departamento de Ingeniera Matemática de la Universidad de Chile [En línea] <<http://genomicavitis.dim.uchile.cl>> [consultado ultima vez 11 de Noviembre de 2009]
- [64] NCBI, National Center of Biotechnology Information [En línea] <www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> [consultado ultima vez 11 de Noviembre de 2009]
- [65] VvGDB, *Vitis vinifera* Genome Data Base [En línea] <<http://www.plantgdb.org/VvGDB>> [consultado ultima vez 11 de Noviembre de 2009]
- [66] González-Agüero, M., Troncoso, S., Gudenschwager, O., Campos-Vargas, R., Moya-León, M.A., Defilippi, B.G. (2009). Differential expression levels of aroma biosynthetic genes during ripening of apricot (*Prunus armeniaca* L.). *J. Plant Physiol. Biochem.* 47: 435-440.
- [67] Howe K.L., Chothia T. y Durbin R. (2002). GAZE: a generic framework for the integration of gene prediction data by dynamic programming. *Genome Research* 2002, vol. 12(9) pages 1418-1427. <http://www.sanger.ac.uk/Software/analysis/GAZE/>
- [68] Wolf Sebastian, Mouille Grégory y Pelloux Jérôme (2009). Homogalacturonan Methyl-Esterification and Plant Development *Molecular Plant* 2009 2(5):851-860
- [69] Raiola A., Camardella L., Giovane A., Mattei B., De Lorenzo G., Cervone F., Bellincampi D. (2004). Two *Arabidopsis thaliana* genes encode functional pectin methylesterase inhibitors1 *FEBS Letters*, Volume 557, Issue 1, Pages 199-203
- [70] Derbyshire, P., McCann, M.C., y Roberts, K. (2007). Restricted cell elongation in *Arabidopsis hypocotyls* is associated with a reduced average pectin esterification level. *BMC Plant Biol.* 17, 31.
- [71] Hothorn M, Wolf S, Aloy P, Greiner S, Scheffzek K. (2004). Structural insights into the target specificity of plant invertase and pectin methylesterase inhibitory proteins. *Plant Cell.* 2004 Dec; 16(12):3437-47. Epub 2004 Nov 4.
- [72] Olszewski N, Sun T-p, Gubler F (2002). Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell (Suppl)* 14 S61–S80.
- [73] Pelloux, J., Rusterucci, C., Mellerowicz, E.J. (2007). New insights into pectin methyl-esterase structure and function. *Trends Plant Sci.* 12, 267–277.
- [74] Baum, D. (2008). Trait evolution on a phylogenetic tree: Relatedness, similarity, and the myth of evolutionary advancement. *Nature Education* 1(1).
- [75] Info Jardin, [en línea] <<http://www.infojardin.com/>> [revisado el 20 de Noviembre de 2009].

- [76] Parre, E., Geitmann, A. (2005). Pectin and the role of the physical properties of the cell-wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*. *Planta*. 220, 582–592.
- [77] Jarvis, M., Goldberg, R., Morvan C. y Jauneau, A. (1996). Methyl-esterification, deesterification and gelation of pectins in the primary cell wall. J. Visser & A.F.G. Voragen (Eds) *Pectins and Pectinases*, Elsevier, Amsterdam, pp. 151-172.
- [78] Bonghi C, Pagni S, Vidrih R, Ramina A, Tonutti P. (1996). Cell Wall Hydrolases and Amylase in Kiwifruit Softening. *Postharvest Biol and Tech*. 1996;9: 19-29.
- [79] Chomczynski P & Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*. 162:156-9, 1987.
- [80] Goldberg, R., Pierron, M., Bordenave, M., Breton, C., Morvan, C. & du Penhoat, C.H. (2001). Control of Mung bean pectinmethylesterase isoform activities. Influence of pH and carboxyl group distribution along the pectic chains. *J Biol Chem*, 276, pp. 8841-8847.
- [81] Hothorn, M., D'Angelo, I., Marquez, J. A., Greiner, S. & Scheffzek, K. (2004). The invertase inhibitor Nt-CIF from tobacco: a highly thermostable four-helix bundle with an unusual N-terminal extension. *J Mol Biol*, 335, pp. 987-995.
- [82] PPDB Plant promoter database 2.0 [En línea] <<http://ppdb.gene.nagoya-u.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>> [consultado ultima vez 19 de Noviembre de 2009].
- [83] Jacobsen, S.E., Olszewski, N.E. (1993). Mutations at the *SPINDLY* locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell* 5: 887–896
- [84] Aron L. Silverstone, Tong-Seung Tseng, Stephen M. Swain, Alyssa Dill, Sun Yong Jeong, Neil E. Olszewski, y Tai-ping Sun (2007) Functional Analysis of SPINDLY in Gibberellin Signaling in *Arabidopsis* *Plant Physiol*. 2007 February; 143(2): 987–1000.
- [85] Sothern Robert B Tseng. *et al*; (2002) Gigantea and spindly genes linked to the clock pathway that controls circadian characteristics of transpiration in *Arabidopsis*. *Chronobiology International: The Journal of Biological and Medical Rhythm Research*, 1525-6073, Volume 19, Issue 6, 2002: 1005 – 1022
- [86] Greenboim-Wainberg, *et al*; (2005). Cross talk between gibberellin and cytokinin: The *Arabidopsis* GA response inhibitor SPINDLY plays a positive role in cytokinin signaling. *Plant Cell* 17: 92–102.
- [87] Peng, J. Harberd, N.P. (2002). The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 376–381.
- [88] Casanueva X (2009b). Dato obtenido por entrevista personal oral Datos no publicados. INIA
- [89] Quintana José, (2002). Caracterización fenológica de 46 cultivares de uva para mesa en el secano interior, provincia de Cauquenes. Trabajo para optar al título de Ingeniero agrónomo, U de Talca, Chile
- [90] Silley, P. 1986 The effect of plant alkaloids on in vitro rumen microbial fermentation. *Journal of Applied Bacteriology*, 60, 45–49.

ANEXOS.

Anexo A: Mapeo funcional de genes candidatos en vid, relacionados con apirenia y tamaño de baya.

Tabla A-1: Resumen de los genes candidatos que explicarían en mayor porcentaje los caracteres de peso fresco de semilla y peso de baya.

Carácter	Mapa	Chr	Gen Candidato	% Varianza explicada por el gen
PFS	Integrado	2	<i>VvPMEI2</i>	11,2
		18	<i>VvAGL11</i>	74,8
PB	Integrado	2	<i>VvPMEI2</i>	19,0
		8	<i>VvSPY</i>	12,9
		18	<i>VvAGL11</i>	29,9

Resultados no publicados

Mejía 2007

Realizado sobre 117 segregantes obtenidos a partir de un cruzamiento entre Thompson y Ruby Seedless, utilizando 195 marcadores

PFS= Peso fresco de semilla

PB= Peso de Baya

Chr= Cromosoma

VvPMEI2 Inhibidor de Pectinmetilesterasa

VvSPY Spindly

VvAGL11 Agamous 11 MADS box like

Anexo B: Posición de los QTLs en el mapa consenso en cromosomas 2 y 8.

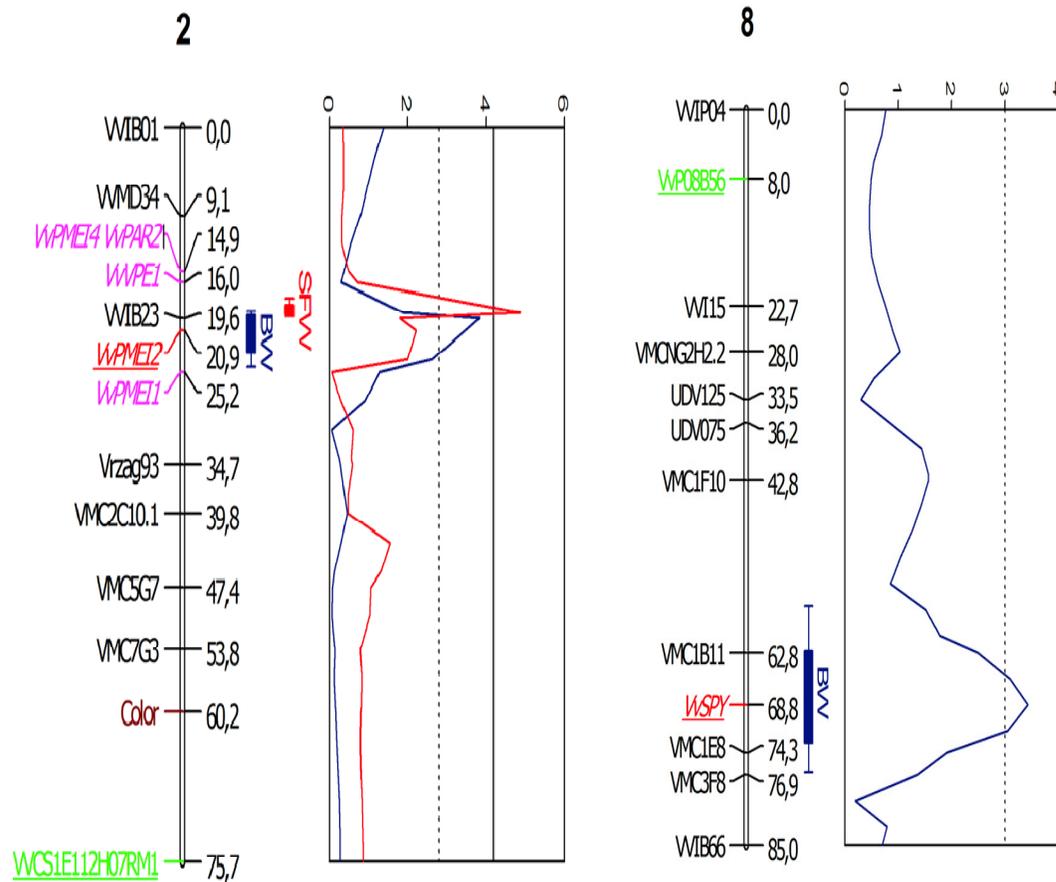


Figura A-1: Posición de los QTLs para peso fresco de semillas (SFW) y peso de baya (BW) en el mapa consenso de Ruby Seedless x Thompson Seedless. El mapa de ligamiento muestra los SSRs de mapas de referencia escritos en color negro; los SSRs desarrollados en este experimento subrayados y en color verde; con caracteres rosados y en itálica los Genes Candidatos (GCs). Los Genes Candidatos Posicionales están en rojo, subrayados y en negrita. Los intervalos de confianza de los QTLs, definidos en base a intervalos de soporte de 1 y 2 LOD, están indicados como cajas rectangulares a la derecha de los grupos de ligamiento. El perfil de LOD de los QTLs está representado por líneas rojas para QTLs del peso fresco de las semillas (SFW) y líneas azules para QTLs del peso de la baya (BW). Las líneas negras verticales dentro del gráfico de perfil de LOD corresponden al valor de LOD umbral, que definen QTLs significantes (líneas continuas) o QTLs sugestivos (líneas punteadas) en base a la prueba de permutaciones^[27].

Anexo C: Estados fenológicos según Baggiolini.

 A Yema de Invierno	 B Yema de Algodón	 C Punta Verde	 D Salida de Hojas
 E Hojas Extendidas	 F Racimos Visibles	 G Racimos Separados	 H Botones Florales Separados
 I Floración	 J Cuajado	 K Grano Tamaño Guisante	 L Racimo Cernido
 M Envero	 N Maduración	 O <u>Angostamiento</u>	 P Caída de hojas

Figura A-2: Esquema de los estados fenológicos de Baggiolini (A-P)

Los estados fenológicos de Baggiolini, son 16 estados de desarrollo de la vid (A-P), y que inician su ciclo de desarrollo durante la formación de yema en pleno invierno y culmina un poco antes con la pérdida total de hojas del parrón. Estos estados representan cambios a nivel de fenotipo que son fácilmente diferenciables en el desarrollo de la vid, pero que no corresponden a etapas cronológicas.

Anexo D: Desarrollo de la baya según estados fenológicos de Baggioini, en etapas en estudio.

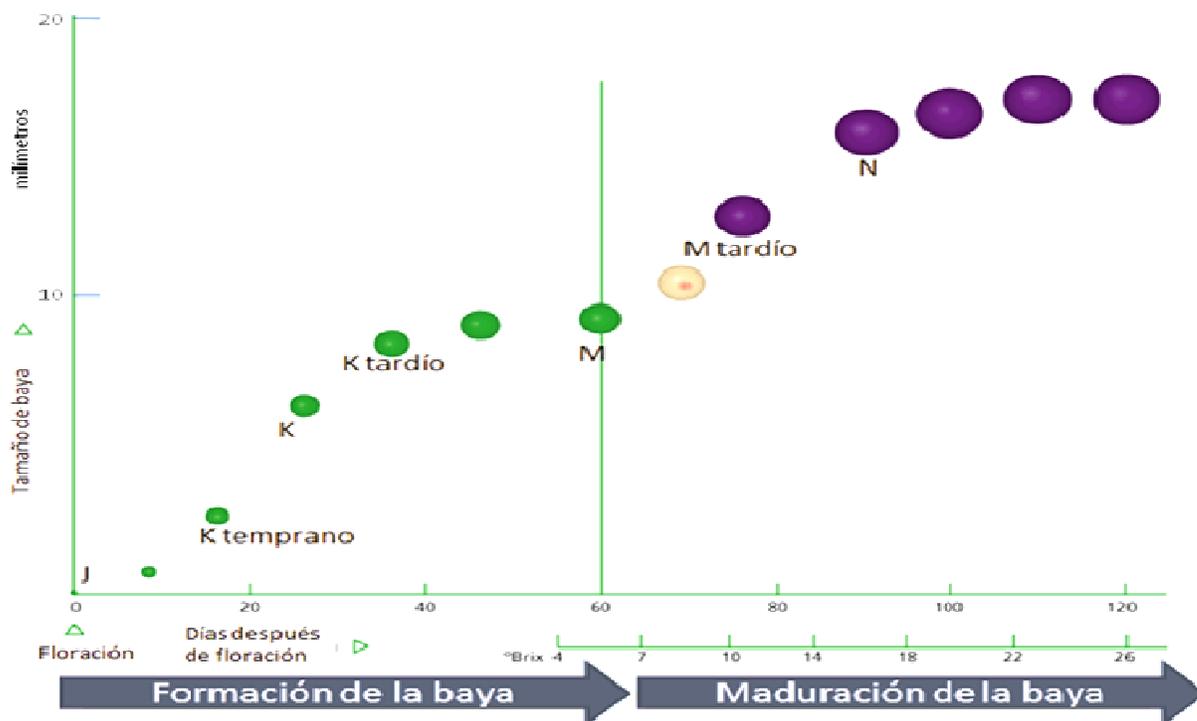


Figura A-3.1: Desarrollo del carácter tamaño de baya a partir del estado de floración: Durante ésta etapa se detectan dos periodos que destacan en el desarrollo de la baya, estos son: por un lado la formación de la baya (desarrollo por crecimiento) y por otra parte la maduración de esta (Crecimiento por elongación). Por otra parte, solo un par días antes del estado M (envero) empieza una generación importante de azúcares lo que se ve reflejada en el aumento de los °Brix.

Esta es una imagen ilustrativa por ende los tiempos de duración de cada estadio, el tamaño de baya y los grados brix varían dependiendo de la especie y condiciones agro-ecológicas de cultivo

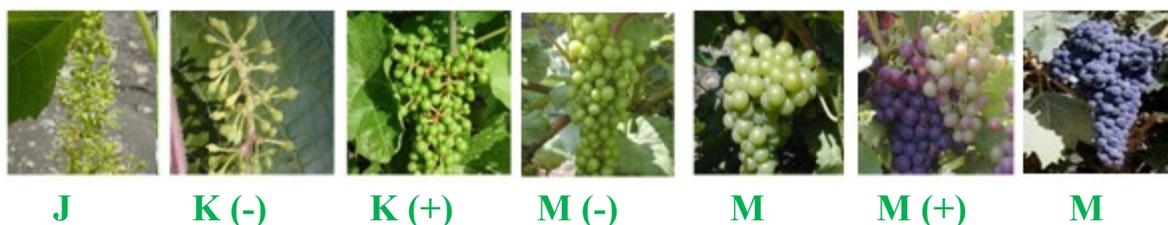
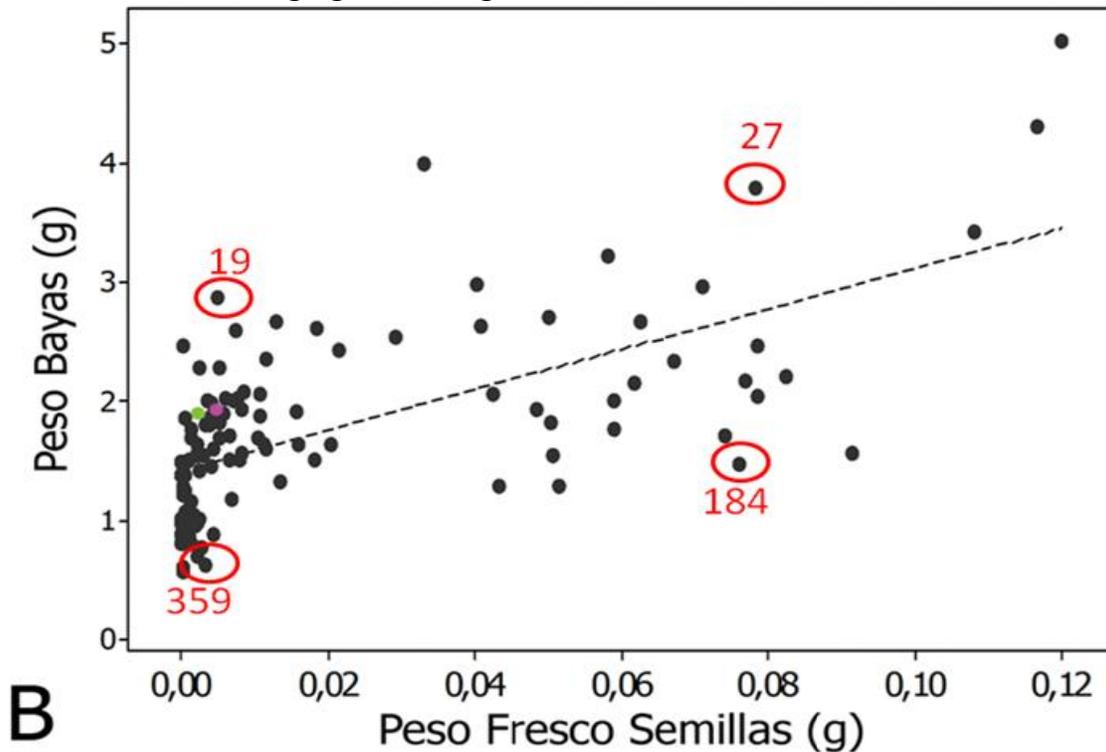


Figura A-3.2: Vista en el parrón de cada uno de los siete estadios en estudio para una cepa tinte de vid

Tabla A-2 Estados fenológicos de vid ocupados para el estudio, y su abreviatura

Abrev.	Estado	Observación
J	J	(Flor)
K (-)	K Temprana	(Cuaja/Baya 2-4 mm diámetro)
K (+)	K Tardía	(Baya 8-10 mm diámetro)
M (-)	M Temprana	(Apriete Racimo/15 días antes de envero)
M	M	(Envero/Pinta)
M (+)	M Tardía	(15 días post-envero)
N	N	(30 días post-envero)

Anexo E: Individuos segregantes escogidos como contrastantes.



B Gráfico A-1: Distribución de la población de segregantes según las coordenadas de peso fresco de semilla versus peso de bayas: en la gráfica se presentan dentro de las circunferencias rojas a los 4 segregantes contrastantes escogidos principalmente bajo criterios de representación del carácter fenotípico entre temporadas, los puntos en verde y morado representan a los parentales Thompson y Ruby Seedless respectivamente. (Gráfica corresponde a periodo 2007-2008)

Tabla A-3: Resumen de los fenotipos contrastantes

Segregante	Fenotipo	
	Baya	Semilla
27	Grande	Grande
19	Grande	Chica
184	Chica	Grande
359	Chica	Chica



Figura A-4: Fotografía de los fenotipos contrastantes seleccionados

Gráfica y fotos: Casanueva 2009, sin publicar

Anexo F: Número de moléculas de mRNA en cada segregante para cada uno de los estadios.

Tabla A-4: Numero de moléculas por µl de mRNA para DAP (agregado de manera exógena) Actina y el factor de elongación I alfa, en duplicado. (En la nomenclatura del gen primero se enuncia el segregante y tras guion el estadio de desarrollo fenológico EJ.: 19-K (-) implica que es segregante 19 en estadio K temprano)

GEN	DAP-1	DAP-2	ACT-1	ACT-2	EF1 1	EF1 2
R-J	6,13E+07	4,13E+06	2,98E+04	5,62E+04	4,10E+04	5,07E+04
TS-J	2,76E+07	5,75E+07	1,79E+04	2,43E+04	1,35E+04	2,15E+04
19-J	3,96E+07	1,67E+07	1,83E+05	2,49E+05	2,70E+05	4,70E+05
27-J	1,34E+07	1,08E+07	1,79E+04	4,80E+03	1,36E+04	3,99E+04
184-J	1,49E+07	1,39E+07	1,26E+04	1,75E+04	2,33E+04	4,25E+04
359-J	1,80E+07	1,83E+07	2,80E+04	4,14E+03	1,50E+04	2,46E+04
R-K (-)	2,82E+08	5,66E+07	4,86E+06	5,90E+06	5,95E+06	3,72E+06
TS-K (-)	9,20E+07	2,23E+07	2,66E+06	5,60E+06	3,42E+06	2,02E+06
19-K (-)	9,70E+07	1,79E+07	4,57E+07	8,15E+07	3,34E+07	1,93E+07
27-K (-)	2,34E+07	2,74E+07	1,96E+03	5,51E+03	2,34E+04	4,18E+03
184-K (-)	7,33E+07	2,45E+07	8,00E+04	1,67E+05	8,52E+04	4,42E+04
359-K (-)	7,34E+07	2,24E+07	1,66E+06	3,08E+06	8,73E+05	1,73E+06
R-K (+)	1,16E+08	4,80E+07	1,09E+07	1,47E+07	1,77E+06	2,50E+06
TS-K (+)	8,81E+07	1,50E+08	2,78E+03	1,25E+04	5,48E+03	8,12E+03
19-K (+)	6,04E+07	2,96E+07	6,89E+05	1,21E+06	3,29E+05	6,15E+05
27-K (+)	2,35E+08	1,04E+08	5,66E+06	4,47E+06	1,64E+06	2,12E+06
184-K (+)	7,95E+07	5,40E+07	1,24E+07	3,57E+06	4,87E+06	4,20E+06
359-K (+)	1,79E+07	2,37E+07	1,83E+03	1,98E+05	3,35E+06	4,39E+06
R-M (-)	4,91E+07	3,61E+07	1,08E+06	6,83E+04	4,96E+04	1,09E+05
TS-M (-)	3,61E+07	1,56E+07	1,78E+05	1,60E+05	1,59E+05	1,69E+05
19-M (-)	1,03E+08	2,54E+07	3,08E+05	1,50E+05	5,22E+04	6,14E+04
27-M (-)	6,92E+07	8,60E+07	2,47E+07	7,51E+06	3,88E+06	2,97E+06
184-M (-)	3,32E+07	2,58E+08	6,46E+06	2,59E+06	1,28E+06	1,99E+06
359-M (-)	1,02E+08	1,33E+08	1,54E+07	3,53E+06	3,53E+06	3,42E+06
R-M	2,02E+07	8,26E+07	2,38E+06	9,76E+06	5,62E+04	1,13E+05
TS-M	4,60E+07	1,79E+08	1,17E+07	3,88E+06	1,22E+06	3,17E+06
19-M	9,51E+07	1,50E+08	2,45E+07	5,69E+06	3,20E+06	5,08E+06
27-M	4,93E+07	4,33E+07	3,65E+06	1,13E+06	9,49E+05	1,40E+06
184-M	1,66E+08	9,20E+07	5,27E+06	1,28E+06	2,57E+06	2,68E+06
359-M	5,27E+07	4,89E+07	3,14E+06	8,51E+05	7,69E+05	8,47E+05
R-M (+)	3,53E+07	1,06E+08	2,07E+07	9,51E+06	8,58E+05	1,52E+06
TS-M (+)	3,97E+07	3,93E+07	9,24E+06	3,87E+06	1,76E+06	1,64E+06
19-M (+)	4,38E+07	3,29E+07	7,87E+05	3,57E+05	6,69E+05	1,27E+06
27-M (+)	5,95E+07	1,01E+08	1,49E+06	6,03E+05	1,15E+06	1,73E+06
184-M (+)	6,52E+07	9,61E+07	5,58E+06	2,47E+06	1,16E+06	1,87E+06
359-M (+)	3,12E+07	5,93E+07	3,99E+06	2,14E+06	1,40E+06	1,84E+06
R-N	3,95E+07	1,78E+08	1,23E+07	6,83E+06	2,61E+03	8,29E+05
TS-N	5,37E+07	7,53E+07	6,11E+06	3,80E+06	7,47E+05	6,76E+05
19-N	7,28E+07	1,40E+08	5,37E+06	4,26E+06	6,57E+05	1,43E+06
27-N	1,01E+08	2,04E+08	1,09E+07	1,44E+07	1,43E+06	2,31E+06
184-N	4,57E+07	6,66E+07	3,79E+06	5,14E+06	7,09E+05	9,38E+05
359-N	1,10E+08	1,57E+08	2,22E+07	3,22E+07	5,99E+06	7,77E+06

(R=Ruby, TS=Sultanina)

Tabla A-4 Cont.: Numero de moléculas de mRNA para los diferentes transcritos de *VvSPY* (se conserva nomenclatura pagina 78)

	SPYa-1	SPYa-2	SPYb-1	SPYb-2	SPYc-1	SPYc-2
R-J	1,60E+04	6,00E+03	1,51E+05	1,19E+05	6,07E+05	1,24E+04
TS-J	1,75E+04	7,63E+03	1,67E+05	1,61E+05	6,99E+05	1,46E+04
19-J	1,56E+04	5,99E+03	1,57E+05	1,56E+05	5,76E+05	2,60E+04
27-J	1,62E+04	6,37E+03	1,63E+05	1,66E+05	8,69E+05	1,40E+04
184-J	1,63E+04	7,44E+03	1,61E+05	1,86E+05	6,75E+05	1,67E+04
359-J	1,67E+04	7,42E+03	1,69E+05	1,64E+05	8,05E+05	1,40E+04
R-K (-)	4,87E+04	4,70E+04	8,05E+04	1,90E+05	4,05E+05	9,24E+04
TS-K (-)	2,68E+04	1,10E+04	5,31E+04	1,98E+05	8,83E+05	5,80E+04
19-K (-)	5,18E+04	2,67E+04	7,82E+04	1,76E+05	8,56E+05	6,56E+04
27-K (-)	1,67E+04	8,67E+03	5,42E+04	1,65E+05	9,15E+05	1,35E+04
184-K (-)	1,65E+04	8,82E+03	3,69E+04	1,71E+05	1,02E+06	1,75E+04
359-K (-)	2,61E+04	9,73E+03	7,29E+04	1,99E+05	8,70E+05	4,19E+04
R-K (+)	1,43E+05	5,70E+04	6,76E+04	1,74E+05	1,14E+06	5,50E+04
TS-K (+)	1,71E+04	7,29E+03	8,11E+04	1,60E+05	9,25E+05	1,62E+04
19-K (+)	1,99E+04	4,66E+03	3,95E+04	1,91E+05	9,41E+05	2,23E+04
27-K (+)	3,06E+04	1,54E+04	4,28E+04	2,76E+05	9,81E+05	5,06E+04
184-K (+)	1,26E+05	3,63E+04	5,62E+04	1,86E+05	1,05E+06	1,19E+05
359-K (+)	8,92E+04	3,83E+04	1,48E+05	2,51E+05	1,09E+06	1,51E+05
R-M (-)	2,42E+05	8,94E+04	9,09E+04	1,70E+05	9,48E+05	1,99E+04
TS-M (-)	2,03E+04	7,83E+03	9,97E+04	2,19E+05	9,33E+05	1,96E+04
19-M (-)	1,93E+04	4,66E+03	6,49E+04	1,71E+05	9,61E+05	1,70E+04
27-M (-)	9,15E+04	4,66E+03	9,13E+04	1,92E+05	1,14E+06	1,61E+05
184-M (-)	2,76E+04	2,67E+04	4,42E+04	1,40E+05	9,59E+05	6,55E+04
359-M (-)	5,59E+04	1,69E+04	6,83E+04	1,60E+05	9,81E+05	1,25E+05
R-M	2,59E+04	3,09E+04	1,10E+05	1,36E+05	2,58E+04	1,94E+04
TS-M	1,71E+04	1,28E+04	1,89E+05	1,80E+05	2,23E+05	1,11E+05
19-M	1,54E+04	1,03E+04	1,69E+05	1,78E+05	1,74E+05	1,41E+05
27-M	8,33E+03	4,78E+03	1,69E+05	1,63E+05	1,27E+05	5,62E+04
184-M	6,20E+04	6,59E+04	3,59E+05	3,22E+05	4,79E+05	2,20E+05
359-M	6,99E+03	5,53E+03	1,94E+05	2,41E+05	6,22E+04	4,46E+04
R-M (+)	9,79E+04	1,36E+05	1,83E+05	2,00E+05	1,30E+05	6,41E+04
TS-M (+)	2,93E+04	2,49E+04	2,79E+05	2,37E+05	1,49E+05	9,84E+04
19-M (+)	7,97E+03	1,02E+04	2,05E+05	2,29E+05	1,20E+05	6,44E+04
27-M (+)	7,20E+03	1,03E+04	3,66E+05	1,85E+05	8,22E+04	4,54E+04
184-M (+)	2,27E+04	2,55E+04	1,96E+05	2,24E+05	1,69E+05	8,74E+04
359-M (+)	1,18E+04	4,66E+03	3,51E+05	2,84E+05	1,24E+05	6,53E+04
R-N	2,92E+04	5,75E+04	1,73E+05	2,05E+05	1,08E+05	5,26E+04
TS-N	8,69E+03	1,90E+04	1,61E+05	1,94E+05	1,14E+05	5,88E+04
19-N	9,64E+03	1,98E+04	1,79E+05	1,85E+05	1,09E+05	5,09E+04
27-N	5,46E+04	4,25E+04	2,43E+05	2,36E+05	1,22E+05	1,01E+05
184-N	9,63E+03	1,70E+04	1,70E+05	1,84E+05	1,02E+05	4,19E+04
359-N	7,30E+04	1,59E+05	3,83E+05	3,50E+05	5,46E+05	2,63E+05

(R=Ruby, TS=Sultanina)

Tabla A-4 Cont.: Numero de moléculas de mRNA para los diferentes trascritos de *VvPMEI* (se conserva nomenclatura pagina 78)

	PMEI1-1	PMEI1-2	PMEI2-1	PMEI2-2	PMEI4-1	PMEI4-2
R-J	4,93E+04	1,29E+04	1,64E+04	2,62E+05	4,33E+02	5,77E+03
TS-J	6,88E+04	7,85E+04	2,14E+04	6,61E+04	2,93E+02	6,18E+03
19-J	5,20E+04	5,17E+04	2,28E+05	8,70E+04	9,66E+02	1,46E+04
27-J	6,46E+04	1,96E+04	2,38E+04	4,15E+05	2,09E+02	4,88E+03
184-J	5,52E+04	1,79E+04	2,99E+04	5,27E+03	2,93E+02	5,97E+03
359-J	5,19E+04	2,29E+04	3,67E+04	5,77E+03	2,18E+03	5,09E+03
R-K (-)	9,99E+05	6,02E+05	1,15E+06	1,00E+04	3,84E+04	3,40E+04
TS-K (-)	3,23E+06	1,07E+05	2,05E+05	2,07E+04	8,26E+03	1,73E+04
19-K (-)	8,25E+06	2,27E+05	4,73E+06	4,74E+03	6,48E+03	2,42E+04
27-K (-)	6,31E+06	1,42E+05	4,80E+03	4,37E+05	6,19E+03	4,83E+03
184-K (-)	4,29E+06	1,47E+05	2,85E+04	6,32E+03	6,05E+03	5,86E+03
359-K (-)	2,13E+06	1,48E+05	9,76E+04	3,22E+04	6,85E+03	1,05E+04
R-K (+)	1,24E+07	1,28E+06	1,45E+06	4,56E+04	5,78E+04	1,52E+05
TS-K (+)	4,04E+04	1,16E+05	1,55E+04	1,03E+04	6,31E+03	4,90E+03
19-K (+)	4,49E+06	1,69E+05	5,77E+04	9,62E+03	5,49E+03	5,56E+03
27-K (+)	8,08E+06	2,44E+05	1,39E+05	7,72E+05	5,86E+03	6,16E+03
184-K (+)	7,63E+06	1,71E+05	2,47E+05	6,25E+03	6,40E+03	1,22E+04
359-K (+)	8,59E+06	1,70E+05	1,99E+05	5,07E+03	6,25E+03	1,49E+04
R-M (-)	1,03E+07	1,36E+06	1,56E+06	6,52E+03	7,51E+04	2,43E+05
TS-M (-)	8,45E+06	1,54E+05	1,26E+04	1,75E+04	5,44E+03	6,22E+03
19-M (-)	8,46E+06	1,53E+05	1,47E+04	8,80E+04	6,23E+03	1,05E+04
27-M (-)	2,31E+05	1,96E+06	3,93E+04	6,30E+03	1,72E+04	8,74E+03
184-M (-)	8,51E+06	7,86E+04	1,98E+05	6,42E+03	5,26E+03	7,43E+03
359-M (-)	8,26E+06	9,72E+04	1,67E+05	1,02E+05	5,48E+03	8,06E+03
R-M	1,02E+07	8,88E+05	1,01E+06	4,51E+03	4,45E+04	2,69E+05
TS-M	5,84E+04	8,41E+04	1,67E+04	8,23E+03	1,20E+03	8,51E+03
19-M	9,43E+04	9,76E+04	2,62E+04	4,27E+03	5,52E+03	1,93E+04
27-M	2,18E+05	9,48E+04	9,07E+03	9,41E+05	2,79E+03	6,37E+04
184-M	4,86E+05	2,95E+05	3,35E+04	2,52E+05	2,72E+04	3,00E+05
359-M	8,55E+04	1,31E+05	3,07E+04	4,05E+06	3,09E+04	2,22E+05
R-M (+)	9,50E+05	7,51E+05	5,99E+05	3,71E+03	3,93E+04	3,85E+05
TS-M (+)	5,76E+04	1,28E+05	2,01E+04	2,10E+04	2,16E+03	1,21E+04
19-M (+)	1,96E+05	1,65E+05	5,08E+04	1,22E+05	2,36E+03	1,63E+04
27-M (+)	4,99E+04	8,98E+04	8,22E+04	1,07E+06	1,68E+03	1,26E+04
184-M (+)	9,18E+04	1,47E+05	3,33E+04	1,47E+04	2,19E+03	1,60E+04
359-M (+)	6,81E+04	1,24E+05	4,69E+04	4,90E+04	1,14E+03	7,02E+03
R-N	1,93E+06	1,52E+06	1,28E+06	1,20E+05	3,07E+04	4,64E+05
TS-N	9,56E+04	9,88E+04	1,51E+04	2,52E+05	1,26E+03	1,13E+04
19-N	8,45E+04	9,63E+04	1,46E+04	1,75E+05	6,69E+03	4,23E+04
27-N	4,34E+04	9,47E+04	2,92E+04	1,09E+06	7,39E+03	5,41E+04
184-N	1,85E+05	1,45E+05	3,98E+04	9,29E+03	2,43E+03	1,82E+04
359-N	2,38E+05	1,77E+05	4,21E+04	6,32E+03	1,99E+03	9,06E+04

(R=Ruby, TS=Sultanina)

Anexo G: Resultado de la espectrofotometría de la purificación de mRNA

Tabla A-5: Absorbancias medidas para muestras de mRNA purificado de cada segregante (en cada estadio en estudio): Además de su respectiva conversión a unidades densidad ópticas (OD₂₆₀), la concentración obtenida posterior a la purificación y la cantidad a ocupar en microlitros para la posterior síntesis de cDNA

Segregante	ABS a 260nm	OD	Concentración µg/µl	µl a ocupar en amplificación de cDNA
TS-J	0,01	5	0,2	10,0
R-J	0,011	5,5	0,22	9,1
19-J	0,019	9,5	0,38	5,3
27-J	0,015	7,5	0,3	6,7
184-J	0,011	5,5	0,22	9,1
359-J	0,012	6	0,24	8,3
TS-K (-)	0,014	7	0,28	7,1
R-K (-)	0,011	5,5	0,22	9,1
19-K (-)	0,012	6	0,24	8,3
27-K (-)	0,019	9,5	0,38	5,3
184-K (-)	0,007	3,5	0,14	14,3
359-K (-)	0,009	4,5	0,18	11,1
TS-K (+)	0,004	2	0,08	25,0
R -K (+)	0,008	4	0,16	12,5
19 -K (+)	0,007	3,5	0,14	14,3
27 -K (+)	0,011	5,5	0,22	9,1
184 -K (+)	0,013	6,5	0,26	7,7
359 -K (+)	0,012	6	0,24	8,3
TS -M (-)	0,003	1,5	0,06	33,3
R-M (-)	0,004	2	0,08	25,0
19-M (-)	0,007	3,5	0,14	14,3
27-M (-)	0,005	2,5	0,1	20,0
184-M (-)	0,004	2	0,08	25,0
359-M (-)	0,003	1,5	0,06	33,3
TS-M	0,007	3,5	0,14	14,3
R-M	0,005	2,5	0,1	20,0
19-M	0,006	3	0,12	16,7
27-M	0,017	8,5	0,34	5,9
184-M	0,008	4	0,16	12,5
359-M	0,005	2,5	0,1	20,0
TS -M (+)	0,004	2	0,08	25,0
R -M (+)	0,014	7	0,28	7,1
19 -M (+)	0,003	1,5	0,06	33,3
27 -M (+)	0,005	2,5	0,1	20,0
184 -M (+)	0,003	1,5	0,06	33,3
359 -M (+)	0,007	3,5	0,14	14,3
TS-N	0,002	1	0,04	50,0
R-N	0,003	1,5	0,06	33,3
19-N	0,002	1	0,04	50,0
27-N	0,002	1	0,04	50,0
184-N	0,003	1,5	0,06	33,3
359-N	0,002	1	0,04	50,0

Anexo H: Resultado de la espectrofotometría de la síntesis de cDNA

Tabla A-6: Absorbancias medidas para muestras de cDNA sintetizado para cada segregante (en cada estadio en estudio): además se presenta su respectiva conversión a unidades densidad ópticas (OD), la concentración obtenida posterior a la purificación y la cantidades de agua y cDNA a ocupar, en microlitros, para la realización del qPCR

Muestra	ABS a 260nm	OD	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	cDNA Dilución para qPCR	Agua Dilución para qPCR
TS-J	0,035	17,5	0,525	1,90	18,10
R-J	0,013	6,5	0,195	5,13	14,87
19-J	0,014	7	0,21	4,76	15,24
27-J	0,009	4,5	0,135	7,41	12,59
184-J	0,011	5,5	0,165	6,06	13,94
359-J	0,018	9	0,27	3,70	16,30
TS-K (-)	0,009	4,5	0,135	7,41	12,59
R-K (-)	0,008	4	0,12	8,33	11,67
19-K (-)	0,010	5	0,15	6,67	13,33
27-K (-)	0,031	15,5	0,465	2,15	17,85
184-K (-)	0,009	4,5	0,135	7,41	12,59
359-K (-)	0,003	1,5	0,045	22,22	-2,22
TS-K (+)	0,010	5	0,15	6,67	13,33
R -K (+)	0,047	23,5	0,705	1,42	18,58
19 -K (+)	0,008	4	0,12	8,33	11,67
27 -K (+)	0,014	7	0,21	4,76	15,24
184 -K (+)	0,015	7,5	0,225	4,44	15,56
359 -K (+)	0,098	49	1,47	0,68	19,32
TS -M (-)	0,043	21,5	0,645	1,55	18,45
R-M (-)	0,011	5,5	0,165	6,06	13,94
19-M (-)	0,037	18,5	0,555	1,80	18,20
27-M (-)	0,014	7	0,21	4,76	15,24
184-M (-)	0,014	7	0,21	4,76	15,24
359-M (-)	0,013	6,5	0,195	5,13	14,87
TS-M	0,019	9,5	0,285	3,51	16,49
R-M	0,008	4	0,12	8,33	11,67
19-M	0,014	7	0,21	4,76	15,24
27-M	0,044	22	0,66	1,52	18,48
184-M	0,048	24	0,72	1,39	18,61
359-M	0,026	13	0,39	2,56	17,44
TS -M (+)	0,010	5	0,15	6,67	13,33
R -M (+)	0,011	5,5	0,165	6,06	13,94
19 -M (+)	0,019	9,5	0,285	3,51	16,49
27 -M (+)	0,014	7	0,21	4,76	15,24
184 -M (+)	0,013	6,5	0,195	5,13	14,87
359 -M (+)	0,010	5	0,15	6,67	13,33
TS-N	0,010	5	0,15	6,67	13,33
R-N	0,014	7	0,21	4,76	15,24
19-N	0,012	6	0,18	5,56	14,44
27-N	0,013	6,5	0,195	5,13	14,87
184-N	0,014	7	0,21	4,76	15,24
359-N	0,017	8,5	0,255	3,92	16,08

Anexo I: Protocolo de Purificación de mRNA (Dynabeads)

Lavado de las Dynabeads

- 1) Calcular Y mediante regla de cuarta proporcional

$$75 \mu\text{g de RNA} \rightarrow 200 \mu\text{l de DB}$$

$$X \mu\text{g de RNA} \rightarrow Y \mu\text{l de DB}$$

X es conocido: son los μg de RNA total a purificar; **Z** es volumen total del RNA total a purificar.

Tomar **Y** ($\mu\text{g de RNA} * 200 / 75$) μl de DB de la solución de storage (resuspendido por pipeteo hasta visualizar una solución café) y ponerlos en tubo de 1,5 ml y luego insertar el tubo en el magneto por 2 minutos.

- 2) Remover el sobrenadante con pipeta manteniendo el tubo en magneto
- 3) Sacar el tubo del magneto y agregar **Y/2** μl de Binding Buffer y resuspender los Dynabeads, colocar el tubo en magneto por 2 minutos
- 4) Remover el sobrenadante con pipeta manteniendo el tubo en magneto
- 5) Resuspender los Dynabeads en **Y/2** μl de Binding Buffer

Purificación de mRNA

1.a) Si se tiene 75 o más μg de RNA total completar 100 μl agua DEPC o buffer Tris HCl 10 mM pH 7,5 añadir 100 μl Binding buffer

1.b) Si se tiene RNA total mas diluido que 75 μg en 100 μl , añadir igual volumen que el contiene el RNA (**Z**) de binding buffer (hibridación optima 1:1)

- 2) Calentar los **2Z** μl de RNA total a 65 °C por 2 min. (Para romper estructuras secundarias), colocar en hielo
- 3) Añadir los **2Z** de mezcla a los **Y/2** de Dynabeads lavadas.
- 4) Mezclar suavemente en vortex continuo por 5 minutos a T^a ambiente
- 5) Colocar la mezcla en el magneto por 2 minutos. Y remover el sobrenadante cuidadosamente contacto con el magneto.
- 6) Sacar el magneto y añadir **2Z** de Washing buffer, mezclar pipeteando con cuidado un par de veces Colocar la mezcla en el magneto por 2 minutos. Y remover el sobrenadante.
- 7) Repetir paso 6
- 8) Eluir en 13 μl de buffer TRIS HCl 10 mM pH 7.5 frío (resuspender), calentar a 75-80 °C por 2 minutos y colocar inmediatamente en el magneto, transferir rápidamente el mRNA eluido a un tubo de 0,5 μl para síntesis de cDNA

Protocolo de regeneración

(Para evitar contaminación cruzada de las muestras)

- 1.- Resuspender las Dynabeads utilizadas (volumen original “ξ”) en “ξ” μl de **Reconditioning Solution** y transferir la suspensión en un nuevo tubo libre de RNAsa.
- 2.- Incubar a 65 °C por 2 minutos.
- 3.- Colocar el tubo en el magneto y esperar 2 minutos y remover sobrenadante.
- 4.- Repetir los pasos 1 al 3 dos veces más (3 en total).
- 5.- Resuspender las Dynabeads en “ξ” μl de **Storage Buffer**.
- 6.- Colocar el tubo en el magneto y esperar 2 minutos y remover sobrenadante.
- 7.- Repetir los pasos 5-6 tres veces más (4 en total).
- 8.- Resuspender las Dynabeads en “ξ” μl de **Storage Buffer**, guardar hasta su uso a 4 °C.

Buffers

- **Reconditioning Solution**
NaOH 0.1 M
- **Storage Buffer**
Tris HCl 250 mM (pH 7.5)
EDTA 20 mM
Tween 20 0.1 %
NaN₃ 0.02 %
- **Binding Buffer**
Tris HCl 20 mM (pH 7.5)
LiCl 1 M
EDTA 2 mM
- **Washing Buffer**
Tris HCl 10 mM (pH 7.5)
LiCl 0.15 M
EDTA 1 mM
- **Tris HCl 10 mM (pH 7.5)**
Tris HCl 10 mM (pH 7.5)

Anexo J: Protocolo Hot Borate para la extracción de RNA

Día 1:

- 1) Encender baño termostático a 80 °C.
- 2) Hacer buffer de extracción (XT + PVP + DTT + NP-40 + antifoam A (opcional)).

Para 3 g de tejido: 15 ml buffer XT.
 150 µl DTT 1 M
 150 µl NP-40
 0.3 g PVP

Agregar a tubos Oak Ridge de 50 ml e incubar a 80 °C por 10 min.

- 3) Agregar el tejido molido en nitrógeno líquido junto al PVP al tubo con el buffer caliente.
- 4) Vórtex por 30 s.
- 5) Agregar 100 µl proteinasa K (20 mg/ml) e incubar con agitación a 42 °C por 90 min. (Cada 15 min agitar por inmersión suave).
- 6) Agregar 0.08 volúmenes (1.2 ml) de KCl 2 M revolviendo en hielo por durante 30 min.
- 7) Centrifugar a 12 K (12000 g) por 20 min a 4 °C. Recuperar el sobrenadante en otro tubo.
- 8) Agregar 1 volumen de LiCl 4 M, mezclar suavemente y dejar a 4 °C O.N. ó 2 hrs a -20 °C.

Día 2:

- 1) Centrifugar a 20000 g por 40 min a 4 °C. Descartar el sobrenadante.
- 2) Resuspender el pellet en 500 µl de agua estéril (DEPC) más 50 µl de acetato de sodio 3 M. Transferir a eppendorf de 2 ml.
- 3) Agregar 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico y hacer vórtex por 30 s.
- 4) Centrifugar 5 min a 14000 rpm a 4 °C. Recuperar el sobrenadante en otro tubo (tubo 1).
- 5) Añadir 400 µl de agua (DEPC) al extracto de cloroformo. Vórtex por 30 s. Centrifugar a 14000 rpm por 5 min a 4 °C.
- 6) Recuperar el sobrenadante y juntarlo al tubo 1. (1er sobrenadante).
Agregar 30 µl de acetato de sodio.
- 7) Añadir un volumen de isopropanol, mezclar suavemente por inmersión e incubar en hielo por 1 hora.
- 8) Centrifugar 14000 rpm por 30-40 min a 4 °C. Debe verse pellet.
- 9) Lavar cuidadosamente el pellet con 400 µL de EtOH 80% DEPC. Centrifugar 10 min. Eliminar el exceso de etanol con una jeringa de 1 ml, secar en estufa el tubo abierto por 5 minutos. Resuspender el pellet en 30 µL de agua DEPC.

Reactivos:

0.2 M Na borate decahydrate (Borax, FW 381,4)

30mM EGTA (FW 380.4)

1% (w/v) SDS

1% deoxycholate, sodium salt

1% Nonidet P-40 (Igepal)

2% (w/V) PVP

0,1 (v/v) antifoam A (opcional)

Para disolver, agregue los componentes en agua DEPC precalentada. Ajustar a pH 9,0 con NaOH 5M. Autoclavar.

El DTT, NP-40, PVP y antifoam se agregan solo inmediatamente antes de usar el buffer.

- Proteinasa K: 20 mg/ml en agua DEPC. Almacenar a -20°C .
- KCL 2 M
- LiCl 4 M
- Acetato de Sodio 3 M (CH_3COONa)
- Cloroformo/Alcohol isoamílico (1:1)
- Isopropanol
- EtOH 80 DEPC.

Anexo K: Síntesis de cDNA. Enzima MMLV-RT (Promega)

1. Cuantificar el volumen necesario para 2 µg. de RNA total.
2. A cada RNA a utilizar agregar:

X µl. de RNA
1 µl. de OligodT (Promega)
1 µl. de mRNA *DAP*
Y µl. de dH₂O RNAsa free
15 µl. totales

3. Denaturar 5 minutos a 70 °C, luego rápidamente incubar 1 minuto en hielo.
4. Agregar a cada reacción de síntesis lo siguiente (se sugiere preparar un Mix cuando se realiza la síntesis de 2 o mas cDNAs):

5 µl. de Buffer MMLV-RT 5x
1,5 µl. de dNTP's 10 µM. c/u
1,0 µl. de Enzima MMLV-RT
2,5 µl. de dH₂O RNAsa free
10 µl. a c/u

5. Incubar la reacción a 42 °C por 90 minutos y luego a 70 °C por 15 minutos.
6. Cuantificar el cDNA sintetizar y almacenar a -20°C.

Anexo L: *Secuencias fasta de genes candidatos*

> Virtual cDNA sequence PME1-2(479 pb)

```
AAGCATAGTTGTTGATGAGAGCCAAGGCAACGCTAGTCATTTGTGCAACATGAAGAATGTAGCCCCTGACTATAGTTCCCATTCA
TGGCTCTCCAGCAAACCCATCCGTGCAGGTTTCTCATCTGTTAAGGCTGCACTCACCCATGTTTGAATATTACCCATTGAAA
CTCAAATCGGGCCCTCCAGCATGACCCATCTCCCTATGGACTTGTGAAGCTCATCAACTGAGTCTGCCACCTCCTCGACACAG
TCTATCATGGCACTAGCCTCTCTGGGTTTCAAGCCATGGGTTTTGACAGCTGTTTCATCGATACCAACGTTGATCTAGCTGAAG
AACTGGCCACGGAGAGGGCAGTGGTGGCTAGCCGTTTGGGGCTGGTTTTGGATTTTGTGGCATAAATTGAAAGGGAGTCGTAGCA
GAGATGAGGATATGTTGTGGCAAGGCATGATGTTTTATGTAGTCCGTGTTGGT
```

> Virtual cDNA sequence SPY (2763 pb)

```
ATGGCATGGACGGAGAAAAGAGGTTGGTAATGGGAGAGACAGGGAACCAGTTGGAGGTAATGGTTTTCTCGAAAGTTTTCT
CAGACTTCTTCTAGTACTAGTTCTACCTCACCTGGATGCTTACCAAAGAAGTTTTGAAGGGAAGGATGCACTTTCTTAT
GCCAACATTCTTCGCTCAAGGAACAAGTTTTGCTGATGCTCTTGTCTATGTATGAAAATATACTTGAAAAAGATAATGGA
AATGTTGAAGCTCACATTGGCAAAGGGATATGCCTACAAATGCAAAATATGGGAAGGCTTGCTTTTTGAAAGTTTTCTCT
GAAGCAATTAGGCAGGACCCACAAAATTTGTGTGCCCTCACTCATTTAGGCATTTTTGTACAAAGACGAGGGTTCGCCTG
TTGGAGGCTGCTGAGTCATATGATAAAGCTCTGAGAATAGACTCTTCATACAAAACCAGCTGCTGAATGCTTAGCAATT
GTTTTAACAGATCTTGGAAACCAGCTTAAAGCTTGCTGGCAACACTCAGGAGGGAATACAGAAGTATTATGAAGCTCTT
AAAATAGATCCACATTATGCTCCGGCATATTACAACCTTGGTGTGTTTATTCTGAAATGATGCAATATGACACGGCT
CTTAGTTGCTACGAGAAGGCTGCACTAGAGAGGCCTATGTATGCTGAAGCATATTGCAACATGGGTGTCATCTTTAAG
AACCGTGGCGACTTGGAAATCCGCTATCACTTGTATGAAAGGTGTCTGGCTGTGTCTCCAAACTTTGAGATTGCTAAG
AATAATATGGCAATAGCCTTGACAGATTTAGGCACGAAGGTTAAATTTGGAAGGAGACATCAACCAAGGCGTGGCATAT
TACAAGAAGGCTCTGTATTATAATTGGCATTATGCTGATGCTATGTACAATCTTGGGGTTGCTTATGGTGAAATGCTG
AAGTTTGATATGGCAATTGTGTTTTATGAACTCGCATTTCACTTTAATCCTCATTGTGCGGAGGCATGCAACAATTTA
GGTGTAATTTACAAAGACCGAGACAACCTTGATAAAGGCTGTGGAGTGTCTATCAGGCAAATTCATGCTTTTTGGCTTTA
TCGATCAAACCAAACCTTCTCCCAATCGCTGAACAATCTGGGTGTTGTCTACACTGTCCAGGGTAAGATGGATGCTGCA
GCCAGCATGATTGAGAAAGCTATTGTTGCAAATCCTACATATGCAGAAGCATATAATAATTTAGGGGTTCTTTACAGA
GATGCTGGCAATATATCCATGGCCATTGAAGCATATGAGCAATGCCTTAAGATAGATCCTGATTCTCGCAATGCAGGC
CAGAATCGGTTGCTTGCAATGAATTACATAAAACGAGGGAAATGATGATAAACTTTTTGAGGCTCACAGAGACTGGGGC
AGGCGATTTATGAGGTTATATCCACAGTACACATCATGGGACAATCCAAAAGATCCGGAACGACCCCTTGTGTTGGA
TATGTATCTCCAGATTATTTTACGCATTCTGTATCATATTTTATTGAAAGCACCCTTGTGAATCATGACTATGCAAAT
TACAAAGTGGTTGTTTATTTCAGCAGTTGTGAAGGCAGATGCAAAAACGATTAGGTTTAGGGACAAAGTTTTAAAAGG
GGTGGGGTATGGAGAGATATATATGGAATTGACGAGAAGAAGGTTGCAAGCATGGTCAGAGAAGATAAAGGTTGACATC
CTGGTGGAACTCACTGGTCATACTGCTAATAACAAGTTGGGAATGATGGCATGCCGCCCTGCACCTGTTTCAGGTGACT
TGGATAGGCTACCCAAACACAACCTGGTTTTGCCTACAATTGATTATAGAATCACTGATTCACTTGACAGACCTTCTGAT
ACGTCGCAGAAGCATGTTGAGGAGTTGGTTTCGATTACCGGAATGCTTCTTTGTTATATGCCTTCCCCTGAGGCCGGG
CCTGTTTCTCCAACCTCCTGCACTTTCCAATGGCTTTATTACTTTTGGTAGCTTTAATAATCTAGCTAAGGTATGGTTTT
AGGATGAAGCAAGTTAACGTAATAATGGATATTATGTGCAGTTCGAACTCTCGACTTGTGGTAAAGTGTAAAGCCTTTT
TGTTGTGATAGTGTAAGACAGAGATTTCTTTCAACGTTGGAGCAGCTGGGATTGGAATCACTACGTGTTGATCTTTTG
CCATTAATTTCTTCAACCATGATCATATGCAAGCATAACGCTCTAATGGACATTAGTTTGGATACTTTTCCATATGCG
GGAACAACACTACGACATGTGAATCTTTGTTTCAAGGAGTTCCATGTGTTACTATGGCTGGTTTCCAGTACATGCACATAAT
GTTGGCGTGAGTCTTCTCAACAAAGTAGGATTGGGACGCTGGTTGCAAAAACCTGAAGATGAGTATGTCCAATTGGCT
CTGCAGTTGGCCTCTGACATTACAGCTCTCTCAAATTTGAGAATGAGTCTCCGGGATTTAATGTCCAAGTCCCCTGTC
TGCAATGGACCAAACCTTCGCCCTTGCTTTGGAGTCAACATAACCGGAGCATGTGGCGCAGGTAAGTAAAGGTGATGTG
CCATCCTTGGAGCGGATGGAGATCCTGCAGCAGGAGAACCTCTGAAGAACCTGTTGTTAAATTTGCCTGAGCCAACAAAG
ATCACAACCTCAAGAGATGATTCTTCTGGATCTATCAAGACAAATGGATTAAATCAGGTCCCCTCATCAATGTTGAAG
CACTCAACTAGTGAAGAAAATGGAGTTAGTTGA
```

Anexo M: Fotos de Geles de ensayos de amplificación.



Figura A-5: Ensayo de amplificación de RNA y cDNA obtenido mediante kit (método de Chomczynski) con uso de DNAsas Rq1: los dos primeros carriles corresponden al PCR usando el RNA extraído como sustrato; los dos últimos carriles corresponden al PCR usando el cDNA sintetizado como sustrato.

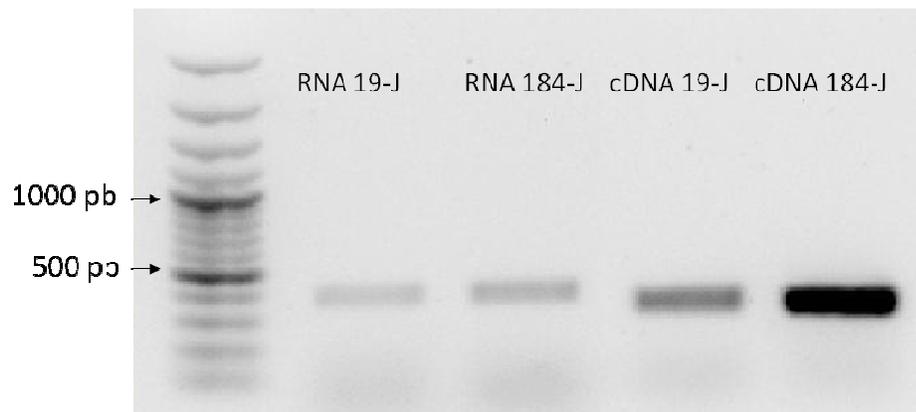


Figura A-6: Ensayo de amplificación de RNA y cDNA obtenido mediante kit (método de Chomczynski) con uso de DNAsas I: los dos primeros carriles corresponden al PCR usando el RNA extraído como sustrato; los dos últimos carriles corresponden al PCR usando el cDNA sintetizado como sustrato.

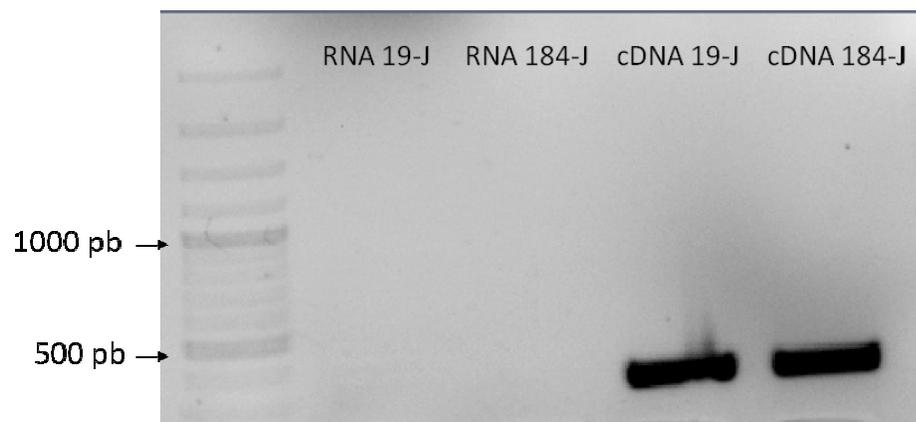


Figura A-7: Ensayo de amplificación de RNA y cDNA obtenido mediante kit (método de Chomczynski) con uso de purificación mediante el uso de Dynabeads poli T: los dos primeros carriles corresponden al PCR usando el RNA extraído como sustrato; los dos últimos carriles corresponden al PCR usando el cDNA sintetizado como sustrato.