



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas  
Mención Genética Molecular y Microbiología

TESIS DOCTORAL:

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES DE LA  
CLASE B TIPO MADS-BOX, RESPONSABLES DE LA  
FORMACIÓN DE ÓRGANOS FLORALES EN *Vitis vinifera*

MARÍA JOSEFINA POUPIN SWINBURN

Septiembre 2008



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas  
Mención Genética Molecular y Microbiología

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES DE LA  
CLASE B TIPO MADS-BOX, RESPONSABLES DE LA  
FORMACIÓN DE ÓRGANOS FLORALES EN *Vitis vinifera*

Tesis presentada a la Pontificia Universidad Católica de Chile como parte de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas mención Genética Molecular y Microbiología

Por

MARÍA JOSEFINA POUPIN SWINBURN

Director de Tesis: PATRICIO ARCE-JOHNSON

Comisión de Tesis: PATRICIO HINRICHSEN  
XAVIER JORDANA  
RICARDO MORENO

Septiembre 2008

**Dedico todo el esfuerzo que he puesto en esta tesis a Marco, por su incondicionalidad y porque tiene el poder de hacerme creer que todo es más fácil de lo que se ve, a mis papás y al nuevo(a) integrante de la familia, quien ha vivido conmigo cada momento de este último tiempo.**

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer profundamente a mi tutor de tesis, Patricio Arce-Johnson. El Dr. Arce me ha acompañado durante toda mi formación como bióloga, durante mi tesis de doctorado siempre me dejó trabajar con libertad, confiando en mis capacidades y siendo a la vez un guía permanente en el enfoque de mi trabajo. Para mi, no sólo ha sido un guía en el ámbito científico, sino también y de manera muy importante en el ámbito personal. Siempre pude contar con su apoyo incondicional y estoy segura de que siempre contaré con ese apoyo en el futuro.

Agradezco a los miembros de la comisión de evaluación por sus comentarios y disposición: Al Dr. Ricardo Moreno, quien también me permitió realizar algunas técnicas en su laboratorio, al Dr. Patricio Hinrichsen y al Dr. Xavier Jordana.

Agradezco a la Dra. Beth Krizek, de la Universidad de South Carolina, USA, quien me permitió realizar una estadía de entrenamiento en su laboratorio.

Quiero agradecer de manera especial a Tania Timmermann, quien además de ser una gran ayuda en lo experimental, fue una gran amiga siempre.

Agradezco a todos los integrantes de mi laboratorio (Box 3), a los actuales y a los que ya han terminado, quienes fueron siempre una gran compañía. En especial a Tomás Matus por sus siempre acertadas críticas y consejos, a Fernán Federici, a Andrés Leiva por ser una gran ayuda en la última etapa de la tesis, a Consuelo Medina y a mis amigos Paola Cañón (que tiene una voluntad de oro), a Andrea Vega, Carmen Espinoza y Felipe Aquea, por su ayuda y por agregarle entretención al trabajo.

También agradezco a todo el laboratorio de Bioquímica, en especial a Gabriel León, por su buena disposición y a Enrique y María Inés, porque su trabajo es imprescindible para todos nosotros.

Agradezco a CONICYT, del Gobierno de Chile, institución que me otorgó las becas de mantención y extensión de tesis, becas de asistencia a congresos nacionales e internacionales y una beca para realizar una pasantía en el extranjero. A VRAID, de la Pontificia Universidad Católica de Chile, por otorgarme la beca de exención de matrícula. A la Fundación para la Innovación Agraria (FIA), por la adjudicación de una beca para presentación en un congreso internacional.

## INDICE DE MATERIAS

Dedicatoria.....	I
Agradecimientos.....	II
INDICE DE FIGURAS.....	VII
INDICE DE TABLAS.....	X
ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Identidad de órganos florales: Modelo de floración ABCDE.....	1
1.2 Regulación de los genes de identidad floral y cambios de sus patrones de expresión durante la evolución.....	7
1.3 Evolución de la clase B de genes MADS-box de identidad floral.....	12
1.4 Floración en <i>Vitis vinifera</i> .....	17
2. MATERIALES.....	24
2.1 Material biológico.....	24
2.2 Plasmidios.....	25
2.3 Medios de cultivo.....	25
2.4. Enzimas.....	25
2.5 Sistemas comerciales.....	25

2.6 Otros reactivos.....	26
2.7 Oligonucleótidos.....	27
2.8 Otros materiales.....	28
3. MÉTODOS.....	32
3.1 Obtención de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	32
3.2 Extracción de RNA total a partir de tejidos vegetales.....	33
3.3 Síntesis de cDNA.....	36
3.4 Hibridación tipo northern.....	38
3.5 Técnicas básicas de DNA recombinante.....	41
3.6 Transformación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> por el método de inmersión floral.....	47
3.7 Clonamiento de genes MADS-BOX de la clase B en <i>Vitis vinífera</i> .....	48
3.8 Alineamientos y reconstrucción filogenética de los genes B de vides.....	50
3.9 Análisis del número de copias de los genes B en el genoma de la vid.....	50
3.10 Análisis microscópico del desarrollo de la inflorescencia en vid.....	51
3.11 Cuantificación de la expresión de genes en diferentes tejidos, desarrollo floral, frutal y en los distintos órganos de la flor de la vid.....	52
3.12 Experimento de polinización en campo de <i>Vitis vinifera</i> (cv. Red globe y Moscatel).....	54
3.13 Expresión constitutiva de VvPI en plantas de <i>Arabidopsis</i> mutantes para el gen <i>PISTILLATA</i> ( <i>pi-1</i> ).....	56
3.14 Determinación de la localización sub-celular de proteínas: Construcción de plasmidios de expresión y agroinfiltración en Tabaco.....	59
3.15 Identificación de otros genes relacionados a la vía de floración en vid y determinación de sus patrones de expresión.....	61

3.16	Diseño de construcciones de silenciamiento para los genes B y transformación genética de <i>S. lycopersicum</i> y <i>V. vinifera</i> .....	62
3.17	Números de acceso de las secuencias utilizadas en orden alfabético....	66
4.	RESULTADOS.....	68
A.	Identificación y caracterización de genes de floración en <i>Vitis vinifera</i> .....	68
4.1	Clonamiento y caracterización de los genes MADS-box clase B en <i>Vitis vinifera</i> .....	68
4.2	Expresión de los genes MADS-box clase B en los diferentes órganos de la vid.....	84
4.3	Expresión temporal de los genes de la clase B en inflorescencia.....	89
4.4	Caracterización Macro y microscópica del desarrollo de la inflorescencia de la vid.....	92
4.5	Expresión específica de los genes B en los distintos órganos de la flor y durante el desarrollo del fruto.....	97
4.6	Efecto de la polinización en la expresión de los genes MADS-box clase B en vides.....	102
4.7	Determinación de la localización sub-celular de VvAP3 y VvPI.....	109
4.8	Identificación de otros genes relacionados a la vía de floración y determinación de sus patrones de expresión.....	112
B.	Relación entre genes MADS-box clase B y desarrollo del fruto sin polinización.....	130
5.	DISCUSIÓN.....	137
5.1	Contexto evolutivo de la clase B de genes MADS-box.....	137
5.2	Posibles funciones de los genes de clase B en vides.....	140

5.3 Descripción de una red de genes asociados a floración en <i>V. vinifera</i> .....	147
5.4 Relación de los genes B y el desarrollo del fruto.....	156
6. CONCLUSIONES.....	159
7. REFERENCIAS.....	162
ANEXO 1: Artículo: “Isolation of the three grape sub-lineages of B-class MADS-box TM6, PISTILLATA and APETALA3 genes which are differentially expressed during flower and fruit development (2007) Poupin MJ., Federici F., Medina C., Matus JT., Timmermann T., Arce-Johnson P. Gene 404: 10–24.....	171
ANEXO 2: Mapas de vectores tipo GATEWAY utilizados.....	172

**ÍNDICE DE FIGURAS**

1. Modelo ABCE de Identidad de órganos florales.....	6
2. Evolución del sistema ABC de especificación de la identidad de órganos florales.....	10
3. Evolución de la clase B de genes MADS-box en Angiospermas.....	16
4. Genotipificación de mutantes pi-1 por PCR y digestión enzimática.....	58
5. Alineamientos de secuencias aminoacídicas de genes B de vides con homólogos de otras especies.....	70
6. Comparación de la estructura genómica de VvPI y otras proteínas homólogas.....	74
7. Reconstrucción filogenética.....	76
8. Estructuras genómicas deducidas de los genes <i>VvAP3</i> y <i>VvTM6</i> .....	79
9. Plantas mutantes de <i>A. thaliana</i> mutantes en pi-1, que expresan <i>VvPI</i> .....	83
10. Análisis por hibridación tipo Northern de la expresión de <i>VvPI</i> en distintos tejidos de la vid.....	86
11. Cuantificación de la expresión génica de <i>VvPI</i> (A) y <i>VvTM6</i> (B) en hojas jóvenes, raíces, inflorescencias previo a la caída de la caliptra, frutos completos y semillas 6 semanas post-pinta.....	87
12. Expresión temporal de los genes <i>VvPI</i> , <i>VvTM6</i> y <i>VvAP3</i> durante el desarrollo de la inflorescencia.....	91

13. Análisis macro y microscópico del desarrollo temprano y tardío de la inflorescencia en <i>V. vinifera</i> en comparación con la expresión de los genes B.....	95
14. Expresión de genes MADS-box clase B, por RT-PCR en tiempo real, en los distintos órganos de la flor de vid.....	99
15. Expresión de <i>VvTM6</i> durante el crecimiento y maduración en la piel de la baya.....	101
16. Emasculación de flores de vid y expresión de los genes <i>VvPI</i> y <i>VvTM6</i> en dependencia de la polinización.....	105
17. Expresión temporal de <i>VvPI</i> y <i>VvTM6</i> en dependencia de la polinización.....	107
18. Localización sub-celular de <i>VvPI</i> y <i>VvAP3</i> .....	111
19. RT-PCR en tiempo real para analizar los patrones de expresión de <i>VvNAP</i> en los órganos de la flor y durante el desarrollo de la inflorescencia en vid.....	115
20. RT-PCR en tiempo real para analizar los patrones de expresión de <i>VvLFY</i> ( <i>VFL</i> ) durante el desarrollo de la inflorescencia y en los órganos de la flor en vid.....	119
21. RT-PCR en tiempo real para analizar los patrones de expresión de <i>VvGAI</i> y <i>VvSPY</i> durante el desarrollo de la inflorescencia y en verticilos florales de la vid.....	122
22. Expresión de <i>VvGAI</i> y <i>VvSPY</i> durante el crecimiento y maduración en la piel de la baya.....	123

23. RT-PCR en tiempo real para analizar los patrones de expresión de <i>VvSEP1</i> ( <i>VvMADS2</i> ) durante el desarrollo de la inflorescencia y en verticilos florales de la vid.....	126
24. RT-PCR en tiempo real para analizar los patrones de expresión de <i>VvMYB24</i> durante el desarrollo de la inflorescencia y en los órganos de la flor en vid.....	129
25. RT-PCR en tiempo real para analizar los patrones de expresión de <i>VvMYB24</i> durante el desarrollo de la inflorescencia y en los órganos de la flor en vid.....	133
26. PCR en DNA para evaluar transgenia de plantas de Tomate con el vector Hellsgate12 para silenciar LePI.....	135
27. Modelo de interacciones entre proteínas involucradas en la formación de órganos florales, según el análisis de los patrones de expresión de sus transcritos.....	154

**ÍNDICE DE TABLAS**

1. Secuencias de oligonucleótidos utilizados.....	29
---	----

## ABREVIATURAS

- AG: AGAMOUS
- AP3: APETALA3
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
- CTAB: Bromuro de cetil trimetiamonio
- D.O: Densidad óptica
- DEPC: Dietilpirocarbonato
- DNasa: Desoxirribonucleasa
- DTT: Ditioneitol
- EMS: Etil Metano Sulfonato
- GAI: GIBBERELIC ACID INSENSITIVE
- GAs: Giberelinas
- GFP: Proteína fluorescente verde
- LFY: LEAFY/FLORICUA
- NAP: NAC-LIKE ACTIVATED BY AP3/PI
- PI: PISTILLATA
- PVPP: Polivinilpolipirrolidona
- RACE: Amplificación rápida de extremos de cDNA
- RT-PCR: Transcripción reversa acoplada a PCR
- SEP: SEPALLATA
- SPHY: Semanas Post Hinchazón de la Yema
- SPY: SPINDLY
- TA: Temperatura ambiente
- TM6: TOMATO MADS-BOX 6
- UTR: Región no traducible
- wt: wild type o Silvestre

## DEFINICIONES

- Contig: Secuencias contiguas ensambladas
- Verticilo floral: Órgano o estructura dentro de la flor, los típicos en eudicotiledóneas nucleares son: sépalos, pétalos, estambres y carpelos.

## RESUMEN

Las flores en las Angiospermas pueden tener cuatro anillos o verticilos florales básicos (sépalos, pétalos, estambres y carpelo). El uso de mutantes en herbáceas modelo ha permitido plantear el modelo de floración conocido como ABCE, en donde las funciones combinadas de cuatro clases génicas (A, B, C y E) explicarían la identidad de los verticilos florales. La mayoría de los genes pertenecientes a estas clases son factores de transcripción de la familia MADS-box.

Los factores genéticos y ambientales que regulan la floración en especies leñosas no han sido estudiados profundamente. *Vitis vinifera* (vid) es una angiosperma leñosa de gran importancia a nivel comercial cuyo ciclo reproductivo posee una serie de características únicas. Se han realizado distintos esfuerzos para conocer los eventos moleculares involucrados en el proceso de floración de esta especie, incluyendo la caracterización de genes pertenecientes a las clases A, C y E.

En este trabajo de tesis se aisló y caracterizó la clase B de genes MADS-box de floración en *V. vinifera*, clase que en otras especies se ha descrito como responsable de la formación de pétalos y estambres. Dentro de esta clase identificamos 3 genes pertenecientes a la clase B, que por análisis de homología fueron denominados *VvAP3* (*VvAPETALA3*), *VvPI* (*VvPISTILLATA*) y *VvTM6* (*VvTM6*). *VvPI* fue caracterizado funcionalmente mediante su expresión heteróloga en plantas mutantes de *A. thaliana*. Fue posible determinar por Q-PCR en tiempo real que estos genes poseen patrones de expresión restringidos dentro de la flor. *VvAP3* y *VvPI* se expresan

exclusivamente en pétalos y estambres, sugiriendo su participación en el desarrollo de estos verticilos y explicando a su vez la formación de una flor hermafrodita en esta especie. *VvTM6* se expresa también en pétalos, estambres y además en carpelo. Sorprendentemente, su expresión se mantiene hasta el desarrollo del fruto, sugiriendo por primera vez la participación de un gen de clase B en el desarrollo de este órgano. Análisis de cortes histológicos de distintos estadios de desarrollo de la inflorescencia nos permitieron correlacionar los patrones de expresión de los genes identificados con distintos eventos de diferenciación dentro de la flor. Mediante experimentos de polinización controlada en campo fue posible determinar que este evento ejerce un efecto negativo en la expresión de los genes *VvPI* y *VvTM6*.

Fue posible describir las dinámicas de expresión de otros genes que en especies modelo se han asociado con la determinación de órganos florales. Proponemos de esta manera un modelo de interacciones para estos genes con los genes de la clase B.

Por último, se realizaron construcciones génicas para inducir el silenciamiento de genes clase B en vides y en Tomate (*Solanum lycopersicum*), ya que esta especie posee un ciclo de vida menor. En este momento contamos con líneas transgénicas en ambas especies y posteriormente podremos evaluar los fenotipos generados y su implicancia en el desarrollo de las flores y los frutos.

## ABSTRACT

The flowers of Angiosperms can have four basic floral whorls (sepals, petals, stamens and carpel). The use of mutants in herbaceous model plants has allowed proposing the flowering model known as ABCE, where the combined functions of four gene classes (A, B, C and E) would explain the identity of basic whorls. Most of the genes belonging to these classes are MADS-box transcription factors.

The genetic and environmental factors that regulate the flowering process in woody species have not been studied deeply. *Vitis Vinifera* (grapevine) is a woody angiosperm of commercial interest, whose reproductive cycle has a series of unique characteristics. Different efforts have been made to elucidate the molecular events involved in the flowering process of this species, including the characterization of A, C and E gene classes.

During this thesis, the B-class of MADS-box genes was isolated and characterized in *V. vinifera*, in others species this genetic class is involved in petals and stamen development. Within this class we identified three genes, that by sequence homology were denominated *VvAP3* (*VvAPETALA3*), *VvPI* (*VvPISTILLATA*) and *VvTM6* (*VvTM6*). *VvPI* was functionally characterized by means of its heterologous expression in mutant plants of *A. thaliana*. By real time Q-PCR it was possible to determine that these genes have restricted expression patterns within the flower. *VvAP3* and *VvPI* are expressed exclusively in petals and stamens, suggesting their participation in the development of these whorls and explaining as well the formation of a bisexual flower in this species. *VvTM6* is also expressed in petals, stamens and

additionally in carpel. Unexpectedly, its expression continues during fruit development, suggesting for the first time, the participation of a B-class gene in the development of this organ. Histological analyses of different stages of inflorescences development allowed us to correlate the expression patterns of the identified genes with different events of differentiation within the flower. By means of controlled pollination experiments in field, it was possible to determine that this event exerts a negative effect in the expression of the *VvPI* and *VvTM6* genes.

It was possible to describe the expression patterns of other genes that in species model have been associated with floral organ identity. Here, we propose a model of interactions for these genes with the B-class genes.

At last, genetic constructions were made to induce silencing of class-B genes in grapevines and Tomato (*Solanum lycopersicum*), since this species has a smaller life cycle. Now we have transgenic lines in both species and later we will be able to evaluate the phenotypes generated and the effect in flower and fruit development.

## 1. INTRODUCCIÓN

### ***Identidad de órganos florales: Modelo de floración ABCDE***

Las Angiospermas o plantas de semilla cubierta representan uno de los grupos de organismos más exitosos y diversos en la Tierra, se estima que existen más de 250,000 especies de este grupo (Krizek y Fletcher, 2005). En la naturaleza puede observarse una diversidad enorme en las morfologías de las flores de las distintas especies de angiospermas. Esta diversidad ha llamado la atención del ser humano por largo tiempo y existen muchos grupos de investigación enfocados en comprender los procesos fisiológicos y moleculares que comandan la floración, especialmente en un área de investigación conocida como “Evo-devo” (Evolution and Development), es decir, evolución y desarrollo (Kramer y Hall, 2005).

Una de las principales diferencias entre plantas y animales, es que las primeras crecen y se desarrollan arraigadas a la tierra sin posibilidad de movilizarse, por lo que deben adaptarse rápidamente a ambientes impredecibles y generar cambios en sus procesos fisiológicos. Por ejemplo, deben determinar si las condiciones ambientales son las adecuadas para florecer, ya que si este proceso ocurre en el momento adecuado para la germinación de las semillas, una determinada especie logrará perpetuarse. Es por esto que la floración debe ser un proceso altamente controlado por la planta y en el ámbito científico se han realizado grandes esfuerzos para conocer los factores, tanto internos como externos, que

controlan el desarrollo floral (Revisiones en: Blazquez y Weigel, 2000; Kramer y Hall, 2005; Corbesier y Coupland, 2006).

El estudio del proceso de floración se ha focalizado en dos áreas: Una de ellas es el estudio de los procesos que gatillan el momento de la floración en las distintas especies y la otra es el estudio de los mecanismos que determinan la identidad de los órganos dentro de cada flor.

Entre las angiospermas, diferentes especies pertenecientes a distintos taxa han colonizado casi todo tipo de hábitat, esta diversificación, en conjunto con una co-evolución con agentes polinizadores ha permitido la aparición de un gran rango de estructuras en los órganos dentro de la flor. Estudios abocados a entender cómo y por qué en una zona determinada del meristema floral se desarrolla un órgano floral determinado y no otro, es lo que se conoce como “Control de la identidad de los órganos florales”.

Una de las familias génicas más estudiada en plantas es la de los factores de transcripción o genes homeóticos MADS-box. Estos genes se denominan así por los cuatro primeros genes de este tipo descritos en distintos organismos: MCM1 de levadura; AGAMOUS de *A. thaliana*; DEFICIENS de *A. majus*; SRF de humanos (Irish, 2003). Estos factores de transcripción presentan un dominio de unión al DNA (dominio MADS) de 58 aminoácidos y participan en distintos procesos fisiológicos en eucariontes tales como levaduras, insectos, anfibios y mamíferos (Shore y Sharrocks, 1995). En plantas, regulan procesos tan diversos como por ejemplo, la arquitectura radicular (Burgeff y cols., 2002), la dehiscencia en frutos secos (Ferrandiz y cols., 2000; Liljegren y cols., 2000), la maduración en frutos carnosos

(Vrebalov y cols., 2002), la producción de antocianos (Lalusin y cols., 2006) y la pigmentación de la semilla (Nesi y cols., 2002).

Dentro de los genes MADS-box mas estudiados están aquellos relacionados con el control de la identidad de los órganos florales. En 1991 se trabajó con plantas mutantes de genes homeóticos MADS-box en las especies modelo *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus*. En estas mutantes ocurrían cambios homeóticos en la flor y en lugar de un determinado órgano floral aparecía otro. Los fenotipos de estas mutantes permitieron proponer un modelo de control de identidad de órganos florales conocido como ABC (Coen y Meyerowitz, 1991).

Las flores de las plantas dicotiledóneas pueden estar compuestas de cuatro verticilos o anillos florales básicos: sépalos, pétalos, estambres y carpelos. El modelo ABC explica cómo las funciones combinadas de tres clases de genes (A, B, y C) determinarían la identidad de los cuatro verticilos florales (Coen y Meyerowitz, 1991). Para el desarrollo de los sépalos se necesita de la función de los genes del bloque A en el anillo mas externo de células del meristema floral, para el desarrollo de los pétalos se necesitaría la función combinada de los genes de los bloques A y B. Para que se desarrollen los estambres se necesita de la función de los genes de los bloques B y C y por último, la expresión y función de los genes de clase C en el anillo de células más interno de la flor produciría la formación de los carpelos (Fig. 1A).

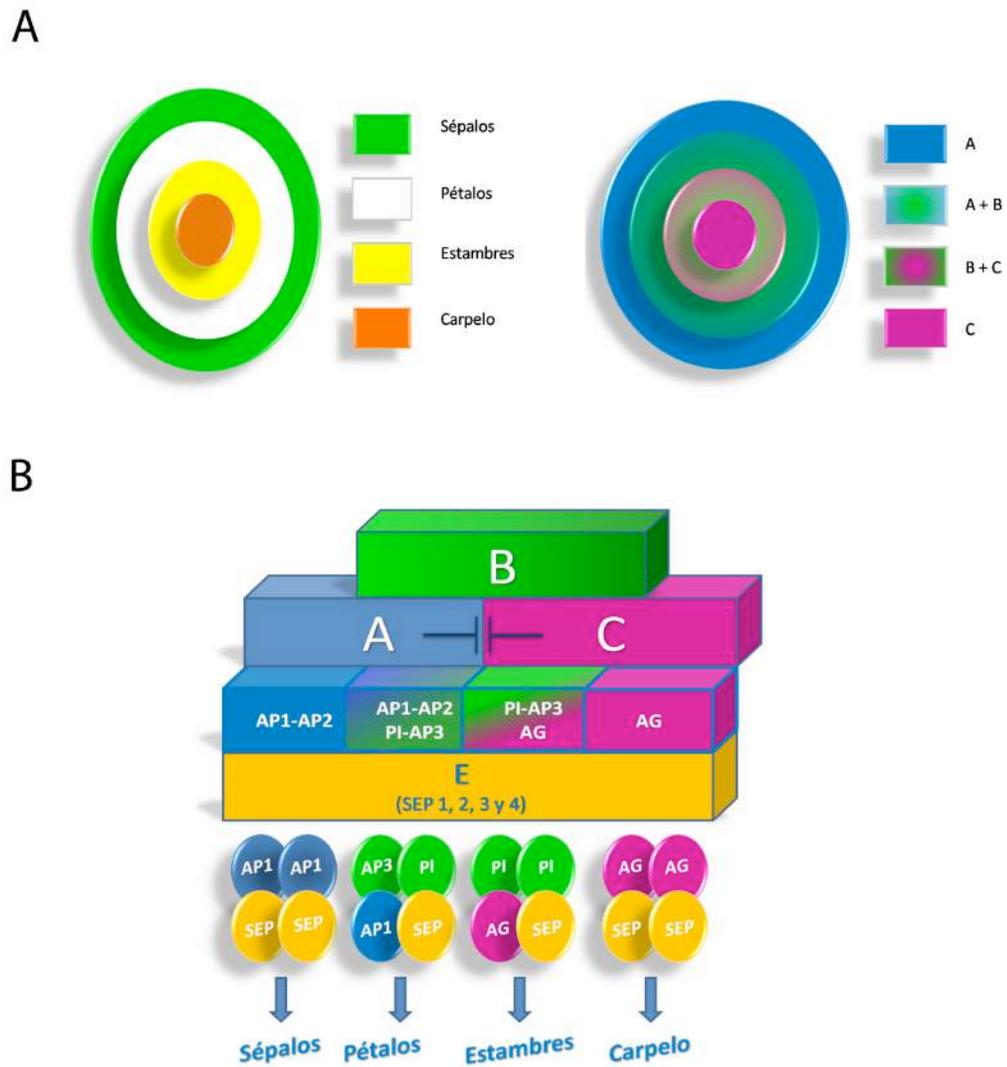
En *Arabidopsis* hay dos genes clase A: *APETALA1* (*AP1*) y *APETALA2* (*AP2*); dos de clase B: *PISTILLATA* (*PI*) y *APETALA3* (*AP3*), y un solo gen perteneciente a la clase C: *AGAMOUS* (*AG*) (Bowman y cols., 1989) (Fig. 1B). A excepción de *AP2* todos estos genes son del tipo MADS-box, y específicamente corresponden a un

subgrupo génico conocido como MIKC, debido a que sus proteínas presentan los dominios: MADS (M), Intervening (I), Keratin-like (K) y C-terminal (C). El dominio MADS permite el reconocimiento del DNA en zonas conocidas como “CArG box” [CC(A/T)<sub>6</sub>GG] (Riechmann y cols., 1996); los dominios I y K permiten la formación de dímeros con otras proteínas MADS-box (Davies y cols., 1996; Fan y cols., 1997; Yang y cols., 2003). Por último hacia el extremo 3' se encuentra el dominio C, que es el más divergente entre las distintas proteínas, posee un dominio de transactivación y contribuye a la formación de complejos multiméricos de proteínas MADS (Egea-Cortines y cols., 1999; Goto y cols., 2001; Honma y Goto, 2001).

Hoy en día, un mayor conocimiento ha permitido proponer un modelo ABC mas complejo, conocido como ABCDE, ya que se han descrito también las clases génicas D y E (Fig. 1B). En donde los genes de la clase E (*SEPALLATAS*) serían fundamentales para la función de las clases A, B y C, ya que su función estaría dada por la formación de un tetrámero proteico en donde siempre participaría una proteína tipo *SEPALLATA* (Honma y Goto, 2001) (Fig. 1B). Esto se describió luego de que se intentara de manera infructuosa convertir tejido vegetativo en tejido floral, mediante la sobre-expresión ectópica de los genes ABC, Honma y Goto descubrieron que para que esta conversión fuera posible era necesaria también la sobre-expresión del gen *SEPALLATA3* (*SEP3*). Ellos demostraron que para que un órgano floral se desarrollara era necesaria la formación de un tetrámero de proteínas, en donde los genes de la clase E, le entregarían plasticidad a los posibles complejos a formarse. En *Arabidopsis*, la clase E codifica para cuatro proteínas relacionadas, redundantemente requeridas para la formación de sépalos, pétalos, estambres y

carpelo. La triple mutante *sep1, 2 y 3* presenta sólo sépalos, y la mutante en los cuatro genes presenta estructuras tipo hoja en vez de flores, similar a lo que ocurre con la triple mutante *ap2 ap3 ag*, que pierde la función ABC (Ditta y cols., 2004).

Por otro lado, la clase floral D incluiría a factores relacionados con la identidad de los óvulos dentro del carpelo, incluyendo a los genes *SHATERPROOF (SHP1)* y *SEEDSTICK (STK)* (Colombo y cols., 1995; Favaro y cols., 2003).



**Figura N°1: Modelo ABCE de Identidad de órganos florales.**

A) En la parte izquierda se representan esquemáticamente los 4 anillos o verticilos florales. En la parte derecha se muestra cómo se expresan los genes A, B y C en los distintos verticilos. B) Modelo de control de identidad de órganos florales A, B, C más los genes E (*SEPALLATA*). Se representan los tetrámeros proteicos que actúan en cada verticilo. (No se señala la clase D, pero ésta se expresa en el anillo más interno para formar los óvulos).

## ***Regulación de los genes de identidad floral y cambios de sus patrones de expresión durante la evolución***

En *Arabidopsis* se ha descrito que los transcritos de los genes de las clases A, B y C se expresan en sectores espaciales muy reducidos y específicos dentro de la flor, coincidentemente con su sitio de acción (Fig. 1A). Por ejemplo, los mRNAs de los genes de la clase B y C se detectan muy tempranamente desde que se observan los meristemas que originarán los pétalos, estambres y carpelo y siguen observándose hasta que estos órganos maduran (Bowman y cols., 1989; Krizek y Meyerowitz, 1996). Los genes de la clase E tienen distintos patrones de expresión, en donde *SEP1* y *SEP2* se expresan en los cuatro verticilos y *SEP3* con *SEP4* tienen una expresión espacial mas restringida (Honma y Goto, 2001; Ditta y cols., 2004). Distintos mecanismos regulatorios controlan la expresión de los genes de identidad floral. La mayoría de los estudios en este sentido se ha basado en regulación temporal por activación o represión transcripcional. Sin embargo, estudios mas recientes han descrito que algunos de estos genes también son regulados a nivel post-transcripcional, como es el caso de *AP2* cuya traducción es regulada por un microRNA (Chen, 2004).

*LEAFY (LFY)*, es un gen que controla la formación de los meristemas florales y en *Arabidopsis* activa la expresión tejido específica de distintos genes de identidad floral. Para actuar, *LFY* se expresa de manera ubicua en el meristema y sus co-factores se expresan con patrones espaciales más restringidos. Para activar a los genes de la clase B, *LFY* actúa con *UFO* y *AP1* en el segundo y tercer verticilo

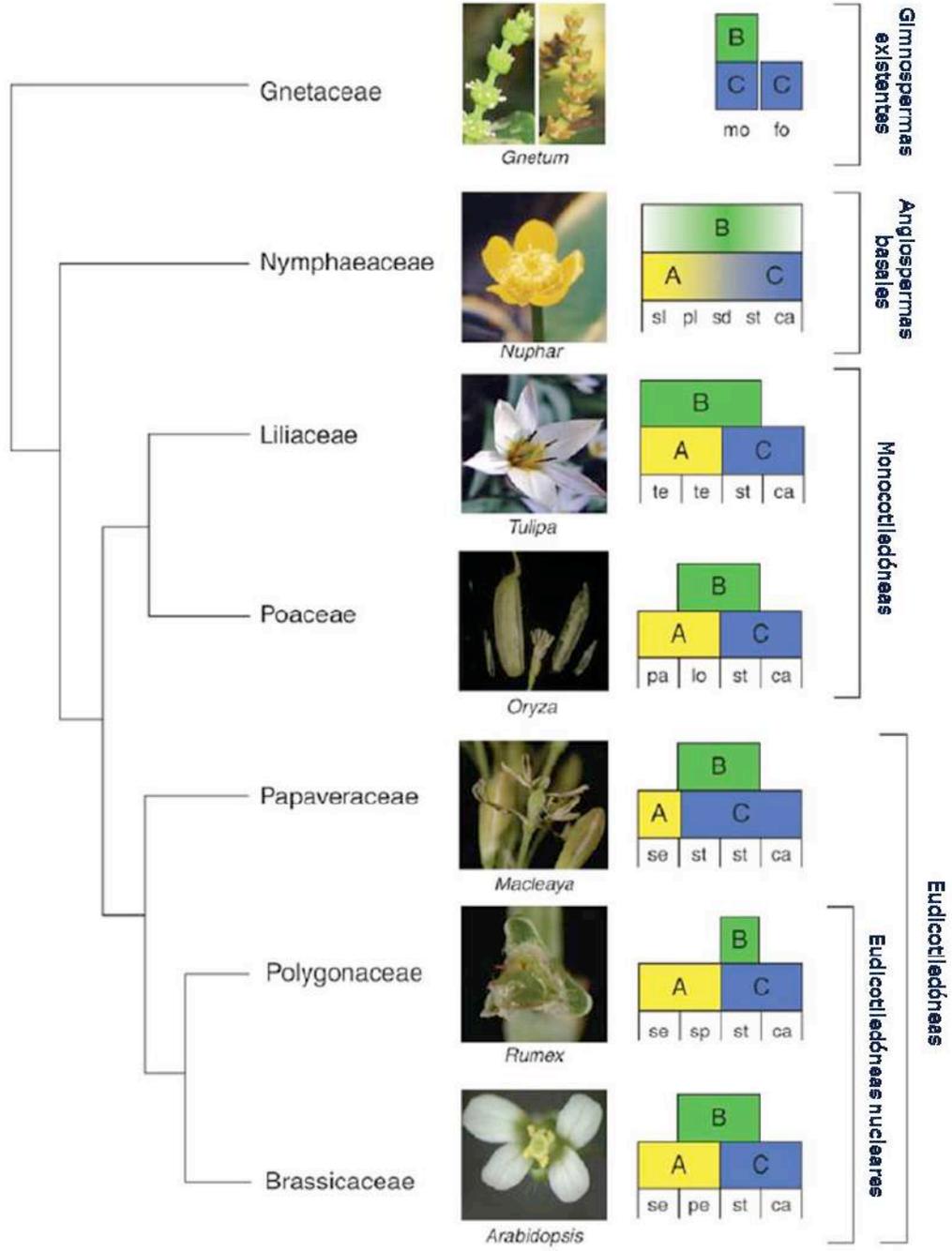
(Parcy y cols., 1998; Ng y Yanofsky, 2001) y actúa con *WUSCHEL* (*WUS*) para activar la expresión de *AG* (C) en el tercer y cuarto verticilo (Lenhard y cols., 2001). Para el caso de *AP3* y *PI*, una primera etapa de activación transcripcional estaría dada por *LFY* y luego sus mismos productos proteicos mismos auto-regularían positivamente su expresión (Honma y Goto, 2000).

Además, se ha visto que la mantención de altos niveles de genes de identidad floral durante el comienzo de la formación de la flor, depende de *ATX1* (*PROTEÍNA TIPO TRITHORAX1*), un homólogo del gen *trithorax50* de *Drosophila Melanogaster*, que codifica para una proteína histona metil transferasa (Alvarez-Venegas y cols., 2003), por lo que se sugiere la existencia de regulación epigenética en la expresión de estos genes.

Por otro lado la hormona vegetal Giberelina (GA) promueve la expresión tardía de los genes de identidad floral, al remover los represores tipo *DELLA* de sus promotores (Yu y cols., 2004).

Se han propuesto diversas variaciones del modelo ABC para las distintas Angiospermas y Gimnospermas, intentando explicar cómo se habría originado la diversidad de morfologías observadas en las flores, en comparación con los conos de Gimnospermas que sólo poseen una estructura reproductiva por cono y que no está protegida por órganos estériles como los pétalos (Fig.2). De esta manera un aspecto interesante está en comprender cómo se originó la bisexualidad o hermafroditismo en las flores. Se ha propuesto que cambios en los patrones de expresión de los genes de identidad floral y especialmente de la clase génica B, podrían explicar la aparición de esta característica en la flor. La expresión de esta

clase sería mas expandida en Angiospermas basales y se habría ido restringiendo a zonas muy específicas en el meristema a medida que fue ocurriendo la evolución (Fig. 2) (Soltis y cols., 2007; Theissen y Melzer, 2007). Además se postula que antes de que los sitios de expresión de los genes ABC se hicieran mas restringidos, se habrían generado gradientes de niveles de proteínas que explicarían la formación de órganos intermedios como tépalos, tépalos tipo sépalos, pétalos tipo tépalos, estaminodios (estructuras tipo estambres estériles), etc. (Fig. 2).



**Figura N°2: (Obtenida y traducida de Theissen y Melzer, 2007) Evolución del sistema ABC de especificación de la identidad de órganos florales.**

A la derecha se muestran diferentes versiones del sistema ABC. Los modelos ABC difieren ya sea por los dominios de expresión de los genes ABC, o por los órganos especificados por las distintas combinaciones genéticas. Para cada tipo de sistema ABC se muestra solo un ejemplo, aunque este pueda ocurrir en distintas taxa o haberse originado independientemente varias veces durante la evolución.

Se muestran fotografías de conos o flores modeladas por los correspondientes sistemas ABC. Las relaciones entre las familias de plantas a las que pertenecen las distintas especies son indicadas por el árbol filogenético a la izquierda (APGII, 2003). En algunos casos (*Macleaya*, *Rumex*) las estructuras florales pueden representar la excepción en vez de la regla dentro de su respectiva familia. Abreviaciones: mo, órganos masculinos; fo, órganos femeninos; sl, tépalos tipo sépalos; pl, pétalos tipo tépalos; sd, estaminodio (estructuras tipo estambres estériles); st, estambres; ca, carpelos; te, tépalos petaloides; pe, pétalos; pa, palea/lemma; lo, lodículas; se, sépalos; sp, pétalos sepaloides.

### ***Evolución de la clase B de genes MADS-box de identidad floral***

Además de cambios en las zonas de expresión de los genes ABC, se cree que la gran diversidad de morfologías observadas en las flores de Angiospermas puede ser explicada por eventos de duplicación génica en la familia MADS-box, a través de la evolución de las plantas. Aunque *Arabidopsis* y arroz son especies filogenéticamente distantes, ambas poseen un gran número de genes MADS-box. *Arabidopsis* cuenta con 107 genes y arroz con al menos 71 (Irish y Litt, 2005), esto podría indicar que el gran número de genes MADS-box en estas plantas tiene un origen evolutivo reciente, ya que otros organismos como animales y hongos sólo cuentan con unos pocos genes de este tipo. Por ejemplo, *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* tienen sólo dos genes MADS-box cada uno y *Saccharomyces cerevisiae* contiene sólo cuatro (Riechmann y cols., 2000). Las duplicaciones génicas entregan material para una posible variación, ya que contar con la copia de un gen puede liberar restricciones, permitiendo que una de las copias adquiera nuevas funciones (neo-funcionalización) o bien pierda alguna de ellas (formación de un pseudogen). Alternativamente, las copias de genes duplicados potencialmente pueden divergir en sus funciones, reteniendo cada una, una sub-función del gen original, lo que se conoce como sub-funcionalización (Irish, 2003). Las duplicaciones génicas son especialmente observables en el Reino Vegetal, y la mayoría de los genomas vegetales existentes son el resultado de una serie de eventos de duplicación, ya sea de segmentos del genoma o de la totalidad de éste, seguido luego de pérdidas o mutaciones de las copias duplicadas de los genes (Irish

y Litt, 2005). Comparaciones de genotecas de ESTs sugieren que en muchas especies han ocurrido grandes eventos de duplicación, un ejemplo de esto es *Arabidopsis*, especie en la que habrían ocurrido distintos eventos de poliploidización a lo largo de su evolución (Munster y cols., 1997).

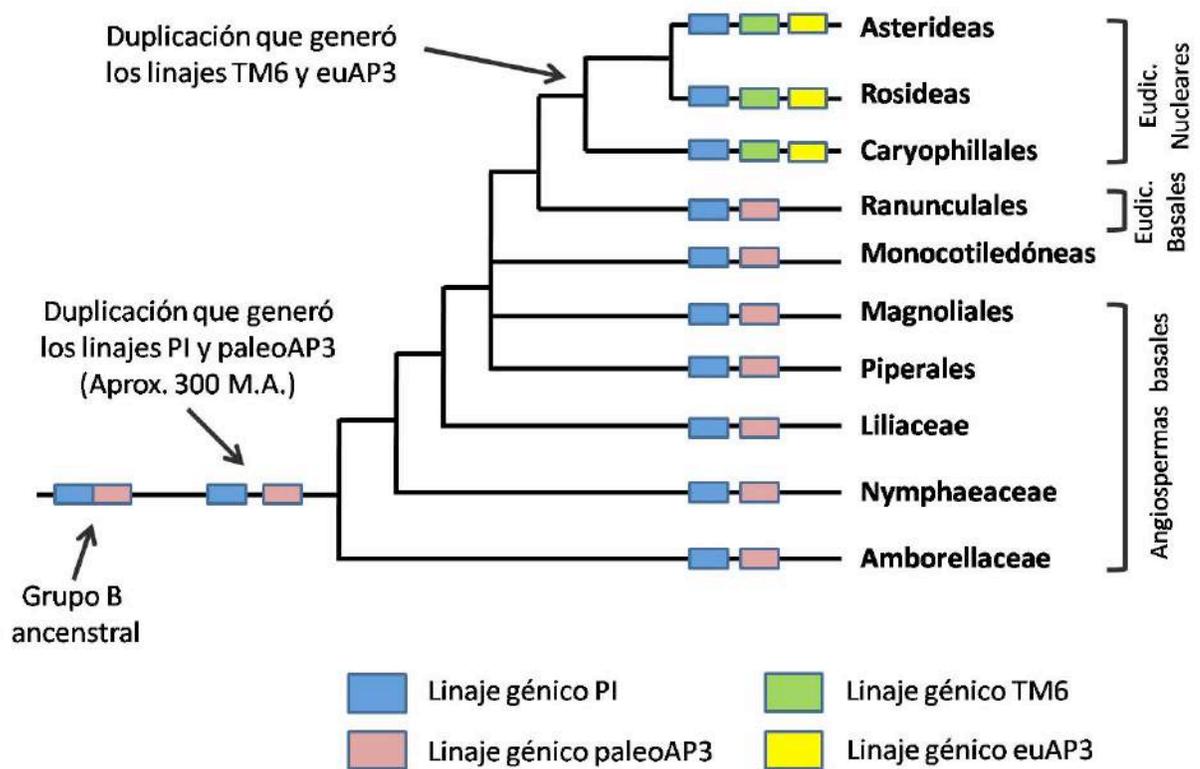
Como se mencionó anteriormente, existe evidencia de que la gran radiación de las angiospermas, podría ser explicada por una gran radiación en los genes MADS-box.

Se estima que muchos de los clados existentes hoy en día de genes MADS-box estaban presentes en el ancestro más cercano entre Gimnospermas y Angiospermas, es decir, con un origen de hace 300 millones de años atrás. Algunos de estos clados habrían sufrido repetidas duplicaciones durante la evolución. Uno de los linajes que habría sufrido más cambios y que ha sido gran objeto de estudio, es la clase B de genes MADS-box (Responsable de la formación de pétalos y estambres). Este clado habría sufrido una duplicación hace 230 a 290 millones de años atrás, generándose los linajes PI y paleoAP3, es decir, 100 millones de años antes de la fecha estimada del fósil de flor más antiguo y muy poco después de la separación entre Gimnospermas y Angiospermas (Kim y cols., 2004; Kim y cols., 2005). Aunque la clase B controla en parte la formación de los pétalos, no existe registro de estas estructuras luego de 100 millones de años desde la supuesta fecha de duplicación del clado, lo que sugiere que la aparición de PI y paleoAP3 no resultó inmediatamente en la aparición de estos órganos (Kim y cols., 2004). Como este clado también especifica la formación de estambres en Angiospermas, es posible que su función inicial haya radicado en la formación de microesporofilos (Estructuras

tipo hoja que forman microsporas) (Soltis y cols., 2007). En las Gimnospermas existentes, la única copia hermana del clado AP3 + PI pareciera cumplir esa función (Soltis y cols., 2007).

Luego de esta primera duplicación, el linaje PI habría permanecido relativamente estable, y se pueden observar motivos específicos de estos linajes en eudicotiledóneas nucleares (core), eudicotiledóneas basales, monocotiledóneas y angiospermas basales (Irish, 2003; Kim y cols., 2005). Al contrario, una nueva duplicación habría ocurrido en el linaje paleoAP3, cuando se originaron las eudicotiledóneas nucleares, generándose los linajes euAP3 y TM6 (Fig. 3). En *Arabidopsis* sólo se encuentra el linaje euAP3 representado por el gen APETALA3 y no se encuentra el linaje TM6. Hasta hace muy poco no se había definido la función de TM6 en ninguna Angiosperma. Las angiospermas basales poseen el linaje paleoAP3, que es mas similar a TM6 que a euAP3 (Irish, 2003; Lamb y Irish, 2003). Recientemente, datos obtenidos de tomate y petunia permitieron proponer que en las plantas que poseen ambos genes, TM6 y euAP3, estos genes tendrían funciones complementarias (sub-funcionalización), teniendo el primero mayor relevancia en la formación de los estambres y el segundo en la de los pétalos (de Martino y cols., 2006; Rijpkema y cols., 2006). Los constantes cambios que han sufrido los genes MADS-box en la evolución de las Angiospermas, hacen que genes de ancestros comunes puedan cumplir funciones distintas en diferentes especies. De hecho, algunos homólogos que se han aislado de una variedad de Angiospermas, aparentemente tendrían funciones distintas a las de sus contrapartes en *Arabidopsis*. Esto junto con la ausencia del linaje TM6 en esta planta modelo, hacen

imprescindible el estudio de genes MADS-box en otras Angiospermas, lo que además de ayudar a comprender los mecanismos involucrados en la identidad de órganos en especies con características distintas, permitirá comprender mejor el proceso evolutivo por el que han atravesado las Angiospermas.



(Adaptado de : Lamb y Irish, 2003 ; Kim y cols., 2005 ; Soltis y cols., 2007)

### Figura N°3 : Evolución de la clase B de genes MADS-box en Angiospermas.

Filogenia simplificada de las Angiospermas, propuesta por Soltis y cols., 1999. En esta filogenia se muestran los eventos claves de duplicación génica que habrían ocurrido en la clase B durante la evolución de este grupo de plantas. En el año 2005 se demostró la existencia y expresión de los linajes AP3 y PI en Angiospermas basales (Kim y cols., 2005).

### ***Floración en Vitis vinifera***

Aunque el proceso de floración ha sido bien caracterizado en especies herbáceas modelo como *A. thaliana*, *A. majus* o *P. hybrida*, los factores genéticos y ambientales que regulan la floración en especies leñosas no han sido estudiados profundamente. *Vitis vinifera* (vid) es una especie leñosa que posee gran importancia a nivel comercial. Es una angiosperma, perteneciente al grupo de las eudicotiledóneas nucleares, que son el grupo de angiospermas más recientes. El ciclo reproductivo de esta especie tiene una serie de características únicas. En la vid, la inflorescencia se desarrolla desde un meristema lateral o primordio no comprometido (Iniciación floral). Durante la primavera-verano de una primera temporada, desde el meristema lateral se desarrolla el meristema de inflorescencia, que luego en un estado muy temprano de desarrollo entra en un estado de dormancia hasta la siguiente primavera, período en el que concluirá el desarrollo de las flores dentro de la inflorescencia (Mullins y cols., 1992). El meristema lateral es único, ya que dependiendo de las condiciones ambientales será capaz de formar una inflorescencia o un zarcillo (Estructura de sostén de la planta) (Boss y Thomas, 2002). Los eventos moleculares que controlan esos procesos en la vid son aún desconocidos, pero en los últimos años se han realizado esfuerzos para comprenderlos (Carmona y cols., 2008). Dentro de la flor, el desarrollo de sépalos es mínimo. Los pétalos están fusionados por células especiales en sus márgenes formando una cubierta protectora de los órganos reproductivos conocida como caliptra (Srinivasan y Mullins, 1978). En la antesis de la flor, los pétalos no se abren

en la punta, si no que la caliptra comienza a desprenderse desde la base y se cae en un proceso conocido como dehiscencia. Luego de la polinización, cada ovario de la inflorescencia se diferencia para formar una baya o fruto. Al contrario de las sub-especies cultivadas hoy en día (ssp. *sativa*) cuyas flores son hermafroditas, las flores de las sub-especies silvestres de *V. vinifera* (ssp. *sylvestris*) (que aún pueden encontrarse en zonas eurásicas) son dioicas, es decir, presentan sólo un tipo de órgano sexual por flor (Carmona y cols., 2008).

Como se mencionó, se han realizado esfuerzos para conocer los eventos moleculares involucrados en la floración de la vid. Con respecto a la identidad de órganos florales, se han clonado y caracterizado genes de las clases A, C y E y un gen de tiempo de floración. Se identificó el gen *VFL* ortólogo del gen de iniciación floral *LFY* en *Arabidopsis*. Sorprendentemente, se encontró que este gen participa en el desarrollo de órganos vegetativos, además de participar en la especificación y desarrollo de meristemas florales (Carmona y cols., 2002), se vio que este gen podría estar relacionado con la mantención de la indeterminación del meristema apical, antes de su diferenciación a flores, hojas o zarcillos. También se han clonado algunos genes MADS-box, como los genes *VFUL* y *VAP1* (perteneciente a la clase A), relacionados con iniciación floral (Calonje y cols., 2004). De la clase C se ha aislado el gen *VvMADS11*, que presenta homología a los genes *AG*, *SHP1* y *SHP2* de *Arabidopsis* (Boss y cols., 2001). Se encontró que este gen se expresa tanto en el desarrollo floral como durante el desarrollo del fruto, sugiriendo un papel regulatorio de éste en estos procesos. Otros genes de la clase C incluyen a los genes *VvMADS3* (relacionado a *AGAMOUS-LIKE6* y *13*) y *VvMADS5* (relacionado a *AGAMOUS-*

*LIKE11*) (Boss y Thomas, 2002). Asociados a la clase E, se han aislado los genes *VvMADS2* y *VvMADS4*, relacionados a los genes *SEPALLATA* (Boss y Thomas, 2002).

Ninguno de los genes aislados corresponden a genes de la clase B de identidad de órganos florales, desconociéndose aspectos claves como por ejemplo si esta especie presenta o no el gen *TM6*, siendo similar a especies como el Tomate o *Petunia* (con *euAP3* y *TM6*) o si su clado B sería más similar al de *Arabidopsis* que sólo cuenta con *AP3* o bien si las funciones del clado B podrían ser cumplidas por genes distintos a los descritos para otras especies. Por otro lado, aunque en *Arabidopsis* se conocen bien los procesos involucrados en la activación de estos genes, se desconocen los fenómenos que reprimen su expresión luego de que actúan. En orquídea se propuso que la polinización podría estar involucrada en la represión de su gen B *PI*, pero se desconoce si esto ocurre en otras especies (Tsai y cols., 2005).

Además, no se ha realizado un estudio que involucre varios genes de floración en *V. vinifera*, para conocer su dinámica y poder proponer una red de genes relacionados a este proceso en la especie.

Los genes de identidad floral encontrados hasta hoy en vides no explican la formación de una flor hermafrodita con estambres y carpelo, ni la presencia de pétalos. Debido a que esta especie pertenece al grupo de las eudicotiledóneas nucleares, es posible pensar que la identidad de sus órganos florales puede ser explicada por un sistema ABC similar al de especies del mismo grupo como *Arabidopsis* o Tomate, en donde una clase B de genes sería la responsable de la

formación de pétalos y estambres, aunque como se mencionó anteriormente se desconoce si la composición de genes de esta clase sería mas similar a la encontrada en *Arabidopsis* que sólo cuenta con los linajes euAP3 y PI o a la de especies como *Petunia* y *Tomate*, en donde las funciones de la clase B son además cumplidas por el linaje TM6. Según esto es posible proponer la siguiente hipótesis:

“En *Vitis vinifera* (ssp. *sativa*) existen genes MADS-box homólogos a genes clase B de eudicotiledóneas nucleares, cuyos patrones de específicos de expresión permiten la formación de una flor hermafrodita”

Para poner a prueba esta hipótesis nos hemos planteado el siguiente Objetivo General:

“Aislar y caracterizar la clase B de genes MADS-box de floración en *Vitis vinifera*, conocer los procesos involucrados en la regulación de su expresión e identificar la dinámica de expresión de otros genes relacionados a la vía de floración en esta especie”

Objetivos específicos:

- 1.- Aislar y caracterizar los genes MADS-box clase B presentes en *V. vinifera*.
- 2.- Caracterizar espacial y temporalmente los patrones de expresión de los genes B encontrados, en distintos órganos y tiempos de desarrollo de *V. vinifera* e identificar posibles mecanismos de control de su expresión.
- 3.- Identificar otros genes involucrados en la vía de señalización del proceso de floración de *V. vinifera* y describir sus dinámicas de expresión.

Al comienzo de esta tesis existía evidencia que nos hacía pensar en que los genes B y específicamente *PISTILLATA*, podrían tener algún efecto en el desarrollo del fruto. El desarrollo del fruto comienza con una fertilización exitosa en los óvulos de la flor, concomitantemente con el desarrollo de la semilla. Existen evidencias de que al menos en parte, la semilla regularía el desarrollo del fruto (Gillaspy y cols., 1993). En ausencia de fertilización la flor no sigue su desarrollo y finalmente senesce. Sin embargo, en algunas especies el fruto puede desarrollarse en ausencia de fertilización, lo que ocurre en algunas variedades no semilladas o con tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal (hormonas) en la flor. Este fenómeno se conoce como partenocarpia (Vivian-Smith y cols., 2001). En el año 2001 se vio que mutantes en manzana en el gen PI producían fruto aún en ausencia de polinización, es decir generaban frutos partenocárpicos (Yao y cols., 2001). Es decir, en estas plantas no era necesario el estímulo de la polinización para inducir la

formación del fruto. Por otro lado, algunas variedades de tomate que presentaban alteraciones en sus anteras y óvulos, fenotipo que coincide con posibles alteraciones en el gen *PI*, generaban también frutos partenocárpicos (Mazzucato y cols., 1998). A pesar de que el fruto se origina a partir de los órganos de la flor se desconoce si éstos tienen alguna implicancia directa en la formación del fruto o solamente participan como tejido inicial de éste. De tener una importancia más activa, se desconoce si ésta sería igual para el desarrollo de frutos que se originan a partir de distintos órganos florales. En la literatura se había propuesto que los estambres podrían estar ejerciendo un efecto negativo en el crecimiento del fruto. En *Arabidopsis*, la mutante *fwf* desarrolla fruto partenocárpico cuando se le remueven los estambres, en cambio, cuando las estructuras masculinas se mantienen, pero se muta un gen que causa esterilidad del polen (*pop1*), y por lo tanto hay estructuras masculinas pero no hay polinización, la mutante no presenta crecimiento en su fruto, lo que estaría indicando que órganos como los estambres podrían estar ejerciendo un efecto inhibitorio en el desarrollo de éste (Vivian-Smith y cols., 2001). Sin embargo se desconoce si los genes que participan en la identidad floral de los estambres, como *PI* podrían ser los responsables de esta inhibición. En resumen existía evidencia de una inhibición del crecimiento del fruto mediada por los estambres y evidencia de que una mutante en el gen *PI* en manzana era capaz de desarrollar fruto sin polinización, aunque se desconocía si este era un fenómeno general para distintas especies, por lo que nos planteamos la siguiente hipótesis:

“Mutaciones en el gen *PISTILLATA* se asocian a cambios fisiológicos y moleculares relacionados con partenocarpia”

En la sección B de los resultados de esta tesis se detallan los experimentos que se han realizado con el fin de evaluar esta hipótesis.

## 2. MATERIALES

### 2.1. Material biológico

- **Material vegetal**

Tejidos vegetativos y reproductivos fueron colectados de plantas de vid (*Vitis vinifera* L, cv. Cabernet Sauvignon, cv. Moscatel y cv. Red Globe) de una parcela experimental de la zona central de Chile.

Semillas de *Arabidopsis thaliana* de los ecotipos Ler y Col-0 fueron obtenidas de la colección de semillas de nuestro laboratorio. Semillas mutantes para el gen *PISTILLATA* (*pi-1*) fueron obtenidas por gentileza de la doctora Beth Krizek (USC University, Columbia, USA).

También se utilizaron plantas de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi.

- **Cepas bacterianas**

Se utilizaron las siguientes cepas bacterianas obtenidas del cepario de nuestro laboratorio:

***Escherichia coli* DH5 $\alpha$** : F', recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), supE44, relA1, deoR,  $\Delta$ lacU169, ( $\emptyset$  80d lacZ  $\Delta$ M15) competentes para transformación por cloruro de calcio.

***Agrobacterium tumefaciens* GV3101**: pMP90 (pTiC58 $\Delta$ T-DNA) Rif<sup>R</sup> Gm<sup>R</sup>

***E.coli* DB3.1**: F<sup>-</sup>, gyrA462, endA1,  $\Delta$ (sr1-recA), mcrB, hsd20(rB<sup>-</sup>, mB<sup>-</sup>), supE44, ara14, galK2, lacY1, proA2, rpsL20 (Smr), xyl5,  $\Delta$ leu mtl1

## **2.2 Plasmidios**

Se utilizó el plasmidio pGEM-T-easy (Promega, Madison, USA) para clonar los fragmentos de DNA obtenidos de las reacciones de PCR.

Los plasmidios p207, p221, pCAMBIA1302, pK7FWG2, pHellsgate12 (Ver Anexo 2).

## **2.3 Medios de cultivo**

Para la preparación de los medios de cultivos se utilizaron los siguientes reactivos: agar-agar de MERCK, Alemania; antibióticos de SIGMA, Estados Unidos; Sacarosa y Sarcosyl de WINKLER, México; Medio MS y vitaminas de PhytoTechnology, Estados Unidos, Medio LB de MO BIO, Estados Unidos.

## **2.4 Enzimas**

Se utilizaron las enzimas *Taq* polimerasa (DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*), DNA ligasa T4 que fueron obtenidas de Invitrogen, Estados Unidos. DNAsa RQ1 de promega, Estados Unidos. Las enzimas de restricción BspHI, EcoRV, BglII y PmlI de New Englands Biolabs, Estados Unidos.

## **2.5 Sistemas comerciales**

Se utilizaron los siguientes sistemas comerciales:

- Superscript™ First-strand Synthesis™ de Invitrogen.
- pGEM™-T easy vector system de Promega.
- BP y LR clonase™ de Invitrogen.

- Purificación de DNA plasmidial: “Axiprep™”, de Axigen biosciences, Estados Unidos.
- Purificación de DNA desde geles de agarosa: “MinElute™ Gel Extraction kit”, de Qiagen, Alemania.
- Limpieza de sondas radiactivas: columnas de exclusión molecular “Micro Bio-Spin™ Chromatography Columns”, de Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos.
- Sistema de amplificación por PCR en tiempo real: Green Master mix™ Stratagene, Estados Unidos.

## **2.6 Otros reactivos**

Los nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ditiotreitól (DTT), reactivo Trizol y agarosa fueron obtenidos de Invitrogen.

De Merck, se obtuvieron: cloruro de sodio, cloroformo, ácido acético glacial, acetona, formamida, formaldehído, isopropanol, alcohol isoamílico, etanol, metanol, carbón activado, Dimetilsulfóxido (DMSO).

De Sigma, se obtuvieron los reactivos: Acetosiringona, ácido aurintricarboxílico, ácido indol acético (AIA), Bencilaminopurina (BAP), Ácido Giberélico (GA<sub>3</sub>), Cloruro de Calcio, Cacodilato, celita, Citrato de Sodio, Cloruro de Potasio, CTAB, desoxicolato de sodio, D-Glucosa, dodecilsulfato de litio, Gelrite, Glutaraldehido, Hexamina de Cobalto triclorada (HACoCL<sub>3</sub>), IPTG, X-gal, MES, Cloruro de Litio, Cloruro de Magnesio, Cloruro de Manganeso, Fosfato de Sodio, Nonidet P40, Tris (hidroximetil)-aminometano (Tris), ácido 3-(N-morfolino) propanolsulfónico (MOPS), dietilpirocarbonato (DEPC), DNA de espermio de salmón,

acetato de sodio, acetato de potasio, hidróxido de sodio,  $\beta$ -mercaptoetanol, ácido etilen-diamino tetraacético (EDTA), bromuro de etidio (BrEt), azul de bromofenol, dodecil sulfato de sodio (SDS), polivinilpolipirrolidona (PVPP), spermidina trihidroclorada y Tween-20.

Hipoclorito de Sodio comercial.

El glicerol fue obtenido de GibcoBRL, Estados Unidos.

Se utilizaron las membranas de nylon “Zeta-Probe® Blotting Membranes”. de Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos.

El nucleótido radioactivo [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP fue obtenido de Amersham International, Buckinghamshire, Reino Unido.

Se utilizó el marcador de masa molecular (MM) “1kb *Plus Ladder*™” para DNA (100pb-12 kb).

Filtros de Nylon de Millipore, Estados Unidos

Los amortiguadores y medios de cultivo fueron preparados con agua destilada y para las reacciones de biología molecular, se utilizó agua ultra-pura.

## **2.7 Oligonucleótidos**

La mezcla de oligonucleótidos hexanucleótidos de secuencias al azar fue obtenida de Promega, Estados Unidos.

Los oligonucleótidos específicos de *Vitis vinifera* y *Arabidopsis thaliana* fueron obtenidos de Invitrogen™, Estados Unidos o de IDT Integrated DNA Technologies, Inc, Estados Unidos, al igual que los oligodT.

Las secuencias de los oligonucleótidos y su utilización se detallan en la Tabla 1.

### **2.8 Otros materiales**

Para la obtención de fotografías de las plantas y de geles de agarosa se utilizó una cámara digital PowerShot G6, de Canon Inc., Japón.

Se utilizó el phosphorimager “Cyclone™ Storage Phosphor System”, y la pantalla de exposición “Cyclone Storage Phosphor Screen”, de Packard Bioscience, Estados Unidos.

Utilización	Gen asociado	Nombre del óligo	Secuencia 5' a 3'	Código o Referencia	
óligonucleótidos degenerados para amplificar cDNAs de genes MADS-box	<i>VvPI</i> , <i>VvTM6</i>	MADS1-F	ATGGGDMGBGGRAARRTHGA	B=GCT, R=AG, H=ACT, M=AC, V=ACG, D=ATG, Y=CT	
	<i>VvPI</i> , <i>VvTM6</i>	MADS2-R	ATGGGDMGBGGRAARRTHGA		
Oligonucleótidos específicos para los distintos genes analizados:	<i>VvPI</i>	PID3-F	ATGGGGAGAGG-GAAGATTGAG		
	<i>VvPI</i>	VvPI3UTR-R	GAGGGTAA TGGCTGAAGGAG		
	<i>VvTM6</i>	VvTM6-F	ATGGGTCGTGGGAAGATTGAGA		
	<i>VvTM6</i>	VvTM6-R	GAACCAACAATAGAGAGC		
	<i>VvAP3</i>	VvAP3-F	ATGGCTAGAGGAAAGATTGAG		
	<i>VvAP3</i>	VvAP3-R	ATAATGGTGACGAAGAGGTAA		
	Oligonucleótidos TAIL	<i>Universal</i>	AD1		TGWGNAGWANCA SAGA
<i>Universal</i>		AD2	AGWGNAGWANCAWAGG		
<i>Universal</i>		AD5	NTCGASTWTSGWGTT		
<i>Universal</i>		AD6	NGTCGASWGANAWGAA		
<i>Universal</i>		AD7	WGTGNAGWANCANAGA		
<i>Universal</i>		AD10	AGWGNAGWANCANAAAGA		
<i>VvPI</i>		Tail0	CCCA GAGCCTCTTCCCA GACTGC		
<i>VvPI</i>		Tail1	GTGCA TCTTTCCA GAGCTAGC		
<i>VvPI</i>		Tail2	AGAACA GTGA TCTCCTTGCC		
<i>VvPI</i>		Tail3	CTCAATCTTCCCTCTCCCAT		
Oligonucleótidos RACE 3'		<i>VvPI</i>	VvPI3	GCAATGTGAGAGAGGTGGA	
Oligonucleótidos tiempo real	<i>VvTM6</i>	RTTM6-F	ATTATGAATCAGCGGTGGCATT		
	<i>VvTM6</i>	RTTM6-R	ATTATGAATCAGCGGTGGCATT		
	<i>VvPI</i>	VvPIRT-F	GAGAGCTGTGAGGGACTACAATCC		
	<i>VvPI</i>	VvPIRT-R	GAGAGCTGTGAGGGACTACAATCC		
	<i>VvAP3</i>	VvAP3RT-F	CAGCCTAACCCGCCTAATGA		
	<i>VvAP3</i>	VvAP3RT-R	GGGAACGATGTGTGGATTGAG		
	<i>VvUBI</i>	VvUBI-F	TCT GAG GCT TCG TGG TGG TA		Dow ney et al., 2003
	<i>VvUBI</i>	VvUBI-R	AGG CGT GCA TAA CAT TTG CG		Dow ney et al., 2003
	<i>VvLFY</i>	VvLFY-RT-F	TGGTAA GAAGAATGGGCTAGATT		
	<i>VvLFY</i>	VvLFY-RT-R	GCGCTCTTTGGCAATGTT		

Utilización	Gen asociado	Nombre del óligo	Secuencia 5' a 3'	Código o Referencia
Oligonucleótidos tiempo real	VvNAP	VvNAP-RT(F)	CCCTGGCGTGGACAAA	
	VvNAP	VvNAP-RT(R)	ATTCA TACACTGGGTTCAAATA	
	VvSEP1	VvSEP1-RT-F	AGGAAGCTGGATGAAATTAAGTG	
	VvSEP1	VvSEP1-RT-F	GTGGCCGTATGGCATACTC	
	VvMYB24	QPCRMYP-B-F	TCA GACACATGATCAAGCAACT	
	VvMYB24	QPCRMYP-B-R	CGAGATTGGCAGGGTAGGA	
	VvGAI	VvGAI RT-F	GGGAGTATCATCATCCTCATCA	
	VvGAI	VvGAI RT-R	TGCCGGCGTCTTGCT	
	VvSPY	VvSPY-RT-F	CTCACATTGGCAAAGGGATAT	
	VvSPY	VvSPY-RT-R	ATGAGTGAGGGCACACAAATTT	
Oligonucleótidos para genotipificación de Arabidopsis pi-1		GPI-1-F	TACCA GAA GTTA TCTGGCAA GAAA TCATG	
	AtPI	Plintron-I	CCAATTTCA TGATATCTAGCTCAG	
Oligonucleótidos complementación de mutantes de Arabidopsis pi-1			AAGCTTAGA TCTATGGGGAGAGGG AAGA	
	AtPI	Plin-F	CACGTGTTATATCCTCTCCTGTAAGT T	
	VvPI	Pfin2-R		
Oligonucleótidos para construcciones de silenciamiento	VvTM6	attB1VvTM6	GGGGCAA GTTTGTACAAAAAGC AGGCTTGGGGGATATGGATCAT G	
	VvTM6	attB2VvTM6	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTAA CCA GACAATA GAGA GCG T	
	AtPI	attB1AtPI (F2)	GGGGCAA GTTTGTACAAAAAGC AGGCTTCA TGA TGGCAGTTTGGAT	
	AtPI	attB2AtPI (R2)	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTCGTTTAAGCACACAACACA A	
	VvPI	attB1VvPI	GGGGCAA GTTTGTACAAAAAGC AGGCTACTCATGGCCA TTGAGGAT G	
	VvPI	attB2VvPI	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTGGCTGCACCCGGAAGGCGA A	
	LePI	attB1LePI	GGGGCAA GTTTGTACAAAAAGC AGGCTCCAAAAGGAGATGGGAGC CAT	
	LePI	attB2LePI	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTGGGAAGAGCCCA TAAAATT A	

Utilización	Gen asociado	Nombre del óligo	Secuencia 5' a 3'	Código o Referencia
Oligonucleótidos para experimentos de localización subcelular	VvPI	attB1ORFVvPI	GGGGCAA <del>GTTTGTACAAAAAGC</del> AGGCTATGGGGAGAGGGAAGATT GAG	
	VvPI	attB2ORFVvPI	GGGGACCA <del>TTTGTACAAGAAAGC</del> TGGGTTATCCTCTCCTGTAAGTTTG	
	VvAP3	attB1ORFVvAP3	GGGGCAA <del>GTTTGTACAAAAAGC</del> AGGCTATGGCTAGAGGAAAGATTG AG	
	VvAP3	attB2ORFVvAP3	GGGGACCA <del>TTTGTACAAGAAAGC</del> TGGGTCTCGAGCAAAGTAAAGGTC A	

**Tabla Número 1: Secuencias de oligonucleótidos utilizados**

Secuencias de los oligonucleótidos utilizados. Las referencias y códigos de secuencia se mencionan en caso de ser necesario. Los nucleótidos en rojo corresponden a los sitios attB1 o attB2.

### 3. MÉTODOS

#### **3.1 Obtención de plantas de *Arabidopsis thaliana***

Las semillas de *A. thaliana* eran germinadas *in vitro* en placas petri en medio Murashige y Skoog (MS) 0,5X (Murashige y Skoog, 1962) y 30 g/L de sacarosa. El pH del medio era ajustado a 5,8, se agregaba agar-agar a una concentración final de 7,5 g/L y se esterilizaba en autoclave. Finalmente, se adicionaban las vitaminas del medio MS 1000X (tiamina 0,1 g/L, ácido nicotínico 0,5 g/L, piridoxina 0,5 g/L) al medio estéril, a una concentración final de 1X. En el caso de que se estuviera seleccionando plantas transgénicas se le agregaba antibióticos al medio MS (higromicina 25 mg/L, paranomicina o Kanamicina 50 mg/L). Antes de sembrar se esterilizaban las semillas mediante un lavado con hipoclorito de sodio al 50% en H<sub>2</sub>O destilada estéril, durante 7 min, en campana de flujo laminar. Luego, se lavaban 3 a 4 veces con H<sub>2</sub>O destilada estéril durante 3 min cada vez. Se mantenían las placas durante 2 días a 4°C, en oscuridad para luego transferirlas a una cámara de cultivo con temperatura controlada entre 21-24°C y con fotoperíodo de 16 horas de luz, durante alrededor de 15 días. Luego, las plántulas eran traspasadas a maceteros a una mezcla de 3:1 de tierra de hoja (ANASAC, Santiago, Chile) y turba-vermiculita (Sunshine) y se mantenían en las mismas condiciones ambientales de crecimiento.

### **3.2 Extracción de RNA total a partir de tejidos vegetales**

- **3.2.1 Extracción de RNA total de *Arabidopsis thaliana***

A partir de hojas de plantas de *A. thaliana* de los distintos ecotipos, se extraía RNA total utilizando el método Trizol. Para ello, se homogenizaba 100 mg de tejido para cada mL de reactivo Trizol. Para remover los restos de tejido se centrifugaba el homogenizado a 12.000 x *g*, durante 10 min a 4°C. Se incubaba el sobrenadante a temperatura ambiente (TA) por 5 min, luego se agregaba 0,2 mL de cloroformo, se agitaba vigorosamente y se incubaba 3 min a TA. Se centrifugaba las muestras a 12.000 x *g* por 15 min a 4°C y se transfería la fase acuosa a otro tubo. Para precipitar el RNA se agregaba 500 µL de isopropanol, se incubaba a TA durante 10 min y luego se centrifugaba a 12.000 x *g* durante 10 min a 4°C. Se lavaba el sedimento con etanol 75%. Después de secar el RNA para remover completamente el etanol, éste era resuspendido en agua-DEPC.

- **3.2.2 Extracción de RNA total de *Vitis vinifera***

Los tejidos de vides presentan un alto contenido de polifenoles que dificultan la extracción de RNA de buena calidad. Por esta razón se utilizó un método de extracción de RNA diseñado en el laboratorio del Dr. Grant Cramer (Goes da Silva y cols., 2005). Para ello, se molía alrededor de 1 gr de tejido por muestra en N<sub>2</sub> líquido con celita y se agregaban 5 volúmenes de amortiguador de extracción (Tris-HCl 200 mM pH 8,5, dodecilsulfato de litio 1,5%, LiCl 300 mM, NaEDTA 10 mM, desoxicolato de sodio 1%, Nonidet P-40 1%, ácido aurintricarboxílico 2 mM, DTT 20 mM, tiourea

10 mM y PVPP 2%). Se congelaba el homogeneizado a  $-80^{\circ}\text{C}$  por al menos 2 h. Luego, éste era descongelado lentamente en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$  y se centrifugaba a  $5.000 \times g$  por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se mezclaba el sobrenadante con 1/30 volumen de acetato de sodio 3,3 M y etanol a concentración final de 10%. Se incubaba en hielo durante 10 min y se centrifugaba en las mismas condiciones anteriores. Se mezclaba el sobrenadante con 1/9 volumen de acetato de sodio 3,3 M e isopropanol a concentración final de 33% y se mantenía a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante al menos 2 h. Posteriormente, se centrifugaba la muestra a  $5.000 \times g$  durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se resuspendía el precipitado obtenido en 3 mL de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y 1 mM EDTA), Luego, se incubaba en hielo por 30 min y se centrifugaba a  $5.000 \times g$  durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante obtenido era mezclado con 1/4 volumen de LiCl e incubado en hielo toda la noche. Después de esta incubación, las muestras eran centrifugadas a  $10.000 \times g$  durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se resuspendía el sedimento en 1,5 volumen de amortiguador TE, luego se adicionaba 1,5 volumen de acetato de potasio 5 M y se incubaba en hielo durante 3 h. Las muestras eran centrifugadas a  $10.000 \times g$  durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sedimento era resuspendido en 1mL de amortiguador TE, se agregaba 500  $\mu\text{L}$  de fenol y 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo:alcohol isoamílico (1:1) y se agitaba vigorosamente. Las muestras eran centrifugadas a  $14.000 \times g$  durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se transfería la fase acuosa a otro tubo y se le agregaba 1/9 volumen de acetato de sodio 3,3 M y 2 volúmenes de etanol, y se incubaba a  $-20^{\circ}\text{C}$  por al menos 2 h. Transcurrido este tiempo, las muestras eran centrifugadas a  $14.000 \times g$  por 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$  para precipitar el RNA, el que era lavado con etanol, secado y resuspendido en agua-DEPC.

- **3.2.3 Extracción de RNA de vid a partir de pequeñas cantidades de tejido vegetal**

Debido a que para algunas muestras resultaba muy difícil obtener grandes cantidades de tejido (Ej. Órganos aislados de la flor de vid), se adaptó un protocolo de extracción de RNA publicado por Reid y cols. (2006), para poder extraer RNA a partir de pequeñas cantidades de material vegetal. Para esto se pesaban 100 mg de tejido en un tubo de 1,5 mL, los tubos se mantenían en N<sub>2</sub> líquido hasta procesar. Se añadían 300 µL de amortiguador de extracción precalentado a 65°C. El amortiguador contenía: CTAB 2% (p/v), PVPP 2% (p/v), Tris-HCL pH8 (300mM), EDTA 25mM, NaCl 2M, spermidina trihidroclorada 0,05% (p/v), y H<sub>2</sub>O DEPC hasta completar el volumen final deseado, se autoclavaba y antes de usar se agregaba β-mercaptoetanol 2%(v/v). Se homogenizaba con un vástago plástico adaptado a un taladro portátil Dremel modelo Minimite 762, utilizando el taladro en velocidad alta por 10 seg. Una vez homogenizado el tejido, se le agregaban otros 300 µL y se agitaba manualmente. Luego se calentaban las muestras en un baño a 65°C por 10 min. Se añadía un volumen de cloroformo:AIA (24:1) y se agitaba en vortex. Se centrifugaba a 3.500 x g durante 15 min en centrífuga refrigerada. Se colectaba la fase superior y se repetía la aplicación de cloroformo:AIA y la centrifugación. Se colectaba la fase acuosa y se centrifugaba a 20.000 x g por 20 min a 4°C. Trabajando en hielo, se transfería el sobrenadante a otro tubo eppendorf y se le agregaban 0,1 volumen de NaOAc 3M y 0,6 volumen de isopropanol. Se guardaban las muestras a -80°C durante 30 min. Luego, se centrifugaba a 7.000 x g durante 30 min en centrífuga refrigerada. Se eliminaba el

sobrenadante y se resuspendía el sedimento en 500  $\mu\text{L}$  de amortiguador TE. Se agregaban 0,3 volúmenes de LiCl 8M, se agitaba invirtiendo el tubo y se dejaba precipitando el RNA durante toda la noche a 4°C.

Se centrifugaban las muestras a 20.000 x  $g$  por 30 min a 4°C. Se eliminaba la fase acuosa y se lavaba el sedimento con 500  $\mu\text{L}$  de EtOH 70% frío. Se centrifugaba por 10 min a 20.000 x  $g$ . Se eliminaba el sobrenadante, se dejaba secar el sedimento por 5 minutos con el tubo invertido en papel absorbente y a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendía el sedimento en 20  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O DEPC.

- **3.2.4 Cuantificación del RNA**

Se diluía 1 $\mu\text{L}$  del RNA purificado en 49  $\mu\text{L}$  de agua DEPC y se cuantificaba la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Shimadzu Bio-spec mini. Para calcular la concentración del RNA se utilizaba la siguiente fórmula: (Absorbancia 260 nm x factor de dilución x 40)/1000=concentración en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Además se calculaba la razón Abs 260/280 como criterio de pureza, si era menor que 1,8 indicaba contaminación con proteínas y si era mayor que 2,1, indicaba presencia de RNA degradado. El RNA se conservaba a -80 °C.

### **3.3 Síntesis de cDNA**

- **3.3.1 Tratamiento con DNasa**

Para utilizar el RNA purificado, por los distintos métodos de extracción, en reacciones de RT-PCR, se le trataba con DNasa. Para ello se incubaban 2  $\mu\text{g}$  de

RNA con 1 U/ $\mu$ g de DNasa libre de RNasa, en el medio de reacción recomendado por el proveedor, a 37°C durante 30 min y en un volumen final de 10  $\mu$ l. Luego se agregaba 1  $\mu$ l de solución EDTA 20 mM y se incubaba a 65°C por 15 min para inactivar la enzima. El RNA libre de DNA preparado de esta manera era almacenado a -80°C.

- **3.3.2 Reacción de transcripción reversa**

Para obtener los cDNAs de las muestras se utilizaba el sistema comercial de síntesis de cDNA SUPERSCRIPT II First-Strand (Invitrogen), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante y utilizando oligonucleótidos hexámeros al azar. Para ello a 5  $\mu$ L del RNA tratado con DNasa se le agregaban 50 ng de oligonucleótidos hexámeros al azar y 4  $\mu$ L de agua-DEPC. La mezcla era incubada a 70°C por 10 min, mantenida en hielo y se adicionaban 4  $\mu$ L de amortiguador de Superscript II 5X, 2  $\mu$ L de DTT 0,1 M y 1  $\mu$ L de dNTPs 10 mM. Se incubaba por 2 min a 42°C y se agregaba 1  $\mu$ L de transcriptasa reversa Superscript II. Para cada muestra de RNA se utilizaban 5  $\mu$ L del tratamiento con DNasa para realizar un control negativo en el que sólo se omitía la adición de transcriptasa reversa. La síntesis de cDNA era realizada durante 1 h a 42°C. Finalmente, la reacción era detenida por calentamiento a 70°C por 15 min.

### **3.4 Hibridación tipo northern**

Para la hibridación tipo Northern se sintetizaba una sonda radioactiva del gen a analizar utilizando un protocolo de PCR modificado. Para ello, se realizaba una mezcla de 20  $\mu\text{L}$  finales que contenía 1 ng de PCR (molde), los oligonucleótidos 5' y 3' en una concentración de 250 nM cada uno;  $\text{MgCl}_2$  2,5 mM; Tris-HCL 20 mM pH 8,4; KCL 50 mM; 2,5 U de *Taq* DNA polimerasa y los nucleótidos dATP, dGTP y dTTP en una concentración de 2,2  $\mu\text{M}$  cada uno. Se realizaba la reacción de marcación agregando 5  $\mu\text{L}$  de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP (300 Ci/mmol; 3,3  $\mu\text{M}$ ) y amplificando en termociclador por PCR. Una vez finalizada la reacción de marcación, se agregaban 40  $\mu\text{L}$  de agua tratada con DEPC y se eliminaba el nucleótido  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP no incorporado mediante la utilización de columnas cromatográficas de exclusión molecular Micro Bio-Spin que contenían la resina Bio-Gel P-6, siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. Para estimar la eficiencia de la marcación, se tomaba 1  $\mu\text{L}$  de la sonda marcada y purificada, se aplicaba sobre un trozo de papel Whatman 3MM, se secaba éste al aire durante 1 min y se le colocaba en un frasco de centelleo. Se determinaba la radioactividad en el canal de  $^{32}\text{P}$  en un contador de centelleo líquido (Beckman LS6500).

Para realizar la hibridación se separaban los RNA en geles de agarosa en condiciones desnaturantes. Se preparaban los geles de agarosa 1,2% (p/v) en solución MOPS/formaldehído 1X (MOPS 20 mM pH 7,0; acetato de sodio 5mM; EDTA 1 mM y formaldehído 0,2 M). Se tomaban 10  $\mu\text{g}$  de RNA total (resuspendidos

en agua DEPC) para cada muestra y se mezclaban con igual volumen de amortiguador de carga de RNA, que poseía la siguiente composición: MOPS 0,5X; formamida 58%; 20% (v/v) de formaldehído en solución 37%; 5% de azul de bromofenol 0,025% y 0,3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de bromuro de etidio. Se desnaturaba el RNA incubando a 65°C por 10 min y luego se colocaba en hielo hasta el momento de ser cargado en el gel. Se realizaba la electroforesis a un voltaje constante de 53 V durante 4 horas, en amortiguador MOPS 1X.

Se transfería el RNA a una membrana de Nylon por capilaridad. Para esto se colocaba en una cámara de acrílico una tira de papel Whatman 3MM embebida en una solución de SSC 20X (citrato de sodio 0.3 M pH 7.0, cloruro de sodio 3 M) de manera que los extremos del papel quedaran en contacto con la solución que se encontraba en ambos extremos de la cámara. Sobre el papel húmedo se colocaba otro pedazo de papel Whatman de un tamaño similar al del gel y sobre ambos papeles se colocaba el gel de RNAs invertido. Sobre el gel, se colocaba una membrana de Nylon (Zeta Probe® Blotting Membranes Bio-Rad) de un tamaño idéntico al gel. Sobre la membrana se colocaban tres pedazos de papel Whatman de igual tamaño a la membrana y sobre ellos varias capas de papel absorbente y un peso (1Kg aprox.) para favorecer la transferencia de RNA desde el gel hacia la membrana. Se transfería durante 20 horas a TA.

Una vez finalizada la transferencia, se exponía la membrana con los RNAs transferidos a la luz UV por un 1 min, para unir covalentemente el RNA a la membrana. Se lavaba la membrana suavemente con SSC 2X y se dejaba secar a

TA. Se guardaba la membrana en papel alusa-plast para evitar su deshidratación, hasta el momento utilizarla.

Para realizar la hibridación se colocaba la membrana de nylon que contenía los RNAs en un tubo de hibridación. Previo a la incubación con la sonda, se hibridaba previamente con una solución de pre-hibridación que contenía: SSC 5X, SDS 1%, solución Denhardt 5X, 100 µg/mL de DNA de espermio de salmón previamente desnaturalado (10 min a 95°C), EDTA 1mM y formamida 40%. Se incubaba por al menos 2 horas en un horno de hibridación a 42°C. Una vez finalizado este tiempo, se eliminaba la solución de pre-hibridación y al mismo tubo se le agregaba la sonda, previamente desnaturalada (10 min a 95°C) y diluída en solución de pre-hibridación (1.000.000 cpm/ml). Se dejaba incubando por toda la noche en un horno de hibridación a 42°C.

Una vez finalizada la hibridación, se eliminaba la solución con la sonda, se lavaba la membrana durante 15 min con una solución de SSC 2X y SDS 1%, a 42°C, y luego se lavaba 2 veces por 10 min, con una solución SSC 0,2X y SDS 0,1% en un baño a 55°C. Una vez concluidos los lavados, se envolvía la membrana húmeda en plástico (alusa-plast) y se exponía a una película de rayos X o a la pantalla del “Phosphorimager”, por 1 día o una hora, respectivamente.

Para poder utilizar la membrana nuevamente se calentaba la membrana por 20 min en una solución de SSC 0,1X y SDS 0,1% utilizada en un volumen adecuado para cubrir toda la membrana (300 a 500 mL). Finalizado el calentamiento se dejaba enfriar con agitación suave. Luego, se lavaba la membrana dos veces con SSC 2X y se chequeaba con el contador geiger que no hubiera radioactividad remanente.

### **3.5 Técnicas básicas de DNA recombinante**

- **3.5.1 Obtención de fragmentos de DNA por PCR (reacción en cadena de la polimerasa)**

Se realizaban las reacciones en un volumen final de 25  $\mu$ l y se utilizaba Taq DNA polimerasa de Invitrogen, con el medio de reacción recomendado por el proveedor y siguiendo sus instrucciones. Para las reacciones se utilizaba 1  $\mu$ l de cDNA o DNA genómico. Se agregaban 2,5  $\mu$ l de amortiguador de PCR 10X; 0,8  $\mu$ l de cloruro de magnesio 50 mM; 0,7  $\mu$ l de dNTPs 10 mM; 0,7  $\mu$ l de oligonucleótido específico 5'; 0,7  $\mu$ l de oligonucleótido específico 3'; 18,6  $\mu$ l de agua MiliQ y 0,1  $\mu$ l de Taq DNA polimerasa. Inicialmente se realizaba una etapa de desnaturación incubando la mezcla a 94°C por 3 min, luego se efectuaban 30-40 ciclos de 3 etapas: 30 s a 94°C (desnaturación), 30 s de hibridación a una temperatura dependiente de la composición de los oligonucleótidos y 30 a 180 s a 72°C (extensión). Para terminar, se realizaba una etapa final de elongación, incubando a 72°C por 5 min, y se enfriaba a 4°C hasta recuperar los tubos. Una vez finalizadas las reacciones de PCR, se analizaba el DNA mediante electroforesis en geles de agarosa.

- **3.5.2 Electroforesis de DNA en geles de agarosa**

Se separaban los fragmentos de DNA 0.08 a 10 kb mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa 0,7-4 % (p/v). Se preparaban los geles en solución TAE 1X (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1mM; pH 8,0) y se agregaba 1  $\mu$ l de una

solución de bromuro de etidio 10 mg/ml por cada 200 ml de gel. Se agregaba a las muestras  $\frac{1}{4}$  de su volumen de una solución de carga (glicerol 20%; sarcosyl 0,1%, azul de bromofenol 0,1%, EDTA 25 mM), se cargaban en el gel y se realizaba la electroforesis a 50 mA (100 V) por 15-20 min en presencia de TAE 0,5X . Finalmente, se visualizaban los fragmentos de DNA en un transiluminador UV y se fotografiaba el gel utilizando una cámara digital marca cannon modelo powershot G6.

- **3.5.3 Clonamiento de los productos de PCR**

El plásmido pGEM-T easy es un vector comercial linearizado que posee un gen de resistencia a ampicilina, un sitio de múltiple clonamiento, que tiene nucleótidos de timina libres en los extremos. Los nucleótidos de timina son complementarios con las adeninas libres presentes en los extremos 3' de los productos de amplificación, lo que permite la clonación de los fragmentos obtenidos por PCR y RT-PCR. Para realizar la reacción de ligación se utilizaban 3  $\mu$ L del PCR o 1 $\mu$ L del fragmento purificado desde geles. Se agregaba 1  $\mu$ L de pGEM-T, 1 $\mu$ L de amortiguador de ligasa 10X, 1  $\mu$ L de DNA ligasa T4 y agua ultra-pura hasta completar 10  $\mu$ L. La reacción de ligación era mantenida 3 horas a TA o toda la noche a 4°C y luego se utilizaba para transformar *E. coli* competentes.

Cuando se utilizaba el sistema de recombinación "Gateway", primero se realizaba un PCR para adicionar los sitios de recombinación attB1 (GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT) en el 5' y attB2 (GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT) en el 3', en el fragmento de interés.

Esto se hacía diseñando oligonucleótidos que contenían el sitio attB respectivo mas 20 nucleótidos que apareaban específicamente con el fragmento de interés. El PCR se realizaba con la temperatura de apareo ( $T_m$ ) correspondiente a los 20 nt específicos del fragmento. Una vez obtenida la amplificación que agregaba los sitios, se realizaba una recombinación BP, en donde se mezclaban 5  $\mu$ L de PCR, 1  $\mu$ L de vector pDONR, 2  $\mu$ L de amortiguador TE pH8 y 2  $\mu$ L de clonasa BP, se dejaba 2 H y 30 min a TA. La reacción era detenida agregando 1  $\mu$ L de proteinasa K y dejándola por 10 min a 37°C. Luego se clonaba el vector recombinado, se purificaba y se usaba para realizar la recombinación LR con el vector de destinación. Esta reacción consistía en mezclar 4  $\mu$ L de vector de entrada (Plasmidio pDONR recombinado), 3  $\mu$ L de vector de destinación, 1  $\mu$ L de amortiguador TE pH8 y 2  $\mu$ L de clonasa LR. La reacción se dejaba 2 H y 30 min a TA y luego se detenía la reacción agregando 1  $\mu$ L de proteinasa K y dejándola por 10 min a 37°C.

- **3.5.4 Transformación de células competentes con plasmidios modificados**

Para la preparación de células competentes de *E. coli* se inoculaban 10 ml de medio LB con 150  $\mu$ l de un cultivo bacteriano en fase estacionaria, y se incubaba a 37°C con agitación fuerte hasta que el cultivo alcanzara una D.O.  $_{600nm}$  de 0.5 (2 a 3 h). Una vez alcanzado este valor, se centrifugaban las células durante 10 min a 2.000 x g en tubos de polipropileno de 50 ml. Se resuspendía el sedimento celular en 3 ml de una solución estéril y fría de TFB (K-MES 10mM pH 6.2; RbCl 100 mM;

MnCl<sub>2</sub> 45 mM; CaCl<sub>2</sub> 10 mM, HAcCoCl<sub>3</sub> 3mM), se mantenía en hielo durante 15 min y se centrifugaba en las mismas condiciones anteriores. A continuación, se resuspendían las células en 720 µl de TFB frío y se adicionaban 25 µl de DMSO, se agitaba y se dejaba en hielo durante 5 min. Luego se adicionaban 25 µl de DTT 2.25 M, se agitaba rápidamente y se dejaba en hielo por 10 min. Se volvía a adicionar 25 µl de DMSO y se dejaba en hielo por 5 min. A partir de este momento se consideraban las bacterias como competentes para la transformación.

Se utilizaban 10 µL de la reacción de ligación en pGEM-T o 5 µL de una reacción de recombinación para 100 µL de células DH5α competentes por CaCl<sub>2</sub>. Las células se descongelaban en hielo por 30 min. Posteriormente, eran incubadas a 42°C por 40 seg y luego mantenidas en hielo por 3 min. Se adicionaban 200 µL de medio LB y se incubaban a 37°C en agitación por 1 h. El cultivo era sembrado en placas LB con el antibiótico de selección adecuado (ampicilina 100µg/ml, espectinomicina 50 µg/ml, gentamicina 25µg/ml o kanamicina 50 µg/ml), 40 µL de X-gal 20 mg/mL y 8 µL de IPTG 100 mg/ml. Las placas eran incubadas en estufa a 37°C toda la noche. Las colonias que poseían inserto (colonias blancas) eran seleccionadas. Éstas eran analizadas por PCR para confirmar la presencia de los insertos de interés. Para ello se tocaba con una punta estéril la colonia a analizar, y se introducía luego la punta en un tubo que contenía 12µl de mezcla de reacción de PCR. Luego de mezclar, se realizaba la reacción de PCR en las condiciones descritas previamente. Finalmente se analizaban los fragmentos obtenidos por electroforesis en geles de agarosa. Las colonias bacterianas aparentemente

positivas por PCR se hacían crecer en medio LB líquido y se procedía a purificar el plásmido.

- **3.5.5 Obtención de DNA plasmidial a partir de cultivos bacterianos**

Se crecían las cepas de *E.coli* (DH5 $\alpha$ ) que contenían los plásmidos de interés en medio líquido LB (bactotripton 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L) a 37°C con agitación y en presencia del antibiótico adecuado (ampicilina 100 $\mu$ g/ml, espectinomicina 50  $\mu$ g/ml, gentamicina 25 $\mu$ g/ml o kanamicina 50  $\mu$ g/ml). Se purificaban los plásmidos a partir de 3 ml de cultivo de bacterias, siguiendo el procedimiento recomendado por el proveedor del sistema comercial AXYGEN que se basa en el método de la lisis alcalina (Birnboim, 1988). Este método permite preparar en forma simple y rápida 5 a 18  $\mu$ g de plásmido, el que puede ser analizado con enzimas de restricción, por secuenciación y por PCR.

- **3.5.6 Digestión de plásmidos con enzimas de restricción**

Para las digestiones analíticas, se incubaba el DNA (0,2 a 1,0  $\mu$ g) con 1 U de la enzima de restricción en un volumen final de 10 $\mu$ L, durante 2 h a 37°C y en presencia de la solución de reacción recomendada por el fabricante de la enzima. Los fragmentos de DNA obtenidos eran separados por electroforesis en geles de agarosa

- **3.5.7 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con plásmidos modificados**

Para la preparación de células competentes de *A. tumefaciens*, se inoculaban 50 ml de medio LB que contenía rifampicina (50 µg/ml) y Gentamicina (25 µg/ml), con 1 ml de un cultivo saturado de *A. tumefaciens* (cepa GV3001) y se incubaba a 28°C con agitación (120 rpm) hasta que el cultivo alcanzara una D.O.<sub>600nm</sub> de 0,5 (12 h). Se enfriaban las células en hielo por 10 min y se centrifugaban durante 10 min a 3.000 x g en tubos de polipropileno de 50 ml. Se resuspendía el sedimento celular en 1 ml de una solución estéril y fría de CaCl<sub>2</sub> 20 mM y se mantenía en hielo durante 15 min. A partir de este momento se consideraban las bacterias como competentes para la transformación. Las bacterias eran mezcladas con glicerol (concentración final 14% v/v), se ponían en alícuotas de 100 µl en tubos eppendorf, se congelaban en N<sub>2</sub> líquido y se las almacenaba a -80°C. Para la transformación, se tomaba un tubo con células competentes, se descongelaban en hielo y se les agregaba 1 µg de plásmido, se congelaba en N<sub>2</sub> líquido por 5 minutos. Luego se colocaban a 37°C durante 5 min. Después se traspasaban las células a un tubo con 1 ml de LB y se incubaba por 3h a 28°C, con agitación. Se sembraba una fracción de este cultivo (100-200 µl) en placas LB-agar con los antibióticos adecuados y se incubaba 48h a 28°C hasta que las colonias fueran visibles.

Para verificar la presencia del plásmido en las bacterias resistentes, estas se analizaban por PCR.

### **3.6 Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* por el método de inmersión floral.**

Para transformar plantas de *Arabidopsis* se seguía el procedimiento descrito por Clough y Bent en 1998. Las plantas eran crecidas en tierra, y cuando los tallos principales alcanzaban unos 10 cm de altura eran cortados, para inducir el crecimiento de más tallos laterales. Se inoculaban 2 ml de medio LB con los antibióticos correspondientes con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* transformado con las construcciones correspondientes. Se dejaba crecer por 2 días a 28 °C con agitación, se inoculaban 200 ml del mismo medio con 1 ml del precultivo y se dejaba crecer por 24h a 28°C con agitación. Se recolectaban las bacterias por centrifugación a 5.000 x g durante 20 min a 20°C, y se resuspendía el sedimento bacteriano en medio 300 ml de transformación (sacarosa 5% p/v; Silwet L-77 0,05% v/v). Para la transformación, se ponían los 300 ml de *Agrobacterium* en un recipiente de boca ancha (magenta) con un agitador magnético, para que el medio con las bacterias fuese homogéneo. Se tomaban las plantas y se las sumergía enteras (incluida la roseta) durante 10-15 seg en la suspensión bacteriana. Las plantas eran mantenidas en cajas plásticas transparente para mantener la humedad, y luego de 15 días se recolectaban las semillas diariamente durante 1 semana (generación T1). Estas semillas se dejaban secar por al menos una semana a TA y luego se sembraban en medio MS con el antibiótico de selección o se almacenaban a 4°C hasta ser utilizadas. Por ejemplo, en el caso de que se usara higromicina, este antibiótico se agregaba en una concentración de 10-20 mg/L. Luego de 15 días

creciendo en este medio, las plántulas derivadas de semillas silvestres no desarrollaban hojas verdaderas y los cotiledones tenían apariencia etiolada. En cambio, las plántulas derivadas de semillas transgénicas poseían hojas verdaderas de color verde. Estas últimas eran traspasadas a maceteros con tierra, siguiendo el mismo protocolo que se describió en el punto 3.1.

### **3.7 Clonamiento de genes *MADS-BOX* de la clase B en *Vitis vinifera***

Para clonar genes de la clase génica de floración B, se comenzó aislando el cDNA del homólogo a *PISTILLATA* en cDNA de vid. Para esto se alineó la secuencia de *PISTILLATA* de *Arabidopsis thaliana* con sus ortólogos de manzana (*Malus domestica*) y *Anthirrinum majus* usando el programa computacional vector NTI (Invitrogene, USA) con el algoritmo Clustal W, módulo AlignX (Todos los alineamientos realizados posteriormente se realizaron con este programa y algoritmo). Se identificaron zonas conservadas en los extremos 5' y 3' de las secuencias y se diseñaron oligonucleótidos degenerados. El oligonucleótido 5' MADS1 era complementario a la zona 5' del dominio MADS y el oligonucleótido 3' MADS2 fue complementario a la zona 3'. Se realizó una amplificación por PCR en cDNA de flores de vid inmaduras con las siguientes características: desnaturación inicial por 4 min a 94 °C; luego 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55° y 72°C por 2 min; finalmente una etapa de extensión de 5 min a 72 °C. Se cortaron las bandas de tamaños esperados desde el gel de agarosa, luego se purificaron y se clonaron en el vector de clonamiento pGEM-T Easy, se secuenció con los oligonucleótidos

universales M13 5' y 3'. Se obtuvieron clones similares a *PISTILLATA* y *TM6* que se denominaron *VvPI* y *VvTM6*. Luego se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada gen, se amplificaron, clonaron y secuenciaron hasta obtener un consenso. La secuencia obtenida para *VvTM6* se comparó con un consenso tentativo (TC) altamente similar a *TM6* obtenido de la base de datos TIGR de vid (TC38893). Se diseñaron oligonucleótidos específicos para la región codificante *VvTM6* (F) y *VvTM6* (R). Para obtener la región 3' UTR de la secuencia de *VvPI* se realizó 3' RACE (Invitrogen), en donde el cDNA se sintetiza utilizando oligo dT unido a un adaptador y luego se realizó un PCR con el oligonucleótido específico *VvPI3* y un oligonucleótido 3' complementario al adaptador utilizado en la síntesis de cDNA. Las condiciones utilizadas fueron las recomendadas por el fabricante.

La secuencia genómica completa de *VvPI* fue obtenida a partir de DNA genómico de vid usando los oligonucleótidos 5' *PID3* y 5' *VvPI3UTR*. Para obtener la zona 5'UTR de *VvPI* se realizó TAIL-PCR en DNA genómico, usando las condiciones descritas por Liu y Huang en 1998 y señaladas a continuación. Se usaron seis oligonucleótidos degenerados AD1, AD2, AD5, AD6, AD7 y AD10 y los siguientes oligonucleótidos que alineaban dentro de la región 5': Tail0, Tail1, Tail2, y Tail3. Luego de 3 reacciones de PCR usando las combinaciones AD7-Tail2 y AD7-Tail3 se obtuvieron 2 fragmentos de 400 y 300 pb respectivamente. Estos fragmentos fueron clonados en el vector pGEM-T Easy y luego se secuenciaron.

Para amplificar un homólogo a *AP3* se utilizó un TC (consenso tentativo de secuencias) altamente similar obtenido de TIGR (TC54810), se utilizaron los oligonucleótidos *AP3*(F) y *AP3*(R). El fragmento de tamaño esperado fue purificado y

clonado en pGEMT-Easy y seis clones independientes fueron secuenciados usando los oligonucleótidos universales M13.

### **3.8 Alineamientos y reconstrucción filogenética de los genes *B* de *vides***

Las secuencias aminoacídicas deducidas de VvPI, VvTM6 y VvAP3 fueron alineadas con las secuencias de otras 31 secuencias obtenidas de la base de datos de secuencias aminoacídicas de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Protein&itool=toolbar>), para el alineamiento se utilizó el módulo ClustalWalgorithm-basedAlignX®, del programa computacional Vector NTI Suite 8.0 (Invitrogen, USA). Este alineamiento se realizó utilizando sólo los residuos conservados y filogenéticamente informativos de las secuencias (174 aminoácidos de los dominios MADS, Intervening y Kerantin like) (Vandenbussche y cols., 2003). Las secuencias se importaron al programa MEGA versión 3.1 (Kumar y cols., 2004), y se reconstruyó un árbol filogenético utilizando el algoritmo de vecino mas próximo (Neighbor Joining). Los nodos del árbol fueron evaluados por análisis de bootstrap (Felsenstein, 1992) con 1000 réplicas.

### **3.9 Análisis del número de copias de los genes *B* en el genoma de la *vid***

Para realizar este análisis se utilizó la información de la secuenciación del genoma de la *vid* (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir), de una línea altamente homocigota, publicada por un consorcio Franco-Italiano (Jaillon y cols., 2007), y un grupo Italiano

(Velasco y cols., 2007). Las secuencias están disponibles tanto en NCBI como en una página web del consorcio Franco-Italiano (Genoscope: <http://www.genoscope.cns.fr/spip/Projects.html>). Se realizó una búsqueda del tipo BLAST con cada una de las secuencias B, en la base de datos del genoma de la vid disponible en NCBI (Velasco y cols., 2007). Utilizando tanto la secuencia nucleotídica completa, como la región correspondiente al dominio MADS de *VvPI*, *VvAP3* y *VvTM6*. Los resultados se corroboraron y complementaron utilizando las secuencias del genoma liberado por el consorcio Franco-Italiano. Con estas herramientas también se detectaron las secuencias genómicas de los genes y las estructuras intrón y exón de *VvAP3* y *VvTM6*.

### ***3.10 Análisis microscópico del desarrollo de la inflorescencia en vid***

Se colectaron muestras de inflorescencias o flores simples maduras de vid cv Cabernet sauvignon cada dos semanas, comenzando 4 semanas después de la hinchazón de la yema (SPHY) y finalizando cuando la caliptra se había caído de todas las flores a las 14 semanas. La mitad de cada muestra fue congelada en N<sub>2</sub> líquido para extracción de RNA y el resto se fijó en 5% ácido acético glacial; 3,7% de formaldehído y 50% de etanol. Las muestras fueron sometidas a vacío y luego a una serie diluciones crecientes de etanol hasta su completa deshidratación (100% EtOH). Luego fueron embebidas en parafina y cortadas en secciones de 6–8 µm para luego ser teñidas con Safranina y Fast Green como describió Johansen en 1940.

### **3.11 Cuantificación de la expresión de genes en diferentes tejidos, desarrollo floral, frutal y en los distintos órganos de la flor de la vid.**

Se cuantificó la expresión relativa de genes mediante la técnica de PCR en tiempo real ó qRT-PCR. Para detectar amplificación se utilizó Brilliant® SYBR® Green QPCR Master Reagent Kit (Stratagene) y el termociclador de tiempo real de Stratagene modelo Mx3000P según las instrucciones del fabricante. En los experimentos de PCR en tiempo real es necesario escoger un gen normalizador, que generalmente es un gen constitutivo que permite normalizar cada muestra por su cantidad inicial de cDNA. Por otro lado, se elige una condición calibradora que dependerá de cada experimento y que permite comparar entre las muestras teniendo un valor de referencia, como por ejemplo un tiempo cero, una muestra sin tratamiento, etc. En nuestros experimentos como gen constitutivo para la normalización se utilizó el gen de la *UBIQUITINA1* (TC32075, TIGR database), ya que se había descrito en la literatura que su expresión podía utilizarse como control en el desarrollo de órganos de la vid (Downey y cols., 2003; Reid y cols., 2006). La mezcla de PCR contenía 25 µl totales, en donde se colocaban 2.0 µl de cDNA (diluido 1 en 10) y 140 nM de cada oligonucleótido, la amplificación se realizaba con las siguientes condiciones: 95 °C por 10 min para activar la polimerasa, luego 40 ciclos de 94 °C por 30 seg; 55 °C por 40 seg y 72 °C por 40 seg. Luego, se realizaba una curva de disociación desde 55 °C a 95 °C. La expresión génica era calibrada según la expresión génica en el tejido o estadio de desarrollo que tenía una menor expresión. Este tejido se elegía tomando el valor de ct (ciclo umbral) para el gen en

un tejido dado y restándole el ct para el gen constitutivo en ese mismo tejido. Resultados más altos indicaban menores expresiones. En este tejido la expresión tenía un valor de 1 y la expresión en el resto de los tejidos se considera relativa a 1.

Previamente, para calcular la eficiencia de cada oligonucleótido, se realizaban diluciones seriadas de los productos de PCR para cada gen amplificado con esos oligonucleótidos. El valor de ct de cada dilución era graficado y la pendiente de la curva obtenida era utilizada para calcular la eficiencia según la siguiente ecuación,

Eq1:

$$E = \text{Eficiencia} = (10^{(1 - \text{pendiente})}) - 1$$

Este valor de eficiencia era utilizado para obtener una razón precisa entre la expresión del gen de interés (GOI) y la del constitutivo usando la siguiente ecuación,

Eq2:

$$\frac{(1 + E_{GOI})^{-\Delta Ct}}{(1 + E_{UBI})^{-\Delta Ct}} = \frac{(1 + E_{GOI})^{-(Ct_{GOI} - Ct_{GOI \text{ calibrador}})}}{(1 + E_{GOI})^{-(Ct_{UBI} - Ct_{UBI \text{ calibrador}})}}$$

En todos los casos la especificidad de la amplificación fue comprobada por la presencia de un único pico en las curvas de disociación, por presencia de una única

banda en geles de electroforesis al 3% y e algunos casos por clonamiento y secuenciación del fragmento amplificado.

Para analizar diferencias estadísticas se realizó ANOVA de una vía, usando los análisis de normalidad de Kolmogorov–Smirnov y Cochran, y el análisis de Hartley y Bartlett para verificar homogeneidad de varianzas. Los análisis estadísticos fueron realizados usando la opción de modelo general lineal en el programa computacional estadísticos STATISTICA (version 6.0; StatSoft Inc., Tulsa, OK). Cuando se comparó más de dos grupos muestrales, y las diferencias en las medias fueron estadísticamente significativas se realizó una prueba de Tukey (HSD).

### ***3.12 Experimento de polinización en campo de Vitis vinifera (cv. Red globe y Moscatel)***

Para evaluar la influencia de la polinización, en la expresión de los genes B, se contó con dos experimentos de campo. En el primero se utilizó la variedad de vid Moscatel, en donde se escogieron 4 racimos de inflorescencias al azar, y en un período en el que la caliptra estaba aún adherida a las flores, ésta se removió del receptáculo, en conjunto con las anteras de los estambres (Emasculación). Dos días después, se escogieron al azar la mitad de las inflorescencias y cada flor (aprox. 300 por inflorescencia) se polinizó con polen maduro, que había sido colectado de la misma especie (de flores que se encontraban en un estado de madurez mas avanzado), la otra mitad de las inflorescencias se dejó sin polinizar. En los dos grupos experimentales, las inflorescencias se dejaron cubiertas con bolsas de papel

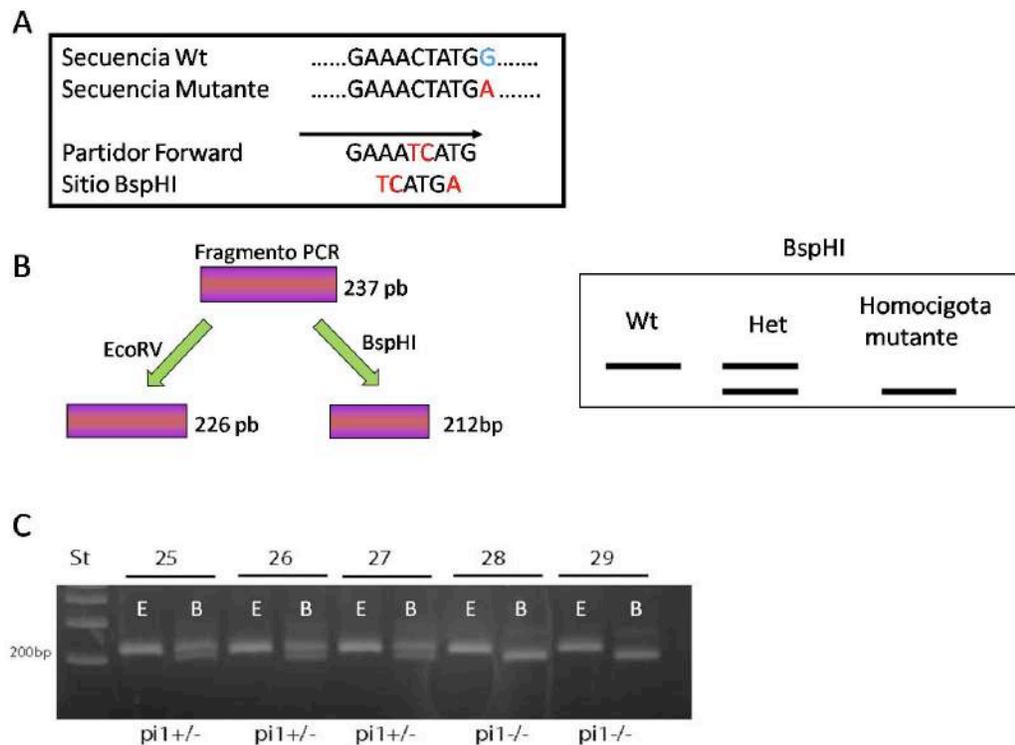
para evitar polinización cruzada no deseada. Ocho días después de la polinización, las inflorescencias fueron colectadas, se extrajo RNA de cada grupo, se sintetizó cDNA y se realizaron experimentos de expresión génica mediante RT-PCR en tiempo real.

Para tener una idea temporal del proceso, se realizó el mismo experimento de emasculación, ahora en la variedad de uva de mesa cv. Red Globe. En este experimento hubo 3 grupos experimentales: Inflorescencias emasculadas; Inflorescencias emasculadas y polinizadas y un grupo control que correspondía a inflorescencias sin manipulación, que eran colectadas en las mismas fechas que las manipuladas. Cuando las flores estuvieron en condiciones adecuadas (caliptra totalmente adherida y fresca) los dos primeros grupos fueron emasculados y cubiertos con bolsas de papel. Cinco días después (T0), cuando se observó visualmente que el estigma había madurado, se polinizó flores de la mitad de las inflorescencias emasculadas. Luego, se procedió a colectar racimos de inflorescencias inmediatamente después de emasculación y a los 8 y 16 días después de la polinización, en donde se colectaba 1 a 2 racimos por cada tiempo y muestra. Las muestras eran agrupadas y procesadas para extraer RNA y sintetizar cDNA. Finalmente, se realizaron experimentos de RT-PCR en tiempo real para determinar el patrón de expresión de los genes *VvPI* y *VvTM6* en los grupos de muestras. Para analizar los datos y poder compararlos entre sí, se decidió calibrar contra la expresión de cada gen en las flores emasculadas justo después de la emasculación (T0), de esta manera se podía comparar la expresión del gen tanto en el “eje” tiempo, como entre las muestras.

### **3.13 Expresión constitutiva de VvPI en plantas de Arabidopsis mutantes para el gen PISTILLATA (pi-1)**

La secuencia codificante completa de VvPI se amplificó usando cDNA de flores de vid usando los oligonucleótidos (F)PIIn y (R)PIfin2 que introdujeron los sitios de restricción BgIII y PmlI en las regiones terminales 5' y 3' del gen respectivamente. Se introdujo el fragmento amplificado en el vector pCAMBIA1302, que había sido tratado previamente con las enzimas BgIII y PmlI para remover la secuencia del gen GFP. Se incorporó la secuencia codificante de VvPI bajo el control del promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor 35S. Se transformó plantas silvestres de Arabidopsis, usando el método de transformación de Arabidopsis por inmersión descrito anteriormente. Se rescataron las semillas de las plantas transformadas y se sembraron en medio MS al 50% de la concentración, sacarosa 30 gr/L e higromicina a una concentración de 25mg/L. Las líneas transgénicas se verificaron por PCR y secuenciación usando los oligonucleótidos (F)35Sin que amplificaban desde el promotor 35S y (R)PID4. La expresión del transgén se verificó por RT-PCR. Las plantas transgénicas se utilizaron como dadoras de polen para polinizar plantas homocigotas para la mutación pi-1. De este cruce se originaron plantas heterocigotas para la mutación, se permitió que estas plantas se autopolinizaran. Las semillas obtenidas de la autopolinización fueron germinadas en el mismo medio de selección y genotipificadas por amplificación por PCR usando los oligonucleótidos (F)GPI-1 y (R)PIIntron-I1, luego se digirió con las enzimas de restricción BspHI y EcoRV, como describieron Riechmann y Meyerowitz el año 1997 y se corrió la digestión en gel de

agarosa al 4%. Con este método se pudo distinguir las plantas silvestres, heterocigotas y homocigotas para la mutación, ya que se observaban distintas bandas en los distintos genotipos: una de 237pb en las plantas silvestres; una banda de 226 pb y otra de 212 pb en las heterocigotas y sólo la banda de 212pb en las homocigotas mutantes (Fig. N°4). Posteriormente, se verificó la transgenia en plantas mutantes mediante PCR. Las plantas transgénicas complementadas fueron analizadas bajo una lupa Nikon SMZ800, y preparadas para microscopía electrónica de barrido. Las muestras fueron fijadas en buffer de cacodilato 1% (pH 7.2) y glutaraldehído 3% por 24 h a TA como describieron Larrey y cols., en 1997. Luego, se deshidrataron en una serie de etanol y acetona 100%. Se secaron las muestras hasta punto crítico, se cubrieron con oro y se observaron en microscopio de barrido Jeol JSM-25-SII SEM.



**Figura número 4: Genotipificación de mutantes *pi-1* por PCR y digestión enzimática.**

A) Se muestra la mutación puntual existente en las mutantes alélicas *pi-1* en el gen PISTILLATA, el partidor forward que se utiliza incorpora dos cambios de nucleótidos que en conjunto con la mutación forman el sitio de restricción bspH1.

B) A la izquierda se representa el fragmento amplificado y los fragmentos generados por restricción enzimática con las enzimas EcoRV y BspHI. EcoRV digiere tanto en el alelo mutante como silvestre y esa banda se usa como referencia de tamaño. BspHI sólo digiere los alelos mutantes. A la derecha se representan las posibles bandas obtenidas por digestión con BspHI.

C) Ejemplo de las bandas obtenidas por digestión con ambas enzimas y la genotipificación de plantas heterocigotas y mutantes.

### **3.14 Determinación de la localización sub-celular de proteínas: Construcción de plasmidios de expresión y agroinfiltración en Tabaco**

Por PCR se adicionaron los sitios attB1 y 2 a la zona del marco de lectura abierto de *VvPI* y *VvAP3*, sin considerar sus codones de término. Para eso se utilizaron los pares de oligonucleótidos: AttB1ORFVvPI + attB2ORFVvPI y AttB1ORFVvAP3 + attB2ORFVvAP3, cuyas secuencias se señalan en la tabla N°1. Los fragmentos amplificados fueron recombinados por la clonasa BP en el plasmidio p207. El plasmidio recombinado fue clonado en *E. coli* competente y de los clones positivos por PCR se purificó plasmidio para realizar una recombinación LR con el plasmidio pK7FWG2, que es un plasmidio de fusión traduccional que agrega la secuencia codificante para la proteína fluorescente verde GFP luego del final de la secuencia de interés. Estos vectores de expresión modificados fueron utilizados para transformar *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV3101) y las bacterias transformadas se utilizaron para agroinfiltrar hojas de Tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi). Para esto se utilizó un protocolo propuesto por Sparkes y cols. (2006). En donde se utilizaron plantas de 5-6 semanas de edad y se infiltraron al menos 2 hojas largas por planta, que correspondían a la tercera o cuarta desde el meristema apical. El medio de Agroinfiltración consistía en MES 50 mM, NaPO<sub>4</sub> 2 mM, D-Glucosa 26 mM, acetosiringona 0,005 mM y agua destilada.

Se crecía la bacteria en 20 mL de medio LB con los antibióticos de selección (Rifampicina 50 mg/L, Gentamicina 25 mg/L y espectinomicina 100 mg/L) durante una noche a 28°C en agitación. Se centrifugaba por 10 min a 1000 x g a TA. Se

removía el sobrenadante y se resuspendía el sedimento en 10 mL de medio de infiltración. Se repetía la centrifugación y se volvía a resuspender. Se medía la densidad óptica del cultivo a 600 nm, y se utilizaba en una D.O. de 0.01 a 0.1. Se infiltraba el lado abaxial de las hojas utilizando jeringas de tuberculina de 1 mL sin aguja. Se dejaban las plantas en condiciones de crecimiento normal en invernadero de 3 a 5 días y se analizaba la fluorescencia en microscopio de barrido laser confocal Olympus Fv1000. Para visualizar la fluorescencia se utilizaba filtro de GFP y rodamina

### **3.15 Identificación de otros genes relacionados a la vía de floración en vid y determinación de sus patrones de expresión.**

En esta parte de la tesis nuestro interés radicaba en identificar genes de vid involucrados en el proceso de floración y que se encontraran ya sea río arriba o río abajo de los genes B ya identificados. De esta manera se quiso describir sus patrones de expresión, para caracterizar con mayor precisión la dinámica de expresión de una red de genes involucrados en este proceso en las vides. Se escogieron los genes que habían sido descritos en vides: *VFL* (*VvLFY*), *VvMADS2* (*VvSEP1*), *VvMYB24* y *VvGAI*. Para identificar genes relacionados con floración que no se hubieran descrito en vides, primero se ubicaba el homólogo en *Arabidopsis*, se tomaba su secuencia de cDNA y se realizaba un alineamiento tipo Blast en el genoma de la vid (Genoscope). Luego, los resultados con alta homología, se analizaban, se veía cuál era su anotación en el genoma y se escogía sólo los que estuvieran anotados como homólogos al gen de interés. Los que no tenían anotación probable se descartaban. Luego, se tomaba la misma secuencia y se realizaba un alineamiento tipo Blast en la base de datos de secuencias expresadas (ESTs) de la vid (TIGR). Si la secuencia era encontrada entonces era utilizada para diseñar oligonucleótidos para RT-PCR en tiempo real, ya que la presencia de ESTs, confirmaba que esa era una secuencia que efectivamente se expresa en la vid. Luego de diseñar los oligonucleótidos, el fragmento a amplificar era ahora utilizado para realizar un alineamiento tipo Blast contra el genoma, con el fin de desechar la posibilidad de que se pudiera amplificar fragmentos correspondientes a otros genes

no deseados. En los casos de *VvGAI*, *VvSPY* y *VvNAP*, el fragmento amplificado fue clonado y secuenciado para verificar que se estaba amplificando un fragmento específico del gen deseado. Además, durante el RT-PCR en tiempo real se realizaban curvas de disociación (Melting) para verificar que se estuviera amplificando un único fragmento, en estas curvas el programa computacional de RT-PCR en tiempo real entrega temperaturas de disociación para cada fragmento amplificado en la muestra, esta temperatura dependerá del tamaño del fragmento y de su composición en nucleótidos G y C. Los oligonucleótidos utilizados para cada gen se encuentran en la tabla N°1.

### ***3.16 Diseño de construcciones de silenciamiento para los genes B y transformación genética de S. lycopersicum y V. vinifera***

- ***3.16.1 Diseño de construcciones de silenciamiento para los genes MADS-box clase B***

Para realizar las construcciones de silenciamiento en todos los casos se adicionó por PCR los sitios attB1 y attB2 en las zonas de los genes que se utilizarían para silenciar. En todos los casos la zona a amplificar correspondía a una región de la zona 3' del gen que podía contener o no parte del 3'UTR, con el fin de utilizar las zonas menos conservadas entre las proteínas MADS-box y así evitar posibles silenciamientos de otros genes relacionados. Para la construcción de silenciamiento de *VvTM6* se utilizaron los siguientes oligonucleótidos attB1*VvTM6* y attB2*VvTM6*, que amplifican 271 pb que corresponden a 37 nucleótidos del final del marco de

lectura abierto y 234 que pertenecen a la zona 3'UTR del gen. Para el caso de PI de *A. thaliana* se utilizaron los oligonucleótidos attB1AtPI (F2) y attB2AtPI (R2) que amplifican 271 nucleótidos en donde los 82 primeros son de la zona final del marco de lectura abierto y 190 incluyen parte de la zona 3'UTR del gen. Para realizar la construcción de silenciamiento de VvPI se amplificó un fragmento de 250 pb a partir de cDNA, desde los nucleótidos 390 al 639, lo que corresponde a la región 3' de la región codificante del gen, para ello se utilizaron los oligonucleótidos attB1VvPI y attB2VvPI. Para el caso de PI de tomate se adhirieron los sitios attB a un fragmento de 315 pb, desde los nucleótidos 495 al 809 del cDNA del gen, lo que comprende tanto a una parte de la zona 3' como de la zona 3'UTR del gen. En todos los casos los fragmentos que contenían los sitios attB fueron recombinados en el plásmido p221, mediante clonasa BP, luego los plasmidios fueron recombinados con el vector de silenciamiento pHELLSGATE 12 (CSIRO, Australia), en donde cada fragmento se recombina en sentido y antisentido, para formar una horquilla de silenciamiento. El vector final fue incorporado en *A. tumefaciens* que se utilizó para transformar las distintas especies vegetales según correspondiera. Las plantas transgénicas fueron seleccionadas por resistencia a kanamicina (20 a 50 mg/L) o paranomicina (25 mg/L).

- **3.16.2 Transformación genética de Tomate (*S. lycopersicum*)**

La transformación genética de tomate se realizó utilizando *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101, previamente transformada con la construcción de silenciamiento Hellsgate-LePI. Para esto se optimizó una técnica de transformación

previamente descrita (Pozueta-Romero y cols., 2001) la que se basa en la obtención de plantas transgénicas mediante regeneración *in vitro* vía organogénesis somática.

Como explantes iniciales se utilizaron cotiledones de tomate variedad "Ailsa Craig", estos explantes se expusieron durante 15 minutos con el cultivo de *Agrobacterium* modificado a D.O. 0,6 a 600 nm. Los cotiledones transformados se co-cultivaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con acetosiringona (200 µM), durante 2 días en oscuridad a 26 °C. Posteriormente, los explantes fueron transferidos a un medio de selección: medio MS (50% sales) más los antibióticos Timentín (300 mg/L), que se utiliza para eliminar la bacteria y Kanamicina (20mg/L) Este medio también estaba suplementado hormonalmente con 1mg/L Bencilaminopurina y 0,1mg/L de Acido indol-acético para inducir la generación de brotes. Luego, los brotes que habían alcanzado 2 cm de altura, se removían, se trasferían a medio MS (0,5X) mas Timentín (300mg/L) y Kanamicina (30mg/L), sin suplemento exógeno de hormonas, lo que inducía la elongación de los brotes. Luego de 3 semanas, los brotes se transferían a un medio MS (0,5X) con Timentín (300mg/L) y Kanamicina (40mg/L) mas 5mg/L de ácido indolbutírico), lo cual indujo la generación de raíces en las posibles plantas transgénicas. En aquellas plantas en las que ocurrió enraizamiento se extrajo DNA para luego verificar su transgenia por PCR.

- **3.16.3 Transformación genética de *V. vinifera***

Para realizar transformaciones genéticas de vides se utilizó un protocolo de transformación adaptado en nuestro laboratorio por Agnes Cadavid, que consistió en

la transformación de callos embriogénicos obtenidos a partir de anteras y ovarios aislados de flores (Franks y cols., 1998; Cadavid-Labrada y cols., 2008). Los callos embriogénicos con embriones somáticos en estado globular eran sumergidos en una suspensión bacterial de *A. tumefaciens*, que había sido crecida durante toda una noche en medio LB enriquecido con antibióticos de selección (50 mg/L Gentamicina y 10 mg/L Rifampicina para la cepa de *Agrobacterium* GV3101 y para el plasmidio pHellsgate12 50 mg/L Espectinomicina). La suspensión bacterial consistía en medio GS1CA líquido, macro y microelementos del medio NN (Nitsch y Nitsch, 1969), modificado con 100  $\mu$ M de acetosiringona a una densidad óptica a 600 nm entre 0,6 y 0,7. La suspensión estaba en contacto con los explantes por 15 min a 28 °C en agitación a 90 rpm. Después de la infección, el cultivo de embriones somáticos era secado con papel absorbente. Posteriormente, los embriones eran transferidos a medio de co-cultivo (GS1CA con 100  $\mu$ M de Acetosiringona) durante 48 h a 28 °C y en oscuridad. El exceso de *Agrobacterium* era removido, lavando 4 veces los callos embriogénicos con medio de cultivo de proliferación estéril GS1CA líquido modificado conteniendo 1 mg/ml del antibiótico Timentin, el que inhibe el crecimiento de *Agrobacterium*. Los callos embriogénicos eran colectados del medio de cultivo líquido, usando filtros de 100  $\mu$  (Nylon Net Filter) y cultivados en medio de cultivo sólido GS1CA con 1 mg/ml de Timentin en oscuridad a 25 °C. Después de 30 días, los callos embriogénicos eran sub-cultivados sobre el mismo medio de cultivo con 25 mg/L de Paranomicina durante 30 días, permitiendo la proliferación del callo sobre medio de selección. Luego de 60 días de la inoculación, los callos embriogénicos eran sub-cultivados sobre el medio GS1CA libre de hormonas con 1 mg/ml de

Timentin y 25 mg/L de Paranomocina, que permite diferenciar entre las plantas que habían adquirido la resistencia conferida por el plasmidio y las que no lo habían hecho. Los callos eran mantenidos durante 30 días en oscuridad a 25 °C. Transcurrido este tiempo, embriones somáticos en estadio torpedo y embrión maduro, eran cultivados por otros 30 días, en medio de germinación de embriones, compuesto por los microelementos y la mitad de la concentración de los macroelementos del medio MS, vitaminas MS, 30 g/L sacarosa, 2,5 g/L carbón activado (Merck), a pH 5,8, 5 g/L gelrite (Sigma-Aldrich Co.), 10 µM IAA, 1 µM GA3. Los cultivos eran mantenidos a 25°C, con 16 h de fotoperíodo y densidad del flujo de fotones de 40 µmols-1m-2.

Los embriones germinados, en los cuales se visualizaba una estructura bipolar con un eje radical-apical, elongación del hipocotilo y cotiledones verdes, se subcultivaban en medio Murashige y Skoog a la mitad de la concentración de las sales con 20 g/L sacarosa, pH 5,8 ajustado con NaOH y 7,0 g/L Agar (Merck).

### **3.17 Números de acceso de las secuencias utilizadas en orden alfabético**

*AmAG* (*A. majus*, CAB42988), *AmAP1* (*A. majus*, CAA45228), *AmAP3* (*Antirrhinum majus*, X52023), *AmPI* (*A. majus*, CAA48725), *AtAP1* (*A. thaliana*, AAM28457), *AtAP3* (*Arabidopsis thaliana*, AF115814), *AtPI* (*A. thaliana*, AAF15284), *CmAP3* (*Chrysanthemum x morifolium*, AAO22985), *GhTM6* (*Gerbera hybrid*, CAA08803), *HmAP3* (*Hieracium piloselloides*, AAD53326), *HmTM6* (*Hydrangea macrophylla*, AF230703), *LeAG* (*S. lycopersicum*, AAM33099), *LeTM6* or *SITM6*

(*Solanum lycopersicum*, X60759), *LjAP3* (*Lotus japonicus*, AAX13301), *LrAP3* (*Lilium regale*, BAB91550), *LrPI* (*L. regale*, BAB91551), *MdPI* (*M. domestica*, BAC11906), *MdTM6* (*Malus domestica*, AB081093), *MfAP3*, *Michelia figo*, AF052877), *NbTM6* (*Nicotiana benthamiana*, AY577817), *NtPI* (*Nicotiana tabacum*, CAA48142), *OsPI* (*O. sativa*, AAC05723), *PbTM6* o *PTD* (*Populus balsamifera*, AF057708), *PhAG* (*Petunia x hybrida*, BAB79434), *PhAP3* (*Petunia x hybrida*, X69946), *PhPI* (*Petunia x hybrida*, AAS46018), *PhPI* (*Petunia x hybrida*, CAA49568), *PhTM6* (*Petunia x hybrida*, AF230704), *RrPI* (*Rosa rugosa*, BAB11939), *StAP3* (*Solanum tuberosum*, CAA47846), *TPI* o *LePI* (*S. lycopersicum*, DQ674531) *VvAP1* (*V. vinifera*, AAT07447), *VFL* o *VvLFY* (*V. vinifera*, AF450278), *VvMADS1* (*V. vinifera*, AF265562), , *VvMADS2* o *VvSEP1* (*V. vinifera*, AF373601), *VvMYB24* (*V. vinifera*, EU181426) y *ZmPI* (*Z. mays*, CAC33848). De este estudio: *VvPI* (DQ988043), *VvTM6* (DQ979341) y *VvAP3* (EF418603).

## 4.- RESULTADOS

### **SECCIÓN A: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES DE FLORACIÓN EN *Vitis vinifera***

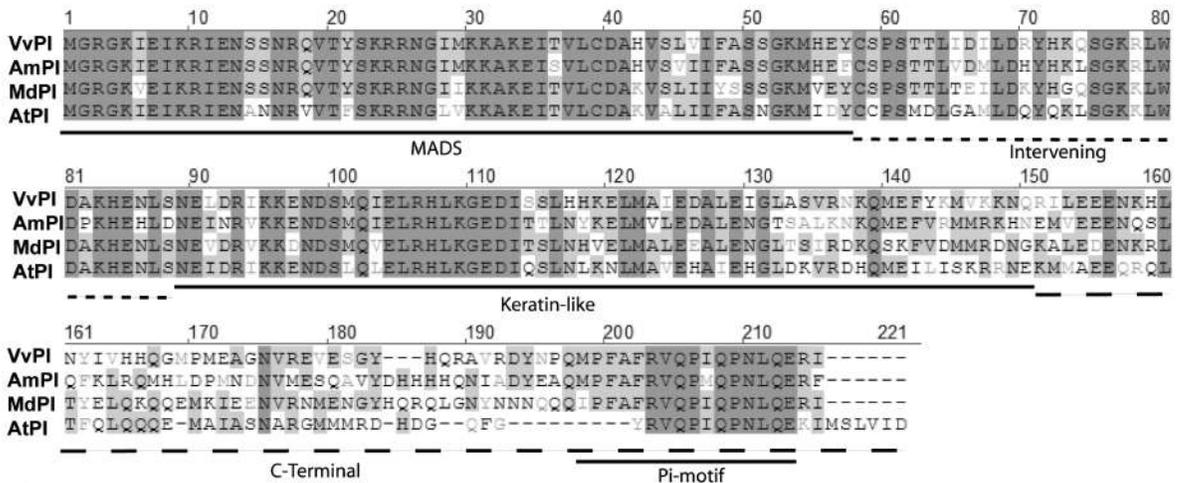
#### ***4.1 Clonamiento y caracterización de los genes MADS-box clase B en *Vitis vinifera****

Como primera actividad se quiso identificar genes de tipo MADS-box, pertenecientes a la clase B de identidad de órganos florales en *V. vinifera*. Debido a que no existía información de estos genes en vides, se utilizó una estrategia de PCR con oligonucleótidos degenerados para pesquisar genes que posiblemente pertenecieran a la clase B. Se diseñaron oligonucleótidos degenerados a partir de regiones conservadas entre secuencias de genes MADS-box *PISTILLATA* de *Arabidopsis*, manzana y *Anthirrinum*. Estos oligonucleótidos se usaron en reacciones de PCR con cDNA y DNA genómico de *V. vinifera* cv. Cabernet sauvignon aislado de inflorescencias inmaduras (antes de la caída de la caliptra). Una vez obtenidas bandas de tamaños esperados (aprox. 600 pb), éstas se aislaron, clonaron y secuenciaron. De los clones secuenciados, algunos tuvieron alta homología de secuencia con el gen *PISTILLATA* de *Arabidopsis* y otros, que representaban una banda de tamaño distinto, tuvieron alta homología con el gen *TM6* de tomate. A partir de las secuencias encontradas se diseñaron oligonucleótidos específicos que se utilizaron para amplificar cada gen, luego los amplificados se clonaron y se secuenció y determinar sus secuencias consenso, por su homología, las secuencias fueron

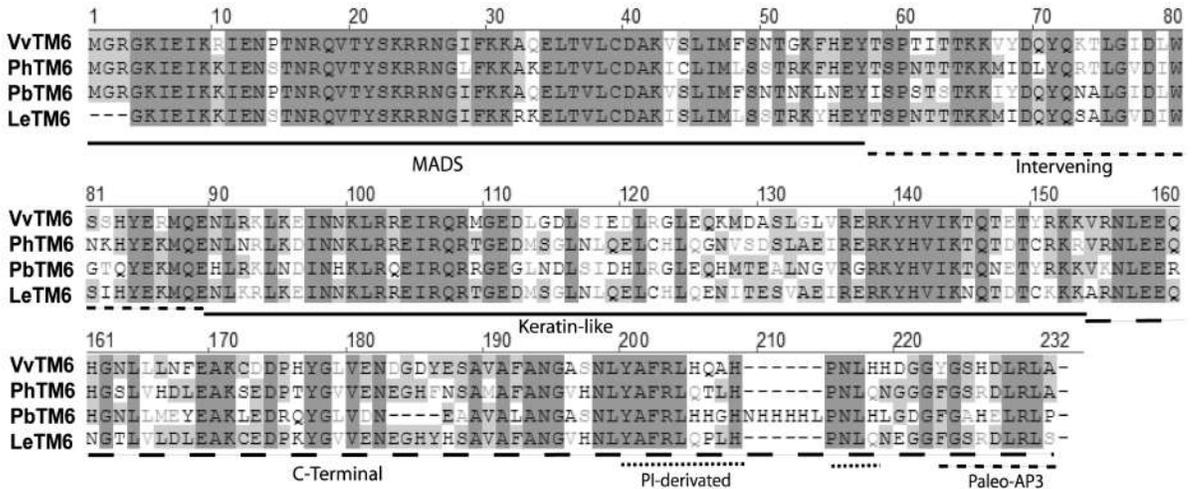
denominadas *V. vinifera PISTILLATA* (*VvPI*) (Número de acceso GenBank DQ988043) y *V. vinifera TM6* (*VvTM6*) (Número de acceso GenBank DQ979341). La secuencia de *VvPI* tenía 639 pb de largo, encontrándose un marco de lectura abierto (ORF) que codificaba para 212 aminoácidos deducidos (Fig.5A). Por otro lado, *VvTM6* tenía 678 pb de largo, codificando para una proteína deducida de 225 aminoácidos (Fig.5B).

Una vez que la base de datos de secuencias expresadas (ESTs) de vides “TIGR grape gene index” se hizo mas completa, fue posible encontrar un consenso tentativo (TC) similar al gen *APETALA3* de *Arabidopsis* (TC54810). A partir de este TC se diseñaron oligonucleótidos específicos, que se utilizaron para amplificar un ORF de 681 pb en el mismo cDNA utilizado anteriormente. Esta secuencia se denominó *VvAP3* (Número de acceso GenBank EF418603). La proteína deducida de *VvAP3* está conformada por 226 aminoácidos (Fig. 5C). Las proteínas deducidas de *VvPI*, *VvTM6* y *VvAP3* presentaron una identidad de secuencia de 62%, 69% y 71% con las proteínas *A. thaliana PI*, *Solanum lycopersicon TM6* y *Lotus japonicus AP3*, respectivamente. Cuando se compararon las identidades entre las proteínas clase B de vides, se observaron identidades menores entre *VvPI* y las otras dos proteínas (40% con *VvTM6* y 39% *VvAP3*) y se observó una identidad más alta, de 65%, entre *VvAP3* y *VvTM6*, lo que confirma la estrecha relación filogenética existente entre ambos genes. Para poder caracterizar con más detalle el gen *VvPI* se quiso obtener las secuencias terminales 5' y 3'. La zona 5' se obtuvo por la técnica de TAIL PCR en DNA genómico, obteniéndose un fragmento de 237 pb río arriba al codón de inicio.

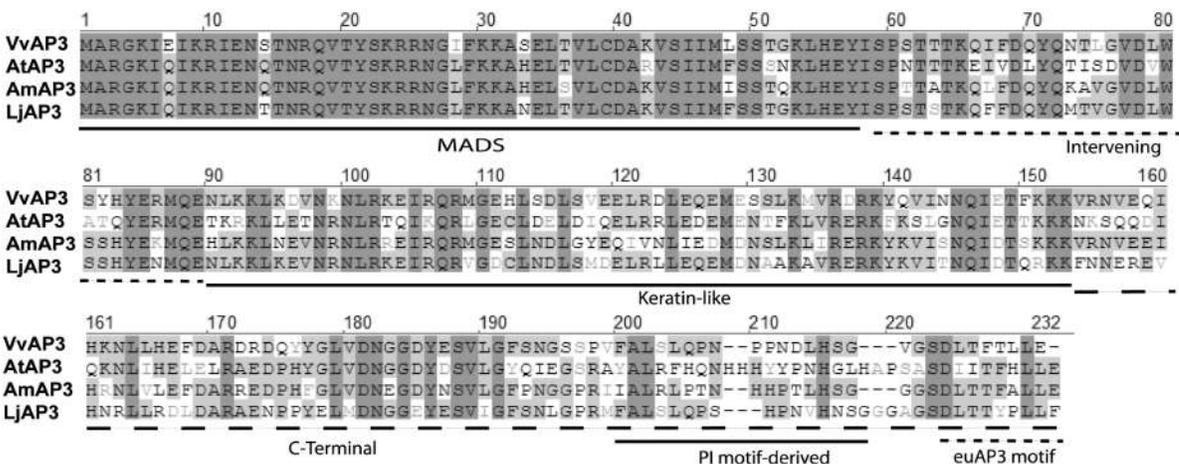
## A



## B



## C



**Figura N°5: Alineamientos de secuencias aminoacídicas de genes B de vides con homólogos de otras especies**

A) Alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida de VvPI y otras tres proteínas homólogas *PISTILLATA*: AtPI de *Arabidopsis thaliana*; MdPI de *Malus domestica* y AmPI de *Anthrrium majus* (También denominada GLOBOSA). B) Alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida de *Vitis vinifera* TM6 y otras tres proteínas TM6 relacionadas: SITM6 de *Solanum lycopersicum*; PhTM6 de *Petunia hybrida* y PbTM6 (PTD) de *Populus balsamifera*. C) Alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida de *Vitis vinifera* AP3 y otras tres proteínas euAP3: AtAP3 de *A. thaliana*; AmAP3 de *Anthrrium majus* y LjAP3 de *Lotus japonicus*. En todos los casos las líneas inferiores indican dominios conservados de proteínas MADS-box y los motivos clásicos de cada linaje.

Utilizando la técnica de 3'RACE se obtuvieron 109 pb de la posible región 3'UTR de *VvPI*, esta región no representa toda la zona 3'UTR ya que no se observó la cola de poli-A (Fig. 5A). Con oligonucleótidos específicos y sobre DNA genómico se obtuvo una banda de 2283 pb, correspondiente a la secuencia genómica de *VvPI*

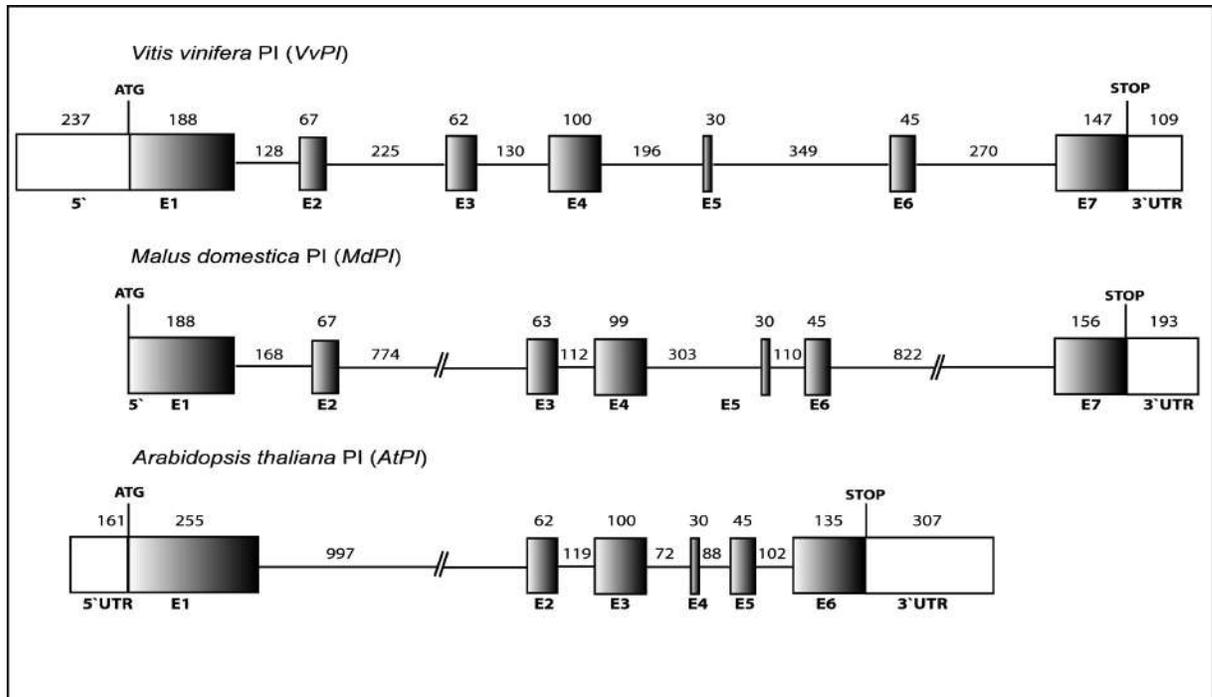
- **4.1.2 Análisis in silico de las secuencias de clase B de *Vitis vinifera***

Al analizar las secuencias de clase B se pudo determinar que todas poseían dominios característicos de sus respectivos homólogos: *PI*, *TM6* y *AP3*. Todos los dominios típicos de una proteína MADS-box del tipo MIKC (Dominios MADS, Intervening y Keratin like) pudieron identificarse en las 3 proteínas analizadas (Kramer y cols., 1998; Lamb y Irish, 2003) (Fig. 5), comparando cada proteína con sus homólogos, la identidad era mayor en la zona del dominio MADS e iba disminuyendo hacia el C-terminal. Además, en cada proteína se identificaron motivos característicos de sus respectivos linajes y elevadas identidades de secuencia con sus homólogos en otras especies. Para el caso de *VvPI*, se encontró un 69% de identidad con la proteína homóloga de *A. majus*, un 62% con la de *A. thaliana* y un 70% con la de *M. domestica* (Fig. 5A). *VvPI* presenta en la zona C-terminal un motivo conocido como *PI* (MPFxFRVQPxQP NLQE, en donde x indica un sitio variable), este motivo se encuentra entre los residuos 195 y 210, y se ha encontrado en la mayoría de las proteínas *PI* descritas (Kramer y cols., 1998). Para *VvTM6* se obtuvo alta similitud con otras tres proteínas homólogas, en donde se encontró un 69% de identidad con la proteína de *Solanum lycopersicum*, un 69% con la de *Petunia*

*hybrida* y un 76% con *TM6* de *Populus balsamifera* (Fig. 5B). En la zona carboxilo terminal de la proteína deducida, se encontró un motivo que se ha descrito como clásico entre este tipo de proteínas, cuyo nombre es "Paleo AP3". Este motivo se encontró entre los aminoácidos 217 y 225 y su consenso es YGxHDLRLA (En donde x representa cualquier aminoácido) (Sheppard y cols., 2000). Además, en VvTM6 se pueden observar aminoácidos conservados entre las distintas proteínas TM6, aminoácidos que se pueden definir como caracteres sinapomórficos, o sea, caracteres que se comparten entre un grupo que posee un ancestro común, estos aminoácidos son los siguientes: E7, K9, I28, L45, K66, K100, H141, K144, L157, G162, V190, A191, N198, L199, F 202 (Fig. 5B) (Kramer y cols., 1998). Finalmente, para VvAP3 se encontró alta similitud de secuencia con otras proteínas de su tipo, por ejemplo, un 58% de identidad con la proteína AP3 de *A. thaliana*, un 69% con AP3 de *Anthirrinum majus* y un 71% con su homóloga en *Lotus japonicus* (Fig. 5C). Adicionalmente, se encontró el motivo euAP3 que se ha descrito como clásico entre las proteínas de este linaje (Kramer y cols., 1998), el motivo se localizó entre los aminoácidos 218 y 226 y se encontró el motivo derivado de PI (PI-derived), motivo que se habría conservado desde el ancestro de este linaje (Fig. 5C).

Se utilizó la secuencia genómica de *VvPI* para determinar la estructura exón-intrón del gen, al compararla con la secuencia de cDNA (Fig. 6). A partir de esta comparación se identificaron siete exones y seis intrones, lo que coincide por ejemplo con la estructura génica del gen *PISTILLATA* de manzana (Yao y cols., 2001) (Fig. 6). Al comparar las estructuras génicas de *PI* en *Arabidopsis*, manzana y

vides se puede deducir que en *Arabidopsis* los dos primeros exones se habrían fusionado (Fig. 6).



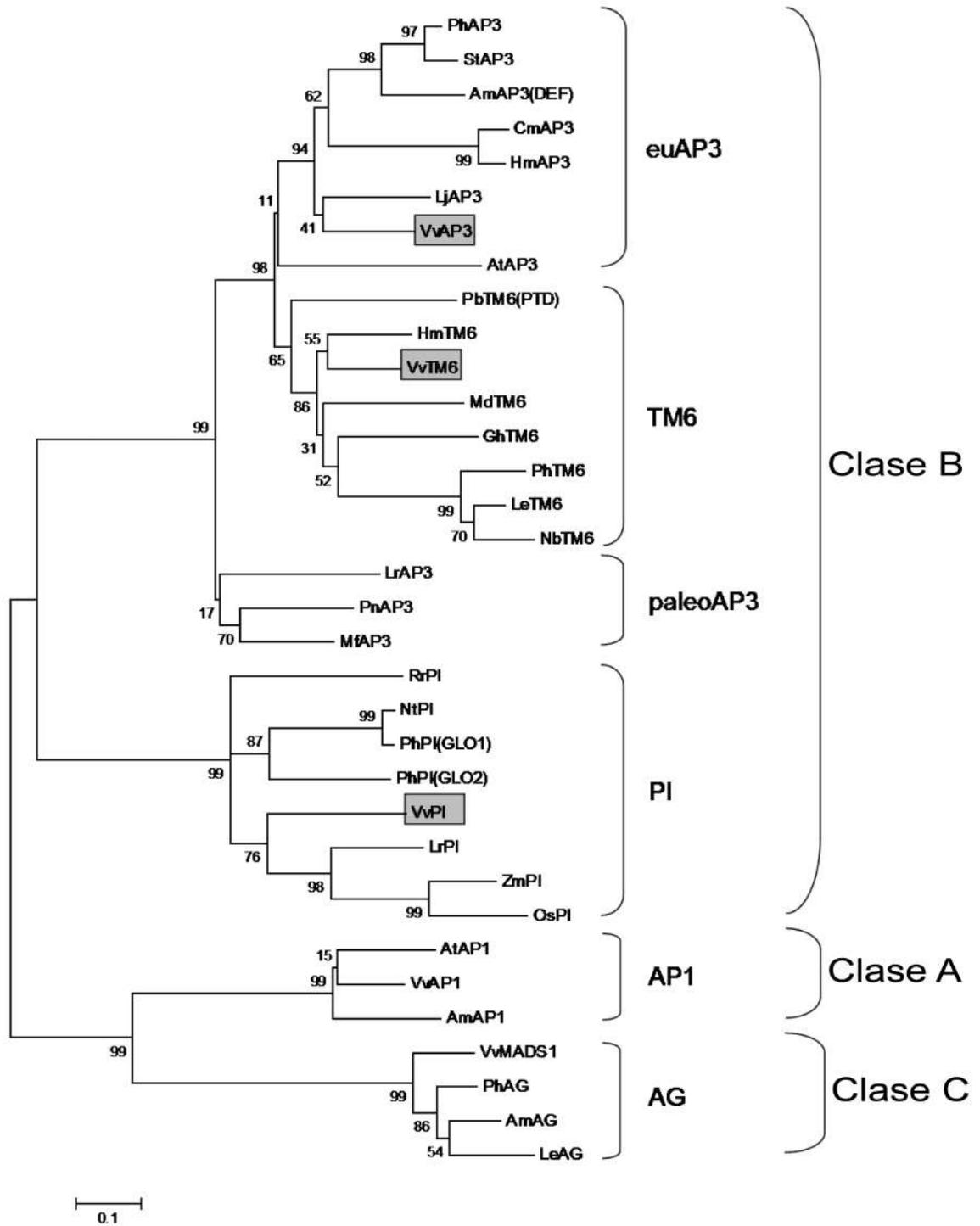
**Figura N°6: Comparación de la estructura genómica de VvPI y otras proteínas homólogas.**

Las cajas grises indican exones, las líneas indican intrones, las cajas blancas corresponden a regiones 5' y 3'UTR. El largo total del gen *VvPI* corresponde a 2283 pb (incluyendo la zona 3'UTR). En todos los casos, los largos de cada exón, intrón y regiones 5 y 3' se señalan.

- **4.1.3 Análisis filogenético de las secuencias de clase B en *Vitis vinifera***

Para evaluar las secuencias aisladas en un contexto filogenético, se realizó una reconstrucción filogenética con las secuencias aminoacídicas predichas para *VvPI*, *VvAP3* y *VvTM6* y 31 secuencias proteicas pertenecientes a distintos linajes de genes MADS-box involucrados en determinación de órganos florales. Se utilizaron los linajes euAP3, paleo AP3, TM6, PI de la clase B; AP1 de la clase A y AG de la clase C. Para eliminar posibles errores por zonas variables, en el alineamiento sólo se utilizaron los residuos mas conservados y por lo tanto filogenéticamente informativos de las secuencias, es decir, se utilizaron 174 aminoácidos desde el inicio de las proteínas, correspondientes a los dominios MADS, Intervening y Kerantin like. En esta reconstrucción cada una de las 3 proteínas de vid se ubicó dentro de su respectivo clado filogenético, junto a sus homólogas de otras especies (Fig.7).

Los resultados de esta reconstrucción confirmaron los anteriormente obtenidos por homología de secuencia y por presencia de dominios y motivos (Fig. 5).

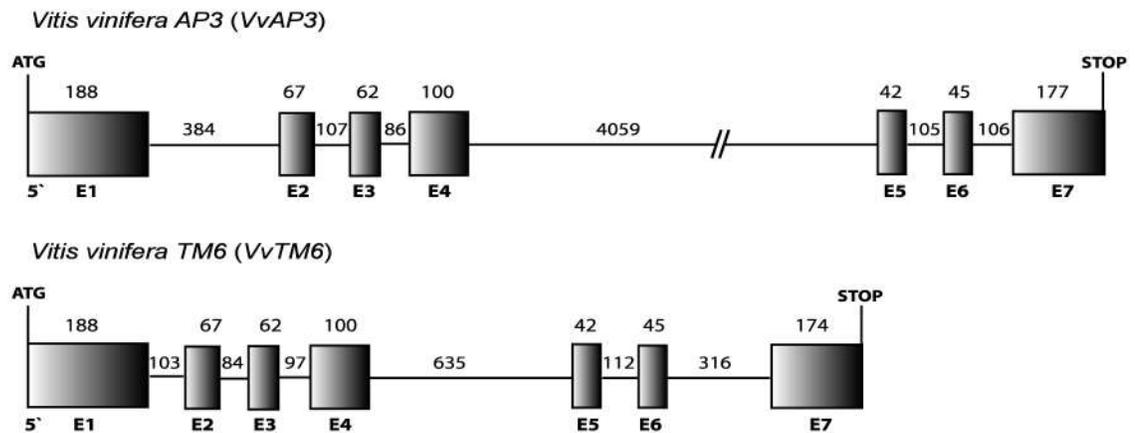


**Figura N° 7: Reconstrucción filogenética.**

Árbol filogenético derivado del análisis de secuencias de proteínas MADS-box, utilizando las zonas correspondientes a los dominios MADS, Intervening y Keratin like. El árbol se originó por algoritmo de vecino más próximo y los números en cada nodo representan valores de bootstrap para 1000 réplicas. Se señala la ubicación de VvPI, VvTM6 y VvAP3 en cajas grises dentro de sus respectivos clados. Para construir el árbol se utilizaron secuencias de proteínas MADS-box públicas de la base de datos GenBank, se utilizaron secuencias pertenecientes a los distintos linajes de las clases A, B y C los nombres de las especies y los números de acceso de las secuencias se encuentran en la sección N°3 Métodos.

- **4.1.4 Análisis in silico del número de copias de los genes B en el genoma de la vid**

Dos grupos de investigación independientes, un consorcio Franco-Italiano (Jaillon y cols., 2007), y un grupo Italiano (Velasco y cols., 2007), han trabajado en la secuenciación del genoma de la vid durante los últimos años (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir). La secuenciación se finalizó el año 2007 y los resultados se hicieron públicos y disponibles tanto en NCBI como en una página web del consorcio Franco-Italiano (Genoscope: <http://www.genoscope.cns.fr/spip/Projects.html>). Aprovechando esta información se quiso identificar la posible presencia de genes de la clase B distintos a los ya aislados en este trabajo. Para esto, se realizó una búsqueda del tipo BLAST con cada una de las secuencias B, en la base de datos del genoma de la vid disponible en NCBI (Velasco y cols., 2007). Utilizando tanto la secuencia nucleotídica completa, como la región correspondiente al dominio MADS de *VvPI*, *VvAP3* y *VvTM6*, se identificó sólo un “contig” (secuencias contiguas ensambladas) con alta identidad para cada uno de los genes (números de acceso respectivos: AM435405, AM469149 y AM476720). El “contig” identificado para *VvPI* nos permitió confirmar la estructura de 7 exones encontrada para este gen en el presente trabajo. La misma estructura de 7 exones pudo ser detectada para *VvAP3* y *VvTM6* (Fig. 8). Los contig que contenían a *TM6* y a *AP3* también aparecieron como resultados con menor homología en el alineamiento realizado con *VvAP3* y *VvTM6* respectivamente. Este resultado refleja nuevamente la cercana relación existente entre ambos genes.



**Figura N°8: Estructuras genómicas deducidas de los genes *VvAP3* y *VvTM6*.**

Las cajas grises indican exones, las líneas indican intrones. El largo total del gen *VvAP3* corresponde a 5748 pb., mientras *VvTM6* tendría una secuencia genómica de 2263 pb. En ambos casos, los largos de cada exón e intrón son señalados.

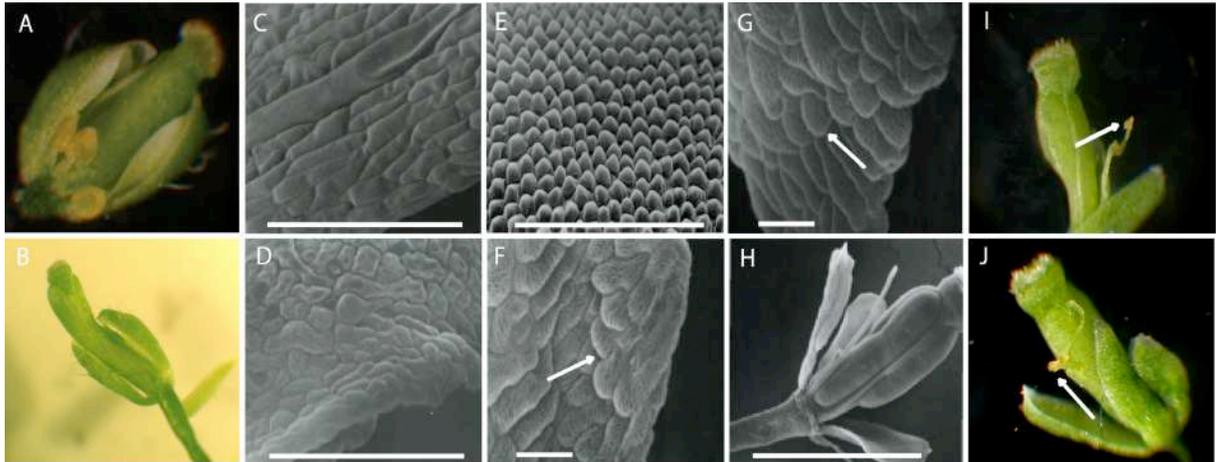
No se obtuvieron resultados que pudieran sugerir la presencia de otros genes de clase B o copias de los genes aquí estudiados. Estos resultados se corroboraron y complementaron utilizando la secuencia del genoma liberado por el consorcio Franco-Italiano, con esta información se detectó que la secuencia genómica de *VvAP3* tendría 5748 pb (GSVIVT00014506001) y se encontraría en sentido en el cromosoma 18 de la vid (Posición desde 11,366,453 pb a 11,372,200 pb). *VvPI* se encontraría en el mismo cromosoma (GSVIVT00000521001 + GSVIVT00015452001) en antisentido (2,253,893 a 2,256,246). Para el caso de *VvTM6* se encontró una secuencia genómica de 2263 pb en el cromosoma 4 (GSVIVT0003684001). Además, realizando estos alineamientos, se puede deducir que no existen mayores diferencias entre los cDNAs de los genes B cuando se compara el cultivar Pinot noir con las secuencias obtenidas en el presente trabajo de Cabernet sauvignon, ya que la máxima diferencia encontrada entre un mismo gen en ambas variedades fue de 0,5%.

- **4.1.5. Expresión constitutiva de *VvPI* en plantas de *Arabidopsis* mutantes para el gen *PISTILLATA***

Para acercarse a la posible función de alguno de estos, se escogió *VvPI* y un sistema de expresión heteróloga utilizando la planta modelo *A. thaliana*. Para esto se utilizaron plantas de *Arabidopsis* mutantes para el gen *PI*, homocigotas para la mutación *pi-1*. Esta mutación se generó por mutagénesis química con EMS (Bowman y cols., 1989). En esta mutante se genera un codón de término anticipado en el

aminoácido 80, luego del dominio de unión al DNA del gen *PI* de Arabidopsis. La mutación afecta el desarrollo de todos los órganos florales (verticilos) excepto el de los sépalos. En vez de pétalos se desarrollan pequeños sépalos, los órganos del tercer verticilo (estambres) no se desarrollan y el gineceo central se desarrolla anormalmente (Bowman y cols., 1989). Por lo tanto, la flor madura de la mutante consiste en dos verticilos externos alternados de sépalos, los que rodean el gineceo usualmente compuesto de dos carpelos (Bowman y cols., 1989). Estas plantas no poseen estambres en sus flores, por lo que no pueden ser transformadas mediante la técnica usual de transformación de Arabidopsis de "Inmersión floral" (Fig. 9B). Por esto, se transformó plantas silvestres con una construcción que contenía el cDNA de *VvPI* fusionado al promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor 35S. Se utilizó polen de tres líneas transgénicas independientes para polinizar plantas homocigotas mutantes *pi-1*, en la primera generación del cruce se obtuvieron plantas heterocigotas, éstas se auto-polinizaron y se analizó el fenotipo de las líneas F2. En esta generación buscamos plantas que fueran homocigotas para la mutación y que presentaran el transgén. Para determinar el genotipo de las plantas, se analizaron 121 plantas por PCR y digestión enzimática (ver materiales y métodos, Fig. 4). La relación entre plantas silvestres, heterocigotas y homocigotas *pi-1* fue estadísticamente similar a lo esperado (1:2:1) ( $\chi^2 > 0,05$ ). Se corroboró la presencia del transgén por PCR en 28 líneas mutantes, crecidas en medio de selección con higromicina. La expresión del transgén se corroboró por RT-PCR en 3 líneas transgénicas (datos no mostrados). En estas plantas los órganos vegetativos fueron normales y no se detectó efectos en el tiempo de floración. Se obtuvo una reversión

parcial del fenotipo mutante, indicando que el ortólogo *PI* de vid podría ser capaz de complementar el gen defectivo de *Arabidopsis* (Fig. 9). Previamente se había descrito que en sistemas de expresión heteróloga con otros genes *PI* en *Arabidopsis* mutantes *pi-1*, se pueden observar pequeñas reversiones de fenotipo como presencia de sépalos con bordes del tipo petaloides o presencia de filamentos tipo estambres. Estos cambios nunca recuperan en un 100% el fenotipo silvestre, ya que ni siquiera cuando se utilizó el mismo gen *PI* de *Arabidopsis* para complementar se obtuvo una reversión completa de fenotipo (Krizek y Meyerowitz, 1996; Winter y cols., 2002; Berbel y cols., 2005). Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) corroboran la presencia de órganos tipo mosaico en el primer verticilo de las plantas 35S:*VvPI pi-1*. En estas flores se ve un cambio en la estructura celular de algunos sépalos, en donde en los márgenes se observan células del tipo pétalos redondas y ordenadas (Fig. 9E, F, G), en vez de las características células alargadas de los sépalos silvestres (Fig. 9C), o de los sépalos en plantas mutantes *pi-1* (Fig. 9D). Adicionalmente, flores que no deberían presentar estambres, presentaron filamentos en el tercer verticilo (Fig. 9H), y en algunas flores con el fenotipo más extremo estos filamentos poseían una estructura tipo antera (Fig. 9I, J), aunque éstos no alcanzaron a tener una estructura tipo silvestre, ni tampoco fueron fértiles (Fig. 9A).



**Figura N° 9: Plantas mutantes de *A. thaliana* mutantes en *pi-1*, que expresan *VvPI*.**

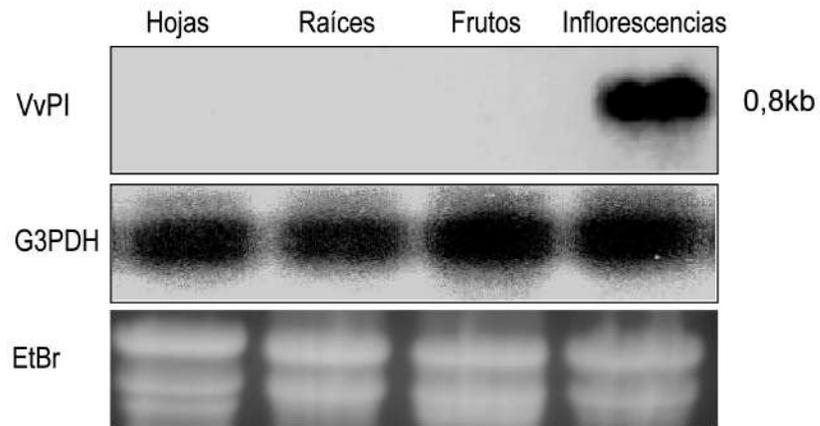
Análisis fenotípico de *Arabidopsis thaliana*: Silvestre (A, C y E), mutantes *pi-1* (B y D) y mutantes *pi-1* transgénicas para 35S:*VvPI* (F-J). Fotografías de microscopía electrónica de barrido (C-H) y lupa (A, B, I y J). A) Flor silvestre a la que se le removió un sépalo para mejor visualización de los órganos internos; B) Flor de una planta mutante *pi-1*; C) Células de un sépalo en una flor Silvestre; D) Células de un sépalo de una flor *pi-1* E) Células de pétalo silvestres; F y G) Sépalos de flores de plantas transgénicas mutantes *pi-1*, en donde las flechas indican márgenes petaloides; H) Se muestran estructuras tipo filamento en flores *pi-1* transgénicas que expresan *VvPI*; I y J) Flores *pi-1* transgénicas mostrando estructuras tipo estambres (En esas flores se removió toda la capa externa de sépalos para mejor visualización). Las barras indican: C, D y E: 100  $\mu$ m; H: 1000  $\mu$ m; F y G: 10  $\mu$ m.

#### **4.2. Expresión de los genes *MADS-box* clase B en los diferentes órganos de la vid**

Para analizar el patrón de expresión de los genes *VvPI*, *VvTM6* y *VvAP3* se utilizó cDNA de diferentes tejidos vegetativos y reproductivos de la vid. Inicialmente, se realizaron estudios por RT-PCR con el gen *VvPI* que permitieron encontrar expresión en inflorescencias en diferentes estadios de desarrollo. Por esta técnica no se detectó expresión en fruto, aunque si se encontró una pequeña señal de expresión en raíz y en hoja (datos no mostrados). Estos resultados fueron parcialmente confirmados por la técnica de hibridación tipo Northern, en donde sólo se identificó un transcrito 0.8 kb en inflorescencia (Fig. N°10).

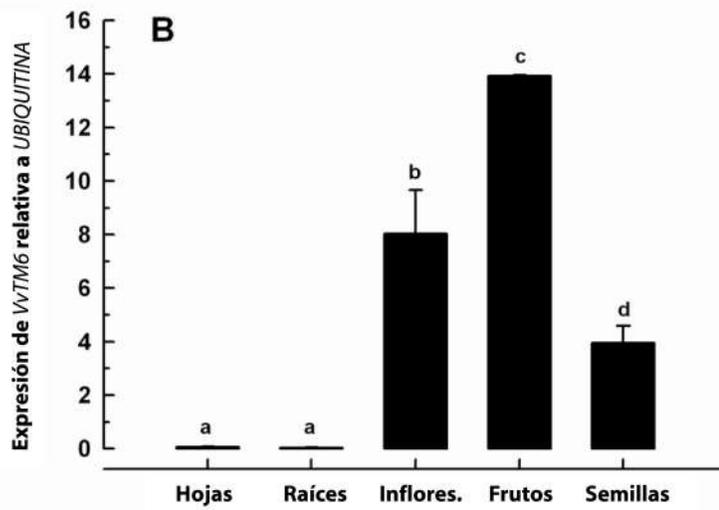
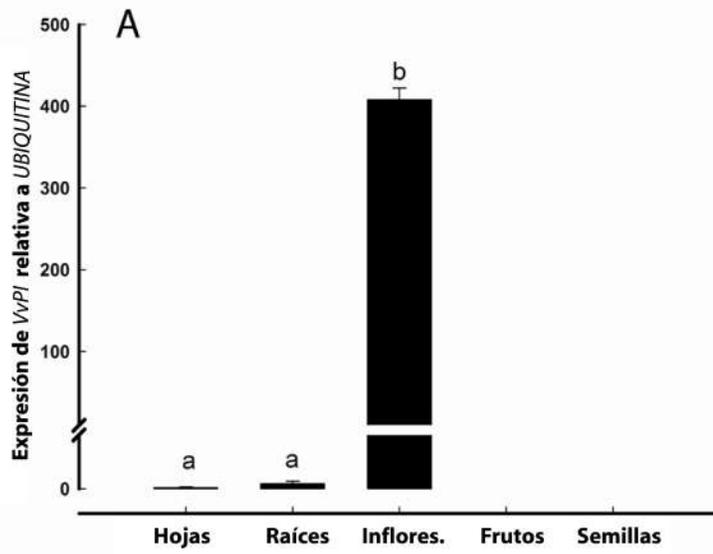
Para realizar estudios cuantitativos de la expresión de los genes de la clase B, se utilizó la técnica de RT-PCR en tiempo real o qRT-PCR. Mediante esta técnica se detectó una expresión de *VvPI* 400 veces mayor en inflorescencias, que en hojas o raíces y no se detectó expresión en frutos o semillas (Fig. 11A). La expresión promedio de *VvPI* en todos los tejidos mostró diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $p=0.0084$ ). Un análisis estadístico *a posteriori* arrojó que la expresión de *PI* fue significativamente mayor en inflorescencia, si se comparaba con hojas o raíces ( $p<0,05$ ). Para el caso de *VvAP3* y mediante la misma técnica, sólo se encontró expresión en inflorescencia (dato no mostrado). Para *VvTM6*, fue posible detectar expresión en todos los tejidos analizados (Fig. 11B). Sin embargo, la expresión fue mayor en inflorescencia, fruto y semilla, en comparación con la expresión en hojas y raíces. Cuando se analizó estadísticamente la expresión

promedio de *VvTM6* en los distintos tejidos, se encontraron diferencias significativas entre las muestras ( $p=0.0004$ ), exceptuando el caso de hojas y raíces en donde la expresión es similar y mucho menos intensa ( $p=0.999$ ). Es decir, la expresión es significativamente distinta cuando se comparan inflorescencias, frutos y semillas.



**Figura N°10: Análisis por hibridación tipo Northern de la expresión de *VvPI* en distintos tejidos de la vid.**

En el primer panel se observa una banda correspondiente a los transcritos de *VvPI* en inflorescencias. Como control se utilizó la hibridación con una sonda que detecta al transcrito de G3PDH. En el panel inferior se muestra el gel de RNA teñido con Bromuro de etidio.



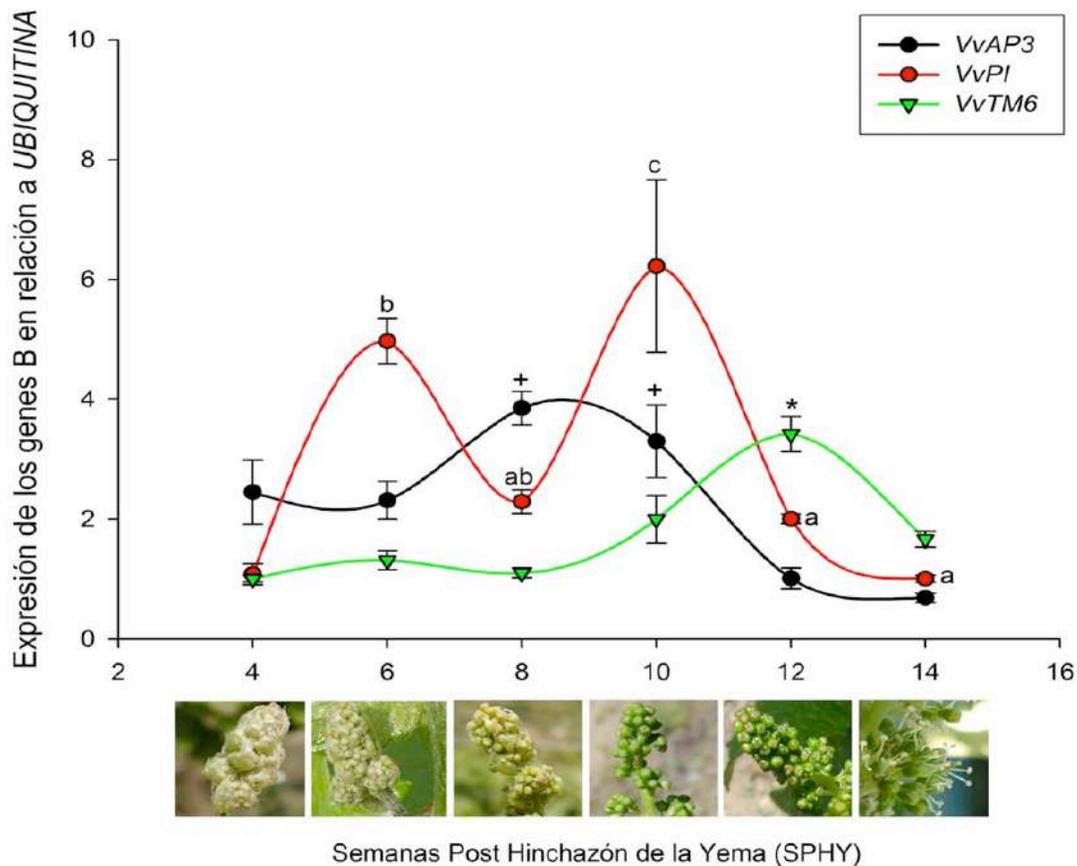
**Figura N° 11: Cuantificación de la expresión génica de *VvPI* (A) y *VvTM6* (B) en hojas jóvenes, raíces, inflorescencias previo a la caída de la caliptra, frutos completos y semillas 6 semanas post-pinta.**

La expresión se grafica como relativa a *UBIQUITINA*. Los valores de expresión fueron de 0,03; 0,1 y 408,21 en hojas, raíces e inflorescencias para *VvPI* respectivamente. Para *VvTM6* esos valores fueron de 0,06; 0,04; 8,04; 13,92; y 3,94 en hojas, raíces, inflorescencias, frutos y semillas, respectivamente. Las desviaciones estándar representan los datos de 3 réplicas biológicas independientes y letras similares indican diferencias no significativas entre los tejidos. Los transcritos de *VvAP3* sólo se detectaron en inflorescencias (dato no mostrado). En este caso la calibración fue realizada contra la expresión promedio en todos los tejidos.

### **4.3 Expresión temporal de los genes de la clase B en inflorescencia.**

Se realizó un seguimiento del desarrollo temporal de la inflorescencia, para eso se comenzó colectando muestras luego de 4 semanas desde el momento que se conoce como “Hinchazón de la yema” (SPHY), que es el momento en que la yema se ha reactivado para comenzar un nuevo ciclo de crecimiento (tiempo que se consideró como 0) (correspondiente al tiempo 4 en nomenclatura E-L, Dry y Coombe, 2004). Se realizaron colectas en 6 momentos y cada una de ellas se distanciaba en 2 semanas. En cada tiempo de colecta, un grupo de flores fueron fotografiadas y fijadas para análisis de microscopía óptica y otro fue utilizado para extraer RNA y sintetizar cDNA. En las Figuras 12 y 13 se muestran morfologías representativas de lo observado para cada tiempo. Utilizando el cDNA sintetizado se estudió la expresión de *VvPI*, *VvTM6* y *VvAP3* durante el desarrollo de la flor, mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real (Fig. 12). La expresión de *VvAP3* fue significativamente mayor durante las semanas 8 y 10 post hinchazón de la yema, y luego decreció para llegar a niveles basales durante las semanas 12 y 14 ( $p=0.0001$ ), en este último tiempo todas las flores de la inflorescencia habían madurado y habían perdido la caliptra (estructura formada por pétalos fusionados que protegen los órganos reproductivos) (Tiempo 26 E-L). Los niveles de transcrito de *VvPI* se incrementaron a partir de la semana 6 y una expresión significativamente mayor se alcanzó en la semana 10 ( $p=0.00021$ ), cuando el raquis de la inflorescencia se ha elongado y las flores están menos compactadas dentro de la inflorescencia. Por último, la expresión de *VvTM6*

fue significativamente mayor en la semana 12, casi al final del desarrollo de la flor ( $p=0.000139$ ), dos semanas antes de la caída de la caliptra.



**Figura 12: Expresión temporal de los genes *VvPI*, *VvTM6* y *VvAP3* durante el desarrollo de la inflorescencia.**

Las fotografías representan morfologías típicas de cada tiempo de colecta. Las desviaciones estándar representan los resultados de tres réplicas independientes. Para *VvPI* letras similares representan diferencias de expresión no significativas entre los tiempos. Para *VvTM6* un asterisco indica el único tiempo en el que hay diferencias significativas. El símbolo (+) indica diferencias significativas en la expresión de *VvAP3*. La normalización fue realizada según los datos de expresión de *UBIQUITINA*. Los datos de cada gen fueron calibrados según el tiempo en el que se observó su menor expresión (Tiempo con expresión relativa de 1), por lo que cada gen tiene su propio rango de valores.

#### **4.4 Caracterización Macro y microscópica del desarrollo de la inflorescencia de la vid.**

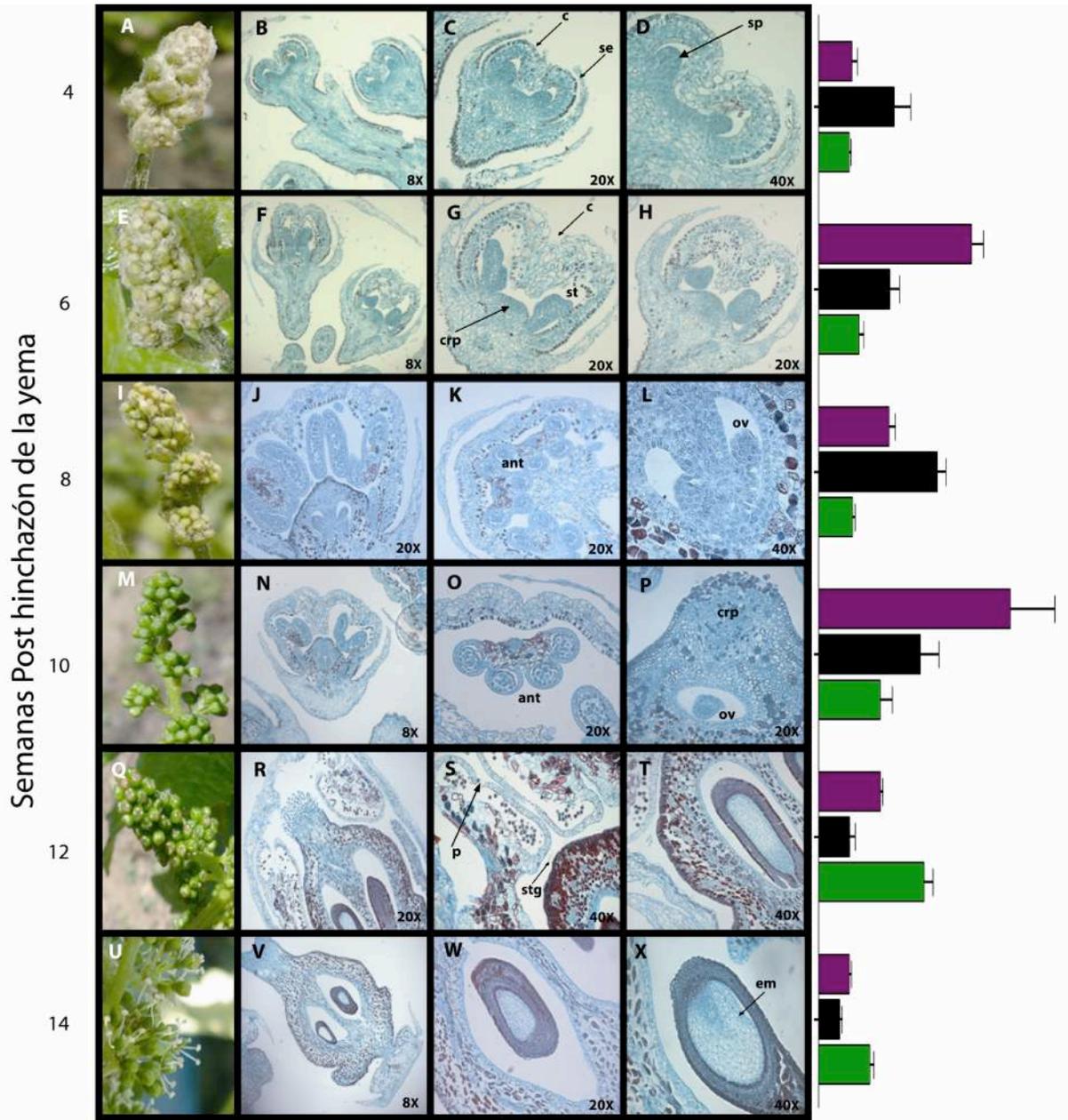
Los mismos tiempos de desarrollo utilizados en el punto anterior fueron utilizados para realizar una caracterización microscópica detallada del desarrollo de la inflorescencia en esta especie. En la parte izquierda de la Figura 13 se muestran morfologías representativas de lo observado para cada tiempo. Se realizó tinción de safranina y “Fast Green” para identificar: núcleos, nucléolos y acumulación de lignina en rojo y celulosa y citoplasma en verde o celeste (Johansen, 1940). En la misma figura se muestra en la parte derecha los datos de expresión obtenidos para los genes B en el punto anterior, esta vez representado en forma de barra, de manera de poder ir comparando más fácilmente el desarrollo de la flor y la expresión de los genes (Fig. 13).

En los tiempos 4 y 6 fue posible observar grupos de flores altamente compactadas en la inflorescencia, en donde hojas modificadas (escamas o “bracts”) protegían cada flor (Fig. 13A, E). Al tiempo 4, pequeños sépalos se habían desarrollado. En esta especie, estas estructuras son muy pequeñas y casi imperceptibles y como pudimos corroborar, no continúan desarrollándose durante el crecimiento de la flor. En este tiempo los pétalos habían comenzado a desarrollarse para formar la caliptra. En cuanto a los órganos reproductivos masculinos (estambres), en esta etapa sólo fue posible observar un engrosamiento en el meristema que los origina (Fig. 13B–D). En cuanto a la expresión de los genes, en esta etapa se observa una expresión mayor de *VvAP3*, lo que podría relacionarse

con el desarrollo de los pétalos que son los primeros órganos en formarse dentro de la flor. En la etapa 6 se pudo observar el desarrollo de las anteras y comenzó a ser distinguible el primordio que origina al carpelo. En esta etapa, también se observó el comienzo de la invaginación de la caliptra, desde su centro hacia el interior de la flor, según el tamaño de las células observadas, este proceso pareciera ocurrir por una división celular en la base y elongación celular en la zona superior (Fig. 13F–H). Durante esta etapa se observó un aumento significativo en la expresión de *VvPI* y una mantención en los niveles de expresión de *VvAP3*.

Durante la etapa 8, las flores ya habían comenzado a separarse unas de otras, principalmente porque el raquis de la inflorescencia, que es la estructura que conecta las flores entre sí, se había elongado (Fig. 13I). Adicionalmente, los filamentos de las anteras habían comenzado a elongarse y en un corte transversal de la flor ya se podía observar la forma característica de los sacos polínicos (Fig. 13K). En cada flor se observó un carpelo desarrollado, con dos cavidades que contenían un óvulo cada una (Fig. 13L). Durante esta etapa se observa un aumento significativo en la expresión de *VvAP3* y una relativa mantención en los niveles de transcrito de *VvPI*. En la semana número 10 ya no se observaba una protección externa de la flor por escamas y a nivel microscópico, se observaban pequeños cambios, como por ejemplo un mayor definición de las anteras (Fig. 13N–P), en este tiempo se observa un nuevo pico de expresión de *VvPI* y los niveles de transcrito de *VvAP3* continúan altos. En el tiempo 12 se observó que las paredes de las anteras habían comenzado a degradarse y granos de polen maduros podían observarse libres en la cavidad de la flor, lo que permite presumir que ya había ocurrido la

polinización. El carpelo había madurado completamente y se pudo observar papilas estigmáticas en su parte superior (Fig. 13Q–S). Mientras la caliptra seguía adherida a la flor, dentro de las cavidades del carpelo se observaron estructuras que podrían corresponder a semillas inmaduras o a óvulos más desarrollados, en las capas externas de estas estructuras hay coloración roja que indicaría presencia de lignina (Fig. 13T). En este tiempo tanto los niveles de *VvAP3* como de *VvPI* habían decaído a niveles basales, en cambio *VvTM6* alcanzó su mayor nivel de expresión. En la última semana analizada, tiempo 14, ya se había caído la caliptra y los estambres maduros podían observarse libres en la flor (Fig. 13U, V). Además, se observaba un mayor desarrollo de lo que probablemente corresponde a la semilla (Fig. 13V–X). Algunas de los estambres ya habían comenzado a senescer y caerse de la flor, éstos no se observan en la figura 13V debido a que fueron removidos durante el proceso de fijación. Puede observarse que los niveles de *VvTM6* aún no habían alcanzado niveles basales en este tiempo. Esta etapa coincide con la que en la literatura se ha descrito como “setting” o número 27 de la clasificación E-L (Dry P, 2004), que es la etapa en la que ya ha habido una transición desde desarrollo floral a frutal.



**Figura N°13: Análisis macro y microscópico del desarrollo temprano y tardío de la inflorescencia en *V. vinifera* en comparación con la expresión de los genes B.**

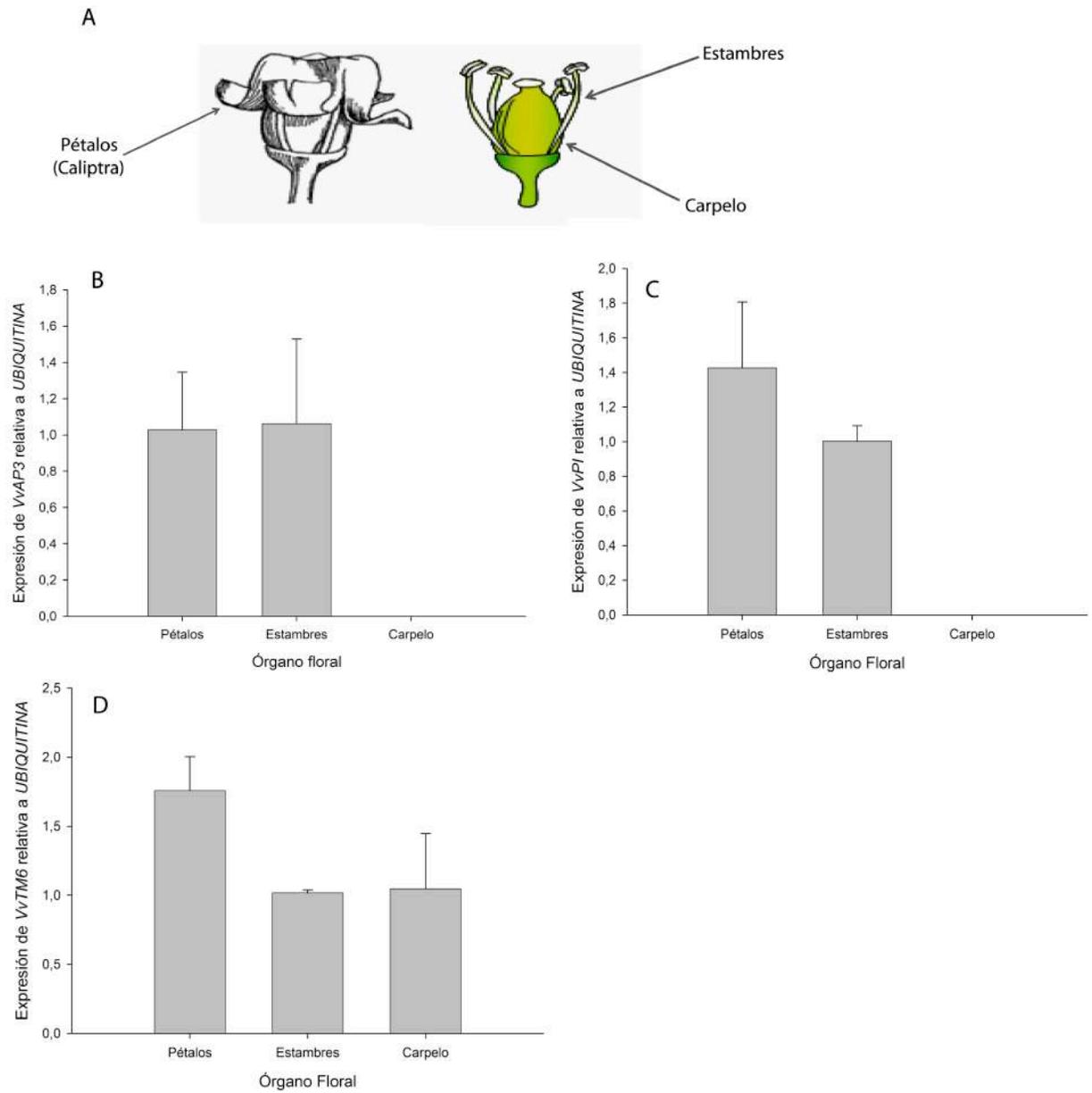
En las figuras A, E, I, M, Q y U se muestran morfologías representativas de inflorescencias en diferentes estadios de desarrollo, comenzando en la semana 4 luego de la hinchazón de la yema (SPHY) y cada dos semanas hasta que la caliptra se había caído de cada flor en la inflorescencia en la semana 14 (SPHY). Se analizó el desarrollo de los órganos dentro de la flor mediante cortes histológicos de cada estadio de desarrollo. Los cortes histológicos fueron teñidos con Safranina y “Fast Green” como se describe en la sección 3 “Métodos”. Las abreviaciones son las siguientes: c: caliptra; se: sépalo; stp: primordios de estambres; st: estambres; crp: primordio de carpelo; ant: antera; em: posible formación del embrión. A la derecha de las fotografías se representa la expresión de los genes B en los distintos tiempos, las barras negras representan a *VvAP3*, las moradas a *VvPI* y las verdes a *VvTM6*. Los datos graficados son los mismos representados en la figura 11.

#### **4.5 Expresión específica de los genes B en los distintos órganos de la flor y durante el desarrollo del fruto.**

Ya que se ha descrito que este tipo de genes cumplen funciones en zonas muy específicas de la flor, determinando la identidad de cada uno de los meristemas y órganos de ésta, se decidió realizar un análisis específico para determinar la expresión de cada uno de estos genes en pétalos, estambres y carpelo. Para esto, se escogió como tiempo de evaluación la semana número 10 (en donde los tres genes se expresaban). Se realizó una disección de los órganos de la flor, estos se agruparon y se sintetizó cDNA a partir de sus tejidos, en estos cDNAs se analizó la expresión de los tres genes (Fig. 14). Como se mencionó anteriormente, los sépalos casi están ausentes en esta especie y por eso no se incluyeron en este estudio. *VvPI* y *VvAP3* se expresaron sólo en el segundo y tercer verticilo (Pétalos y estambres) (Fig. 14A y B) y *VvTM6* se encontró en estos órganos pero sorprendentemente también en el carpelo (Fig. 14C).

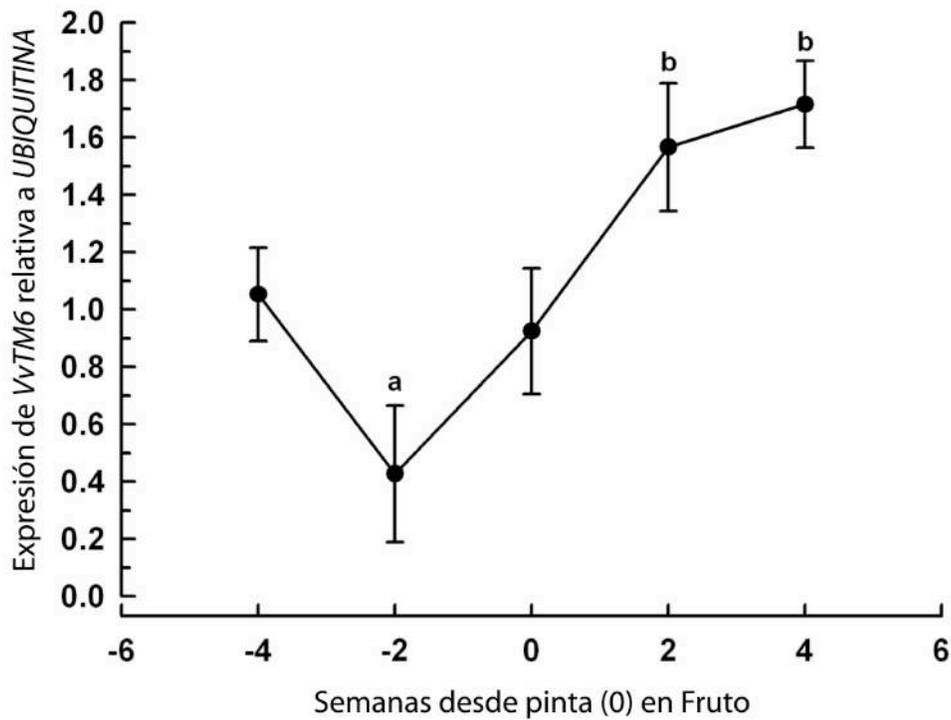
Una vez que se detectó expresión de *VvTM6* en carpelo y ya que también habíamos observado expresión del gen en fruto, se quiso analizar la expresión del gen durante la maduración del fruto, suponiendo que la expresión del gen continuaba una vez que el carpelo se ha diferenciado a fruto. Se analizó la expresión de este gen durante la maduración del fruto utilizando la piel del fruto en distintos estadios. En este experimento fue posible detectar expresión del gen durante todos los estadios analizados (Fig. 15). Se comenzó midiendo 4 semanas antes de la pinta (tiempo en el que el 50% de los frutos están coloreados) hasta 4 semanas después

de la pinta. Para analizar estadísticamente las diferencias se realizó una prueba de ANOVA de una vía ( $p=0.00724$ ). Luego, un análisis *a posteriori* indicó que las diferencias eran significativas cuando se compararon los tiempos: 2 semanas previo a la pinta (-2) con las semanas 2 y 4 post pinta ( $p=0.0127$  y  $p=0.0074$ , respectivamente).



**Figura N° 14: Expresión de genes MADS-box clase B, por RT-PCR en tiempo real, en los distintos órganos de la flor de vid.**

En A se presenta un diagrama que muestra los órganos de la flor de vid previo a la antesis (Izquierda) y luego de la antesis (Derecha). En la figura B se muestra la cuantificación de la expresión de *VvAP3* en los distintos órganos de la flor, en C la de *VvPI* y en D la de *VvTM6*. Los datos fueron normalizados por *UBIQUITINA* y calibrados según el tejido que presentó menor expresión.



**Figura N° 15: Expresión de VvTM6 durante el crecimiento y maduración en la piel de la baya.**

Expresión de VvTM6 por RT-PCR en tiempo real. La pinta o envero (0) se definió cuando el 50% de las bayas estaban coloreadas en el racimo y la concentración de azúcares alcanzó los 5°brix. Las desviaciones estándar se calcularon con los resultados de tres réplicas independientes. Letras similares indican que no hay diferencias significativas entre estadíos.

#### **4.6.- Efecto de la polinización en la expresión de los genes *MADS-box* clase B en vides.**

Según los datos de expresión por RT-PCR en tiempo real de los genes B, durante el desarrollo de la inflorescencia, la expresión de *VvPI* y *VvAP3* decaía coincidentemente con la incipiente formación de la semilla. Así también, existían antecedentes en la literatura, en los que la expresión del gen *PI* de orquídea disminuía luego de la polinización (Tsai y cols., 2005). Es por esto, que se quiso realizar un experimento en donde se relacionara la polinización con la expresión de los genes clase B. Para esto se montaron con dos experimentos de campo. En el primero se utilizó la variedad de vid Moscatel, en donde se escogieron 4 racimos de inflorescencias al azar (con aproximadamente 300 flores cada una), y en un período en el que la caliptra estaba aún adherida a las flores, ésta se removió del receptáculo, en conjunto con las anteras (emasculación). Dos días después, se escogieron al azar la mitad de las inflorescencias y cada flor se polinizó con polen maduro, que había sido colectado de la misma especie (de flores que se encontraban en un estado de madurez mas avanzado), la otra mitad de las inflorescencias se dejó sin polinizar. Ocho días después de la polinización, las inflorescencias fueron colectadas y se realizaron experimentos de expresión génica mediante RT-PCR en tiempo real (Fig. 16).

En este tiempo se encontró que la expresión de *VvPI* era significativamente mayor en las flores que no se habían polinizado ( $p < 0,05$ ), cuando se comparaban con la expresión en las flores que se polinizaron manualmente. Por otro lado, para el

gen *VvTM6* no se observó una diferencia en su expresión entre las flores polinizadas y no polinizadas en el tiempo estudiado ( $p>0,05$ ) (Fig. 16).

Para tener una idea temporal del proceso, se realizó el mismo experimento de emasculación, ahora en la variedad de uva de mesa Red Globe. En este experimento hubo 3 grupos experimentales: Inflorescencias emasculadas; Inflorescencias emasculadas y polinizadas y un grupo control que correspondía a inflorescencias sin manipulación, que eran colectadas en las mismas fechas que las manipuladas. Cuando las flores estuvieron en condiciones adecuadas (caliptra totalmente adherida y fresca) los dos primeros grupos fueron emasculados. Cinco días después ( $T_0$ ), se polinizaron las flores de la mitad de las inflorescencias emasculadas. Luego, se procedió a colectar racimos de inflorescencias inmediatamente después de emasculación y a los 8 y 16 días después de la polinización. Los racimos de cada muestra fueron procesados y se realizaron experimentos de RT-PCR en tiempo real para determinar el patrón de expresión de los genes B en los grupos de muestras (Fig. 17). Cabe destacar que en los tiempos iniciales siempre habrá mayor expresión de *VvPI*, en el grupo control, ya que en estas flores se mantienen los pétalos y las anteras, tejidos en los que se expresa este gen. Para el caso de las flores emasculadas, la expresión que se detecta proviene probablemente del remanente de los estambres que se deja en la flor y de la expresión en los meristemas.

En este experimento se determinó que en el tiempo 8, la expresión de *VvPI* era similar tanto en las flores polinizadas como en las no polinizadas ( $p>0,05$ ). En cambio, en un tiempo más avanzado ( $T_{16}$ ), la expresión del gen fue significativamente mayor en las flores que no habían sido polinizadas ( $p<0,05$ ) (Fig.

17). El grupo control indica la expresión natural del gen en flores que no han sido manipuladas y en el tiempo 16, también se detecta una drástica disminución en la expresión del gen en estas flores, ya que en este grupo no se maneja la fecha de polinización, es posible que no haya ocurrido en el mismo tiempo que en el grupo polinizado manualmente.

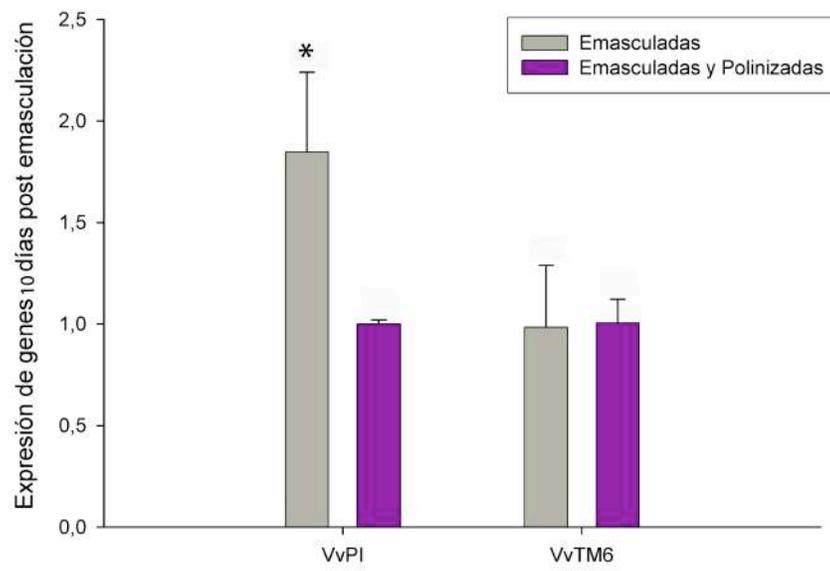
Para el caso de *VvTM6*, se obtuvieron resultados similares en este experimento, ya que en el tiempo 8 no existieron diferencias significativas entre la expresión del gen entre las flores emasculadas polinizadas o no polinizadas. En cambio, si existió una expresión significativamente mayor en las flores que no se habían polinizado cuando la expresión se midió en el tiempo 16 ( $p < 0,05$ ) (Fig. 17).

También se intentó evaluar la expresión del gen *VvAP3* en los grupos experimentales, pero la cantidad de transcrito de este gen era muy baja luego de la emasculación, probablemente porque su expresión en etapas más tardías del desarrollo de la flor, sea más importante en pétalos y estos órganos se remueven totalmente durante el proceso de emasculación.

A



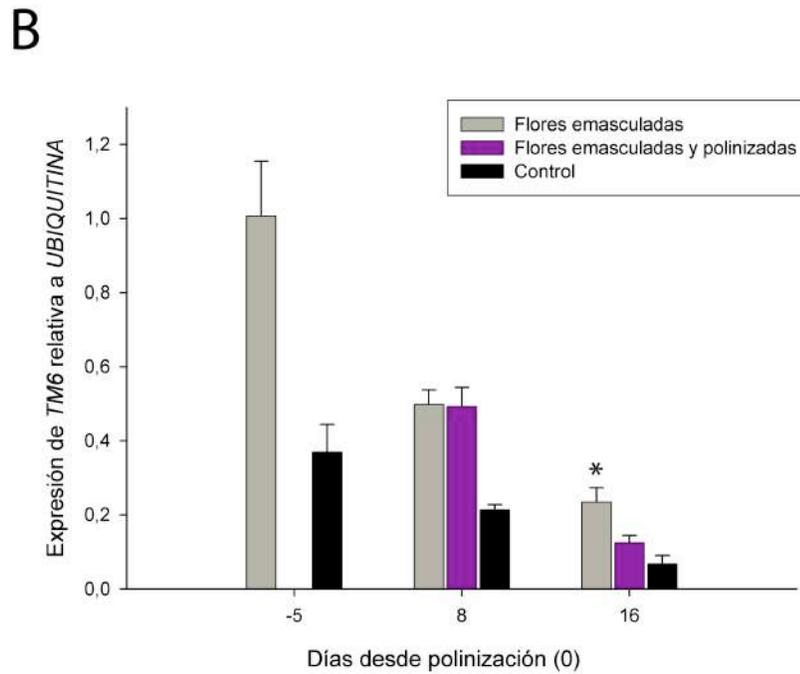
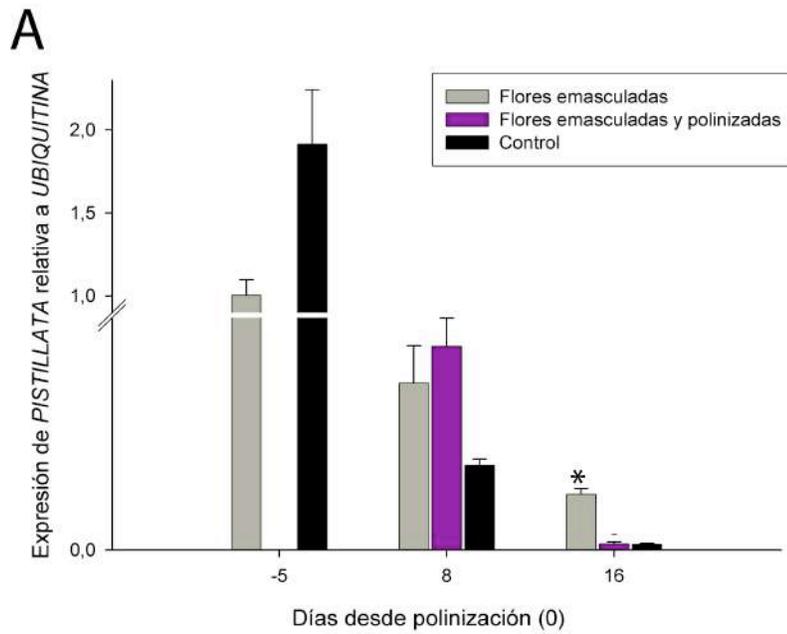
B



**Figura N° 16: Emasculación de flores de vid y expresión de los genes *VvPI* y *VvTM6* en dependencia de la polinización.**

En A se muestran ejemplos de distintos estados o tratamientos en flores de vid: Flores antes de emasculación (I), flores sin caliptra y sin emasculación (Presentan las anteras en los estambres) (II) y flores emasculadas a las que se les ha removido la caliptra y las anteras (III).

En B, se grafican los resultados de un experimento de emasculación y polinización en inflorescencias de *V. vinifera* cv. Moscatel. Se muestra la expresión de los genes *VvPI* y *VvTM6* por RT-PCR en tiempo real, 10 días después de la emasculación (se polinizó 2 días después de la emasculación). Se representa la expresión de ambos genes en flores emasculadas sin polinizar y polinizadas. Los datos fueron normalizados según *UBIQUITINA* y los datos de cada gen se calibraron contra la expresión en flores polinizadas. Un asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).



**Figura N° 17: Expresión temporal de *VvPI* y *VvTM6* en dependencia de la polinización.**

Se grafican los resultados de un experimento de emasculación y polinización en inflorescencias de *V. vinifera* cv. Red Globe en una escala temporal, en donde se muestra la expresión de los genes *VvPI* (A) y *VvTM6* (B) por RT-PCR en tiempo real, en distintos momentos, considerando el día de polinización como tiempo 0. Los grupos experimentales corresponden a: Inflorescencias emasculadas; Inflorescencias emasculadas y polinizadas y un grupo control correspondiente a inflorescencias sin manipulación, que fueron colectadas en las mismas fechas que las manipuladas. Se colectaron racimos de inflorescencias inmediatamente después de emasculación y a los 8 y 16 días después de la polinización. Los datos fueron normalizados según *UBIQUITINA* y calibrados contra la expresión de cada gen en las flores emasculadas justo después de la emasculación (T0). Los datos fueron analizados estadísticamente para cada gen y en cada tiempo por separado, se compararon por ANOVA de una vía los datos de flores emasculadas polinizadas y no polinizadas, sin incluir el control (ya que en este grupo no se puede saber cuándo ocurrió la polinización). Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en un determinado tiempo ( $p > 0,05$ ).

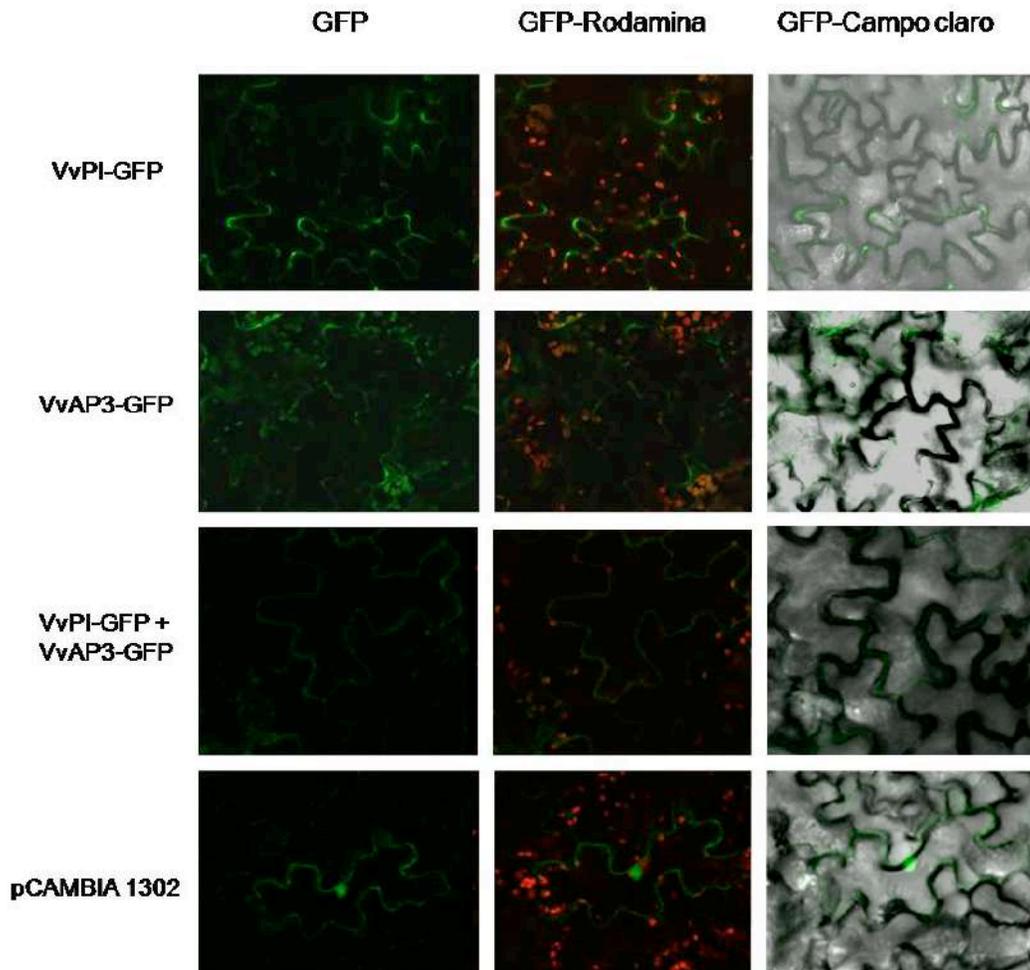
#### **4.7 Determinación de la localización sub-celular de VvAP3 y VvPI**

Para determinar la ubicación de las proteínas VvPI y VvAP3 dentro de la célula se utilizó la estrategia de agroinfiltración de hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), en donde se inyectó en células de tabaco células de *Agrobacterium tumefaciens* que contenían en un plasmidio el cDNA de VvPI o VvAP3 fusionado al gen que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP).

Luego de 5 días desde la infiltración se observaron los fragmentos de hojas tratados en el microscopio confocal, para observar la fluorescencia emitida por la fusión de nuestras proteínas a la proteína GFP. Como controles utilizamos *A. tumefaciens* con un vector que sólo expresa la proteína GFP (pCAMBIA 1302), que debiera localizarse tanto en el citoplasma como en el núcleo y también infiltramos con el medio de infiltración sin bacteria como control negativo de fluorescencia.

Al ser nuestras proteínas factores de transcripción esperábamos encontrar fluorescencia mayoritaria o exclusivamente en el núcleo. Sin embargo, y sorprendentemente, nos encontramos con una expresión de ambas proteínas exclusivamente en el citoplasma (Fig. N° 18). Antecedentes previos de la literatura sugerían que en *Arabidopsis* ambas proteínas debían ser expresadas simultáneamente para poder encontrarlas en el núcleo (McGonigle y cols., 1996), lo que sugería que cuando ambas se acoplaban, exponían alguna señal de destinación nuclear. Con esos antecedentes realizamos una co-infiltración, es decir, la infiltración de ambas proteínas simultáneamente. Lamentablemente, no pudimos obtener datos concluyentes de que la infiltración simultánea permitiera encontrar a las proteínas en

el núcleo, en la figura N° 18 se muestran fotografías representativas de lo observado en cada caso, en donde el citoplasma se observa como un contorno irregular (tipo pieza de puzle), ya que está comprimido por la vacuola. Estos resultados pueden explicarse ya sea porque la posibilidad de que una célula se transforme con ambos plasmidios es muy baja, porque ambas proteínas tienen GFP lo que podría impedir su unión o bien porque estas proteínas necesiten de otro(s) factor(es) para migrar al núcleo. Para abordar algunas de estas posibilidades, actualmente estamos realizando transformaciones estables de *A. thaliana* con el vector 35:*VvPI-GFP*, luego de obtener plantas transgénicas con esta construcción, realizaremos cruces con plantas que sobre-expresan *VvAP3* sin fusión a GFP. Así, podremos analizar la localización de *VvPI-GFP* en las plantas doblemente transgénicas y sin el problema de que ambas proteínas posean la fusión a GFP.



**Figura N° 18: Localización sub-celular de las proteínas VvPI y VvAP3.**

Agroinfiltración en hojas de Tabaco con *A. tumefaciens* transformado con construcciones de fusiones traduccionales de las proteínas VvPI y VvAP3 con la proteína fluorescente verde (GFP) y una co-infiltración con ambas construcciones. Se muestran fotografías representativas de lo observado para cada construcción con los filtros para GFP y las superposiciones de GFP con rodamina y GFP con campo claro. El citoplasma se observa sólo como un contorno irregular ya que está comprimido por la vacuola. También se muestra lo observado para el control pCAMBIA1302, cuya expresión es nuclear y citoplasmática.

#### **4.8 Identificación de otros genes relacionados a la vía de floración y determinación de sus patrones de expresión.**

Con el fin de realizar una caracterización más fina de los procesos genéticos que comandan la floración en vid quisimos evaluar la expresión de distintos genes que en *Arabidopsis* se han descrito como fundamentales en la vía, y que exceptuando tres de ellos, no se habían descrito en vides. Entre los genes escogidos, analizamos genes que debían estar tanto río arriba de los genes B, como río abajo, genes cuyas proteínas podrían actuar como compañeras de complejo y otros que podrían ser represores. Para esto escogimos 6 genes, y el proceso para identificar aquellos que no habían sido descritos en vides se señala detalladamente en la sección 3 de Métodos.

- **4.8.1 Caracterización de un posible gen blanco de VvPI y VvAP3: VvNAP**

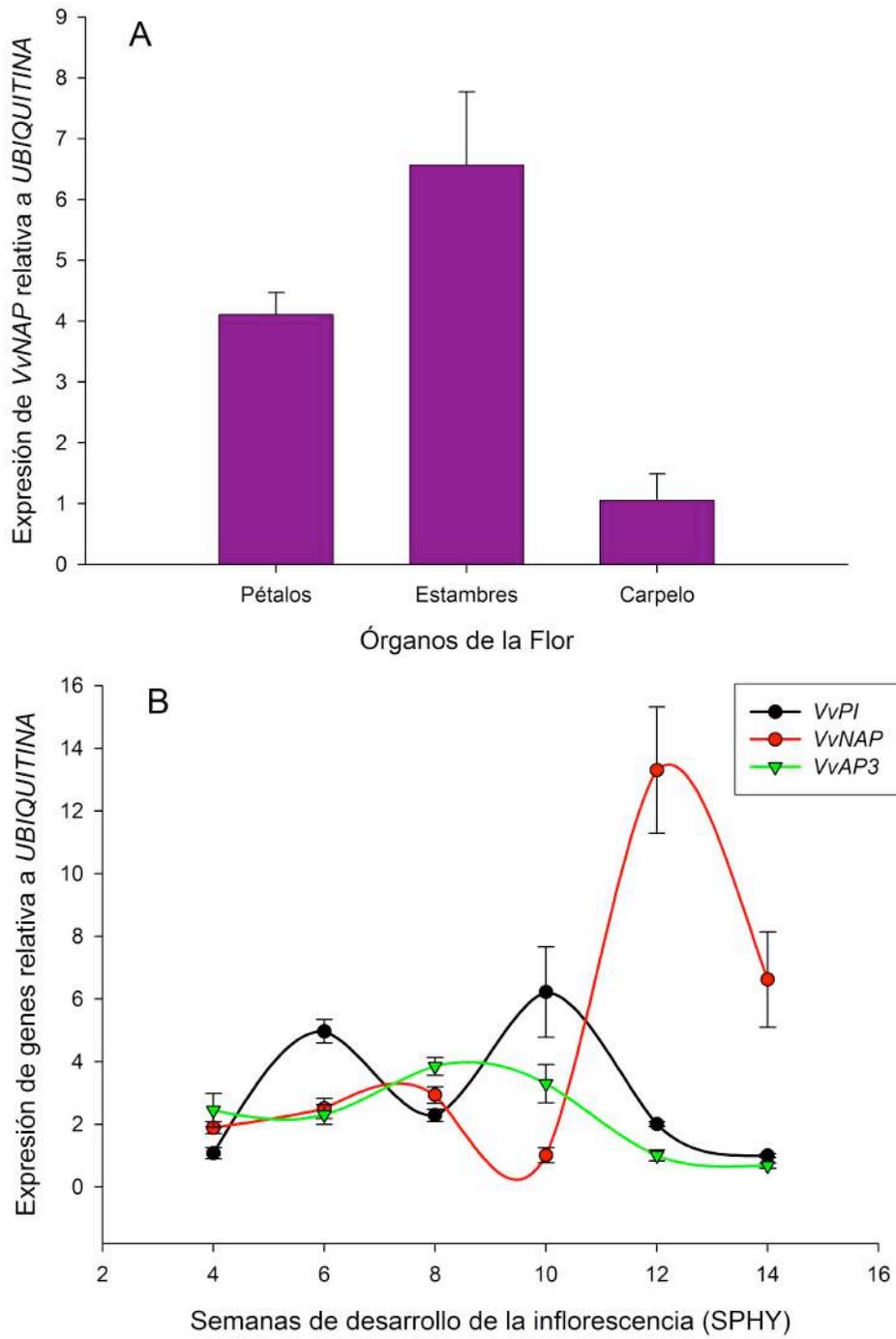
Se han realizado experimentos de expresión global, para determinar los genes río abajo de los factores de transcripción *PI* y *AP3* (Zik y Irish, 2003). Con estas aproximaciones se han identificado listas de genes que responderían a estos factores, en estas listas se encuentran los propios *PI* y *AP3*, ya que como se mencionó anteriormente, ellos serían responsables de su autorregulación. A pesar de que se han descrito genes que cambian su expresión en mutantes de *PI* o *AP3*, hasta la fecha sólo se ha identificado un gen como blanco directo de *AP3* y *PI*. Este gen se conoce como *NAP* o “*NAC-LIKE, ACTIVATED BY AP3/PI*”. La activación de

este gen se determinó por experimentos en *Arabidopsis* basados en una forma inducible por estrógenos de *AP3* y *PI*, en presencia del inhibidor de la traducción cicloheximida, en donde la presencia de estrógenos favorecería la migración de *PI* y *AP3* al núcleo induciendo la expresión de *NAP* (Sablowski y Meyerowitz, 1998). En esta especie *NAP* se expresa relativamente tarde en el desarrollo de pétalos y estambres y se cree que tendría una función en controlar el paso desde división a expansión celular en el crecimiento de estos órganos (Sablowski y Meyerowitz, 1998). Además, este gen se ha asociado con otros procesos como la senescencia en hojas de la roseta en *Arabidopsis* (Guo y Gan, 2006) y se ha identificado su expresión en el centro quiescente de la raíz (Nawy y cols., 2005).

Este gen sólo se ha descrito en *Arabidopsis* y nosotros quisimos identificarlo y analizar su patrón de expresión en vides. De esta manera podríamos realizar una correlación de patrones de expresión, esperando que si en esta especie el gen también se comporta como un blanco de *PI/AP3*, entonces debería expresarse luego de la aparición de estos factores de transcripción. Para esto identificamos el posible homólogo de *NAP* (Como se describe en Materiales y Métodos), al que nombramos *VvNAP*, aislamos, clonamos y secuenciamos un fragmento de su cDNA y mediante la amplificación de este fragmento ensayamos la expresión de este gen por RT-PCR en tiempo real durante las semanas de desarrollo de la inflorescencia y en los distintos órganos de la flor (Fig. N°19).

Para identificar la expresión de este gen en los distintos órganos de la flor, utilizamos los mismos cDNAs de órganos florales usados en los experimentos anteriores (a las 10 SPHY) y realizamos experimentos de RT-PCR en tiempo real. En

estos experimentos, encontramos una expresión significativamente mayor del gen en pétalos y estambres, siendo 3 y 6 veces mayor, respectivamente, si se compara con su expresión en carpelo (Fig. N°19A). Estos datos coinciden con lo esperado para un gen blanco de PI/AP3, ya que es en esos órganos en donde estos genes se expresan. Con respecto a la expresión del gen en el desarrollo de la inflorescencia, se pudo observar que *VvNAP* tuvo un pequeño pico de expresión en la semana 8, luego de que se observara un primer pico de *VvPI* y comenzó a incrementar fuertemente sus niveles de expresión desde la semana 10, luego de que se han observado los máximos de expresión de *VvPI* y *VvAP3*, el gen alcanzó su máximo de expresión en la semana 12 (Fig. N°19B). Si se comparan estos niveles de expresión con lo observado en el desarrollo microscópico de la flor, puede observarse que en la semana 10 los estambres aún son pequeños y compactos y en la semana 12 ya se observa una elongación de sus filamentos y también de la caliptra (Figuras N°19 y 13). Esto podría correlacionarse con la posible función de NAP en Arabidopsis de estimulación de la elongación celular, aunque futuros experimentos tendrían que corroborar esta función.



**Figura N° 19: RT-PCR en tiempo real para analizar los patrones de expresión de *VvNAP* en los órganos de la flor y durante el desarrollo de la inflorescencia en vid.**

A) Se muestra la cuantificación de la expresión del gen en los distintos órganos de la flor, relativa a la cantidad de transcrito de *UBIQUITINA*. Los datos fueron calibrados contra el tejido que menos expresaba el gen (Carpelo). Los cDNAs de órganos florales corresponden al tiempo 10 SPHY del desarrollo de la inflorescencia.

B) Se grafica una comparación de los niveles de transcrito de los genes B (*VvAP3* y *VvPI*) y *VvNAP* durante el desarrollo de la inflorescencia. Cada gen fue normalizado y calibrado por separado.

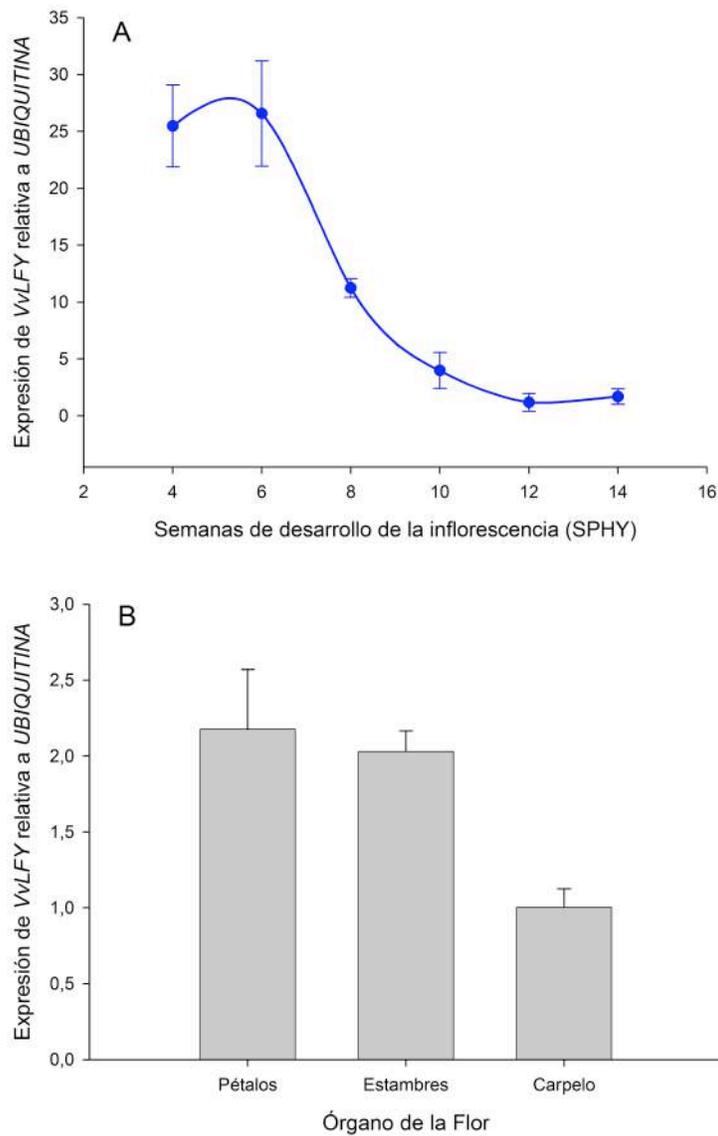
- **4.8.2 Expresión de *LFY*, un posible inductor de los genes *B* en vides**

*LFY* (*LEAFY/FLORICUA*) es uno de los genes maestros que controlan la transición desde crecimiento vegetativo a floral y esta función se ha demostrado tanto en *Arabidopsis* como en otras mono y dicotiledóneas, lo que sugiere una función conservada entre angiospermas filogenéticamente distantes (Blazquez y cols., 1997; Pena y cols., 2001; Shiohara 2008; Zhang y cols., 2008). Este gen es controlado por las distintas vías involucradas en floración, como lo son el ciclo circadiano, la temperatura, los nutrientes y la hormona Giberelina (Blazquez, 2000).

En *Arabidopsis* se ha demostrado que *LFY* regula positivamente a *AP3*, *PI* y *AG*, en el caso de *PI*, se vio que la inducción temprana de *PI* es promovida por *LFY* y la expresión es mantenida luego por las propias proteínas *PI* y *AP3* (Honma y Goto, 2000).

En vides, este gen se describió en el año 2002 y fue denominado *VFL* (Carmona y cols., 2002). En este trabajo utilizamos la secuencia del gen homólogo de *LFY* en vides (*VFL*), para diseñar oligonucleótidos y realizar análisis de expresión por RT-PCR en tiempo real, nuevamente durante el desarrollo de la inflorescencia y en los órganos de la flor (10 SPHY). De esta manera, podríamos relacionar la aparición de *VFL* como posible inductor de *VvAP3* y *VvPI*. Los resultados obtenidos durante el desarrollo de la inflorescencia concuerdan con lo esperado para este gen (Fig. 20A), ya que se observa que el gen es altamente expresado en los comienzos del desarrollo de la flor (Más de 25 veces de inducción), en la semana 8 tiene aproximadamente 11 veces de inducción y su expresión se hace mucho menor en la

semana 10. Por lo tanto, se puede considerar como un gen que se induce tempranamente en el desarrollo floral, lo que podría explicar la inducción temprana de *VvPI* y *VvAP3* en esta especie. Los resultados obtenidos para los órganos florales también concuerdan con lo esperado, ya que se observa expresión del gen en los tres órganos analizados (pétalos, estambres y carpelo), lo que podría tener relación con la inducción de los genes de identidad floral que participan en la formación de estos tres órganos (Fig. 20B).



**Figura N° 20: RT-PCR en tiempo real para analizar los patrones de expresión de *VvLFY* (*VFL*) durante el desarrollo de la inflorescencia y en los órganos de la flor en vid.**

A) Cuantificación de la expresión de *VvLFY* durante el desarrollo de la Inflorescencia.

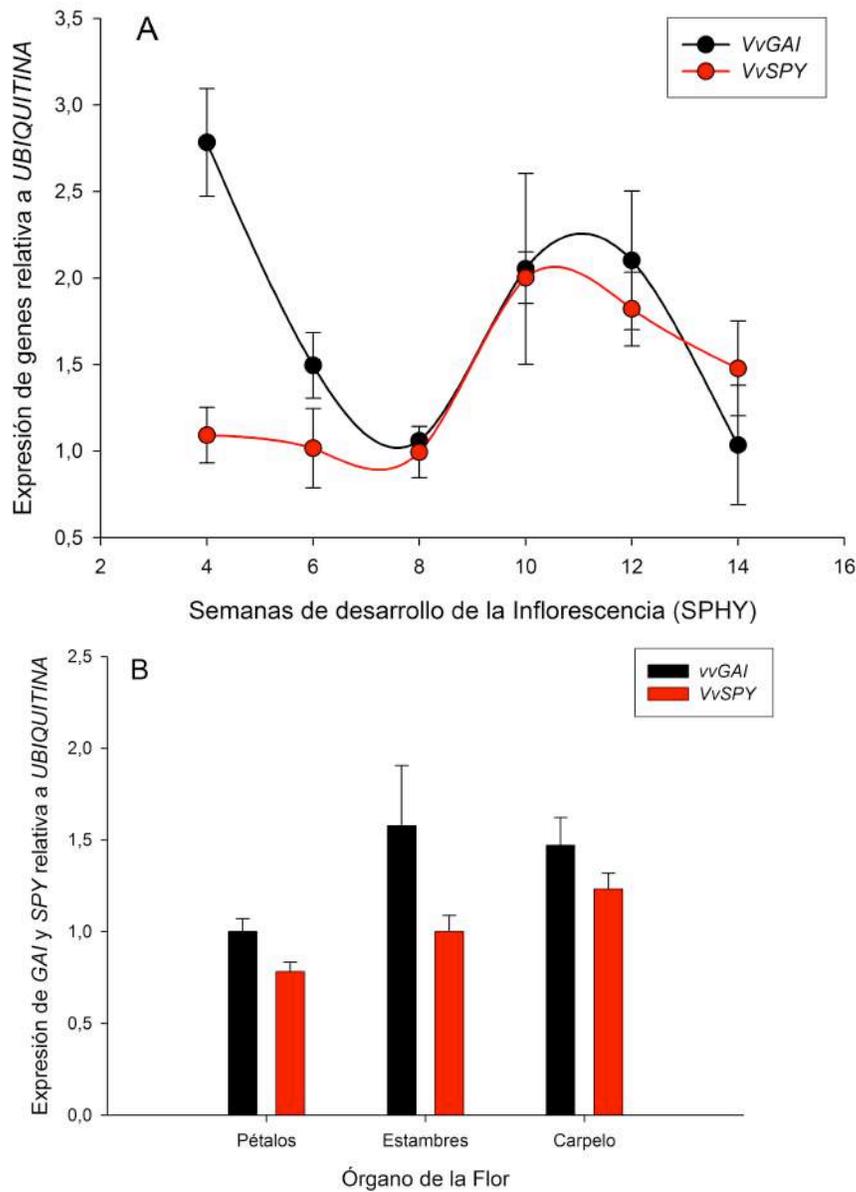
B) Se muestra la cuantificación de la expresión del gen en los distintos órganos de la flor, relativa a la cantidad de transcrito de *UBIQUITINA*. Los datos fueron calibrados contra el tejido que menos expresaba el gen (Carpelo).

- **4.8.3 Expresión de *GAI* y *SPY* en vides**

Se ha demostrado que las Giberelinas (GAs) regula varios procesos del desarrollo vegetal a través de la supresión de un grupo de proteínas nucleares supresoras conocidas como DELLA (Peng y cols., 1997). Existen 5 proteínas DELLA (*GAI*, *RGA*, *RGL1*, *RGL2* y *RGL3*) en el genoma de *Arabidopsis*. Todas ellas contienen un dominio (DELLA) conservado en el N-terminal, que está involucrado en la inactivación de estas proteínas por GA (Peng y cols., 1999). En cuanto al tiempo de floración se ha visto que *GAI* es capaz de reprimir la activación de *LFY*, retrasando la floración (Blazquez y Weigel, 2000). Además, las GAs promoverían el desarrollo floral oponiéndose a la función de varios represores DELLA, promoviendo así la expresión de los genes *AP3*, *PI* y *AG* (Yu y cols., 2004).

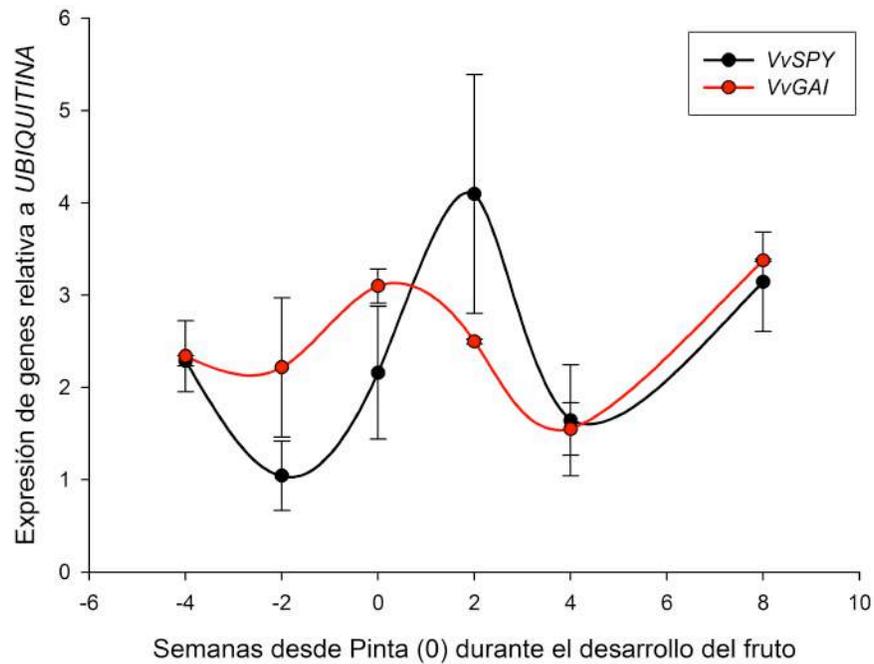
En vides, se ha descrito una mutante para el gen *GAI* (*Gibberelic acid insensitive*) que presenta varios defectos como reducción en el largo de internodos y transformación de zarcillos en inflorescencias (Boss y Thomas, 2002). Nosotros estudiamos la expresión de este gen durante el desarrollo de la inflorescencia y los verticilos florales en la vid. Esta evaluación se realizó en conjunto para el gen *SPINDLY* (*SPY*), el que no se había sido descrito previamente en vides. Se ha reportado en *Arabidopsis* que *SPY* también está involucrado en la señalización de GA y que activaría al gen *GAI* (Blazquez, 2000; Blazquez y cols., 2002). Nuestros resultados muestran una expresión de *GAI* y *SPY* muy coordinada durante el desarrollo de la inflorescencia, especialmente, cuando ambos se activan desde la semana 8 de desarrollo (Fig. N° 21A). Ambos genes se expresan en todos los

órganos de la flor (Fig. N° 21B) y además se expresan durante el desarrollo del fruto (Fig. N° 22). El aumento en la expresión de ambos genes en el desarrollo floral podría relacionarse con la disminución de la expresión de *LFY* o bien con la coincidente disminución de los genes *PI* y *AP3*.



**Figura N° 21: RT-PCR en tiempo real para analizar los patrones de expresión de *VvGAI* y *VvSPY* durante el desarrollo de la inflorescencia y en verticilos florales de la vid.**

A) Cuantificación de la expresión de ambos genes durante el desarrollo de la Inflorescencia. B) Se muestra la cuantificación de ambos genes en los distintos órganos de la flor. Cada gen se normalizó y calibró independientemente.



**Figura N° 22: Expresión de *VvGAI* y *VvSPY* durante el crecimiento y maduración en la piel de la baya.**

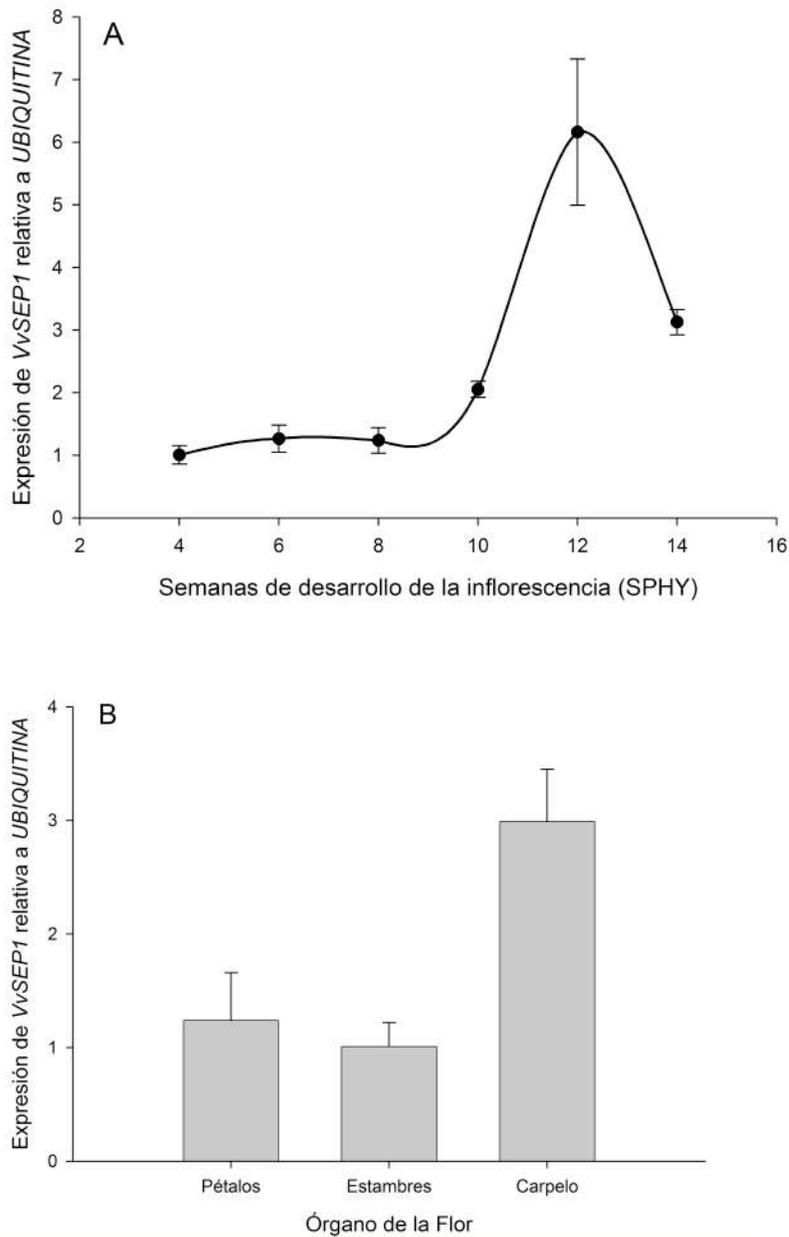
Expresión de *VvGAI* y *VvSPY* por RT-PCR en tiempo real. La pinta ó envero (0) se definió cuando el 50% de las bayas estaban coloreadas en el racimo y la concentración de azúcares alcanzó los 5°brix. Las desviaciones estándar se calcularon con los resultados de tres réplicas independientes.

- **4.8.4 Expresión de un gen clase E (*SEPALLATA*) en vides**

Como se mencionó en la introducción los genes *SEPALLATA* (*SEP*) pertenecen a la clase E de genes de identidad floral, en *Arabidopsis* existen cuatro proteínas *SEP* (1-4) y participan en la formación de distintos tetrámeros con proteínas codificadas por los genes A, B y C que son los responsables de la formación de cada órgano floral (Honma y Goto, 2001).

En vides, se habían descrito los genes *VvMADS2* y *VvMADS4*, con homología de secuencia a los genes *SEP1* y *SEP3* de *Arabidopsis* (Boss y cols., 2002). Nosotros nos interesamos en estudiar los patrones de expresión de *VvMADS2*, al que por facilidad denominaremos *VvSEP1*. En el estudio del 2002, los autores identificaron expresión de *VvSEP1* por hibridación tipo Northern en los estadios finales del desarrollo de la flor. Aquí, diseñamos oligonucleótidos específicos para detectar este gen por RT-PCR en tiempo real y en nuestros tiempos de estudio también identificamos expresión hacia los estadios más tardíos del desarrollo floral, hacia la semana 12, cuando las caliptras aún no se desprendían de la flor (Fig. N° 23A). Además, en el estudio en los órganos florales pudimos observar que el gen se expresa en los 3 órganos estudiados, pero se encuentra expresado mayormente en el carpelo (Fig. N° 23B). También pudimos observar expresión en fruto pre-pinta (dato no mostrado). Ya que el gen se expresa tardíamente en el desarrollo floral y mayormente en carpelo, es posible suponer que su proteína podría estar interactuando con proteínas ABC que también se expresan en estas etapas u

órganos, como es el caso de VvTM6 o AG (Que debiera tener un patrón de expresión similar). Y que además continuarían expresándose durante el desarrollo del fruto.



**Figura N° 23: RT-PCR en tiempo real para analizar los patrones de expresión de *VvSEP1* (*VvMADS2*) durante el desarrollo de la inflorescencia y en verticilos florales de la vid.**

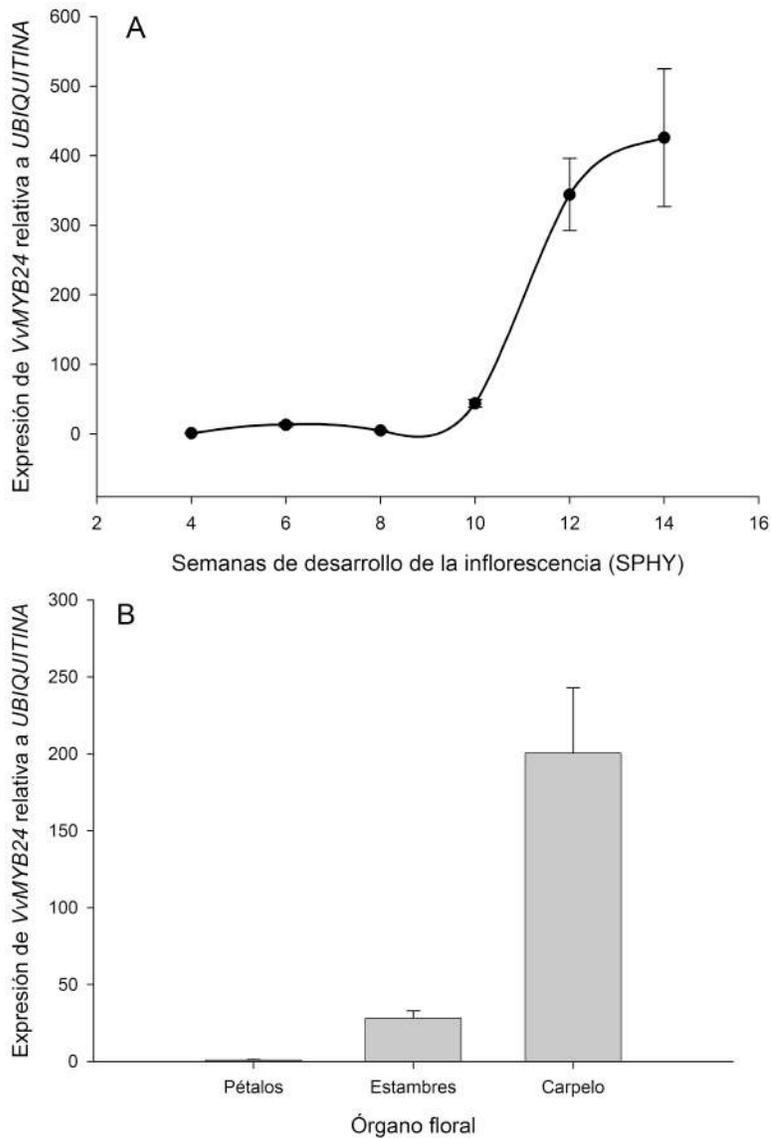
A) Cuantificación de la expresión de *VvSEP1* durante el desarrollo de la Inflorescencia. B) Cuantificación de la expresión del gen en los distintos órganos de la flor.

- **4.8.5 Análisis de un gen relacionado al desarrollo de anteras: MYB24**

Además de estudiar genes relacionados a la clase B consideramos interesante estudiar un gen regulador como *MYB24*. Se ha descrito que en *Arabidopsis* este gen posee una función importante en el desarrollo de anteras. En plantas los genes *MYB* son factores de transcripción que regulan varios procesos del desarrollo y de respuestas de defensa. Además, cada vez se están detectando mas genes tipo *MYB* con expresión específica en ciertos órganos florales (Proyecto Genoma Floral, Soltis y cols., 2007). *AtMYB24*, es un miembro de la familia génica R2R3-MYB de *Arabidopsis*, que se ha descrito se expresa mayoritariamente en las flores y en microsporas y su expresión es altamente regulada durante el desarrollo de la antera (Yang y cols., 2007). La sobre-expresión de este gen en plantas transgénicas produce distintos efectos, como plantas enanas, defectos en la flor y anteras que no se abren al madurar (no dehiscentes) (Yang y cols., 2007).

En nuestro laboratorio se había identificado el homólogo de este gen en vides, encontrándose que en esta especie el gen se expresa mayoritariamente en inflorescencia y en menor cantidad en bayas y semillas (Matus y cols., 2008). Quisimos evaluar su expresión durante el desarrollo de la inflorescencia y en los órganos de la flor. Encontramos que *VvMYB24* comienza a elevar considerablemente su expresión en la semana 10 de desarrollo, alcanzando niveles cercanos a las 400 veces de inducción en la semana 14, hacia el final del desarrollo de la flor (Fig. N° 24A). En los órganos de la flor, es posible encontrar 28 veces más expresión de este gen estambres que en pétalos y 200 veces más en carpelo (Fig. N°24B). Por lo tanto,

en vides este gen también podría ser importante en el desarrollo de la antera, aunque por su alto nivel de expresión en carpelo, es posible que este gen tenga relevancia en el desarrollo de este órgano o mas adelante, cuando éste se diferencia a fruto.



**Figura N°24: RT-PCR en tiempo real para analizar los patrones de expresión de *VvMYB24* durante el desarrollo de la inflorescencia y en los órganos de la flor en vid.**

A) Cuantificación de la expresión de *VvMYB24* durante el desarrollo de la Inflorescencia. B) Cuantificación de la expresión del gen en los distintos órganos de la flor, en donde la calibración fue realizada contra los datos del tejido con menor expresión.

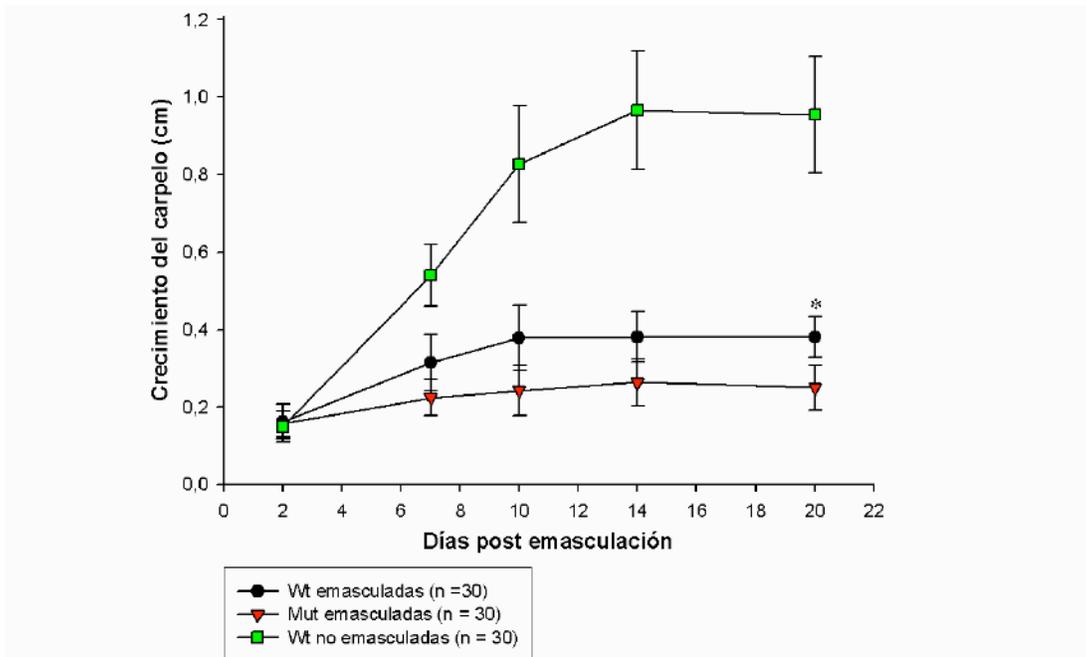
## **SECCIÓN B: Relación entre genes MADS-box clase B y desarrollo del fruto sin polinización**

Al comenzar esta tesis existía evidencia que nos hizo pensar en que los genes B y específicamente *PI*, podrían tener algún efecto inhibitorio en el desarrollo del fruto, ya que mutantes en este gen en manzana, producían frutos en ausencia de polinización, es decir producían frutos partenocárpicos, en los que no era necesaria la polinización para comenzar el desarrollo del fruto (Yao y cols., 2001). Además, algunas variedades de tomate que presentaban alteraciones en sus anteras y óvulos, fenotipo que coincide con posibles alteraciones en el gen *PI*, generaban también frutos partenocárpicos (Mazzucato y cols., 1998). Estas evidencias nos hicieron plantear la hipótesis de que *PI* tendría un efecto negativo en el inicio del desarrollo del fruto. En este sentido, en la literatura se había propuesto que los estambres cumplían una función inhibitoria en el desarrollo del fruto de *Arabidopsis* (Vivian-Smith y cols., 2001), pero no se había propuesto que los genes que controlan el desarrollo del estambre fueran los responsables de esta inhibición. Desafortunadamente esta hipótesis es difícil de probar en una especie de ciclo de vida largo como la vid, en donde llegar a ver el fruto de una planta transformada podría tardar hasta 5 años. Es por esto que quisimos poner a prueba la hipótesis en *Arabidopsis*, que no es un modelo ideal para estudiar desarrollo de fruto, ya que sólo presenta una vaina o silicua muy pequeña como fruto, pero las herramientas existentes para esta especie podrían darnos alguna clave a nuestra pregunta. Para eso utilizamos plantas de *Arabidopsis* mutantes en el gen *PI* (mutantes *pi-1*), plantas

que no se polinizan porque no presentan estambres y cuantificamos el posible desarrollo del fruto, comparando éste con el desarrollo del fruto en flores silvestres no polinizadas y polinizadas. En *Arabidopsis* el fruto se desarrolla a partir de un crecimiento del carpelo que forma la vaina o silicua, por lo que en cada grupo fuimos midiendo el crecimiento del carpelo cada dos días desde la emasculación (ver detalle del diseño experimental en sección Métodos). Según los antecedentes, esperábamos que de ocurrir lo mismo en *Arabidopsis* que en manzana, las flores de plantas mutantes *pi-1* desarrollarían un fruto aunque fuera pequeño, en ausencia de polinización y que en las flores de plantas silvestres no polinizadas no se observaría desarrollo de éste. Sorprendentemente, observamos que en este experimento en las flores emasculadas mutantes no sólo no había desarrollo de un fruto sin polinización, si no que además el carpelo, alcanzaba un tamaño menor que el de flores silvestres emasculadas sin polinizar. En las plantas silvestres emasculadas se vio que aunque no fueran polinizadas el carpelo continuaba creciendo durante 7 días desde la emasculación (Fig. N° 25). Este resultado podía estar dado porque, el fruto de *Arabidopsis* no se comportaba como el de manzano, ya que en ambas especies los frutos tienen orígenes distintos, el fruto de *Arabidopsis* se origina solamente a partir del crecimiento del carpelo y el de manzana lo hace a partir del crecimiento de todos los órganos de la flor. Otra posible explicación a este resultado sería que la mutación *pi-1* tendría un efecto adicional al de la sola desaparición de *PI*, ya que como se mencionó anteriormente, en esta mutación se genera un codón de término luego del dominio de unión al DNA de la proteína, el que se conserva íntegro. Este segmento

de la proteína mutante podría estar uniéndose al DNA y ejerciendo un efecto de dominancia negativa como ya ha sido propuesto por (Krizek y Meyerowitz, 1996).

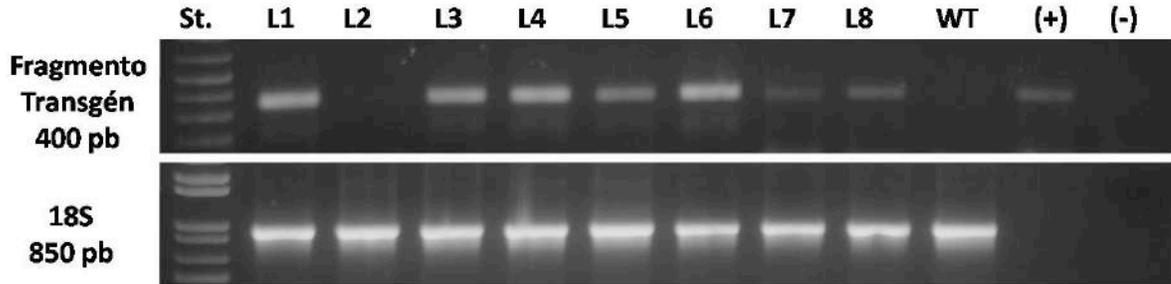
Lamentablemente, otras mutantes que existían para este gen en *A. thaliana* ya no existen, debido a la complejidad de mantener las mutantes que son estériles. También realizamos una construcción de silenciamiento del gen *AtPI* y con ella realizamos transformaciones en *A. thaliana*. Logramos obtener sólo una línea que presentaba defectos en la flor, ausencia de pétalos y estambres no funcionales, pero lamentablemente el fenotipo se perdió tras realizar un cruce de esta línea con una silvestre y no hemos podido volver a obtener este fenotipo en otras líneas.



**Figura N° 25: Ensayo para evaluar partenocarpia en plantas de *A. thaliana* (L-er) mutantes para el gen *PISTILLATA* (mutación pi-1).**

Se representa el crecimiento o elongación del carpelo (órgano desde el que se origina el fruto en *A. thaliana*), luego de la emasculación o remoción de los verticilos externos: sépalos, pétalos y estambres, para evitar la polinización. En cuadrados verdes se representa la elongación del carpelo en flores silvestres polinizadas naturalmente. En círculos negros el crecimiento del carpelo luego de la emasculación en flores silvestres y los triángulos rojos representan el crecimiento del carpelo en mutantes pi-1 sin polinizar. Estas últimas no presentan estambres, por lo que no fue necesario removerlos, pero si se removieron los verticilos externos para que el tratamiento de emasculación fuera lo más similar posible al de las flores silvestres. El n representa el número de flores tratadas pertenecientes a distintas plantas. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas en el día 20 entre plantas silvestres y mutantes emasculadas (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Para poder estudiar la hipótesis en una especie con características mas similares a la vid, pero con un ciclo de vida mas corto, quisimos realizar silenciamiento génico en Tomate (*Solanum lycopersicum*), cuyo fruto al igual que la vid, se origina a partir de un engrosamiento de las paredes del ovario. Para esto, identificamos un consenso tentativo en tomate que contenía un marco de lectura abierto con alta homología a *PI TPI* o *LePI* (TC155607, TIGR Tomato gene index). Amplificamos y clonamos este TC, estudiamos su expresión por hibridación tipo Northern, identificando expresión sólo en tejido floral (Dato no mostrado). Luego, elegimos una zona de 315 pb que contenía tanto parte de la zona 3' del gen como de la zona 3' UTR, ya que esta es la zona más disímil entre genes MADS-box. Esta zona fue incorporada en el vector de silenciamiento tipo Gateway "Hellsgate12". Se realizaron transformaciones génicas de *S. lycopersicum*, tal como se describe en la sección 3 de Métodos. Se obtuvieron 7 líneas transgénicas, cuya transgenia se verificó por PCR amplificando con oligonucleótidos que apareaban con los sitios attB presentes en la zona del vector que se inserta en el genoma de la planta (Fig. N°26).



**Figura N°26: PCR en DNA para evaluar transgenia de plantas de Tomate con el vector Hellsgate12 para silenciar LePI.**

En el panel superior se muestra el resultado obtenido por PCR amplificando con los oligonucleótidos para los sitios attB, que amplifican un fragmento de aproximadamente 400 pb, que contiene a los sitios attB y una zona de 315 pb del gen PI de tomate. St: 1 kb plus (Invitrogen); L1-L8: distintas líneas analizadas; WT: Planta silvestre; (+) vector hellsgate12:LePI utilizado para transformar. En el panel inferior se muestra la amplificación del gen 18S de tomate como control de gen constitutivo, para este gen no se utilizó control positivo con el gen clonado.

Actualmente nos encontramos esperando que estas plantas produzcan flores para evaluar el fenotipo.

En el caso de la vid, puesto que durante este trabajo clonamos los genes *VvPI* y *VvTM6*, realizamos construcciones de silenciamiento para ambos genes. Con el mismo vector de silenciamiento "Hellsgate 12". Se aprovechó un protocolo de transformación de vides que se había implementado en el laboratorio por Agnes Cadavid para incorporar estos vectores en especies de vides, este protocolo utiliza embriones somáticos como explante a transformar. Hasta la fecha contamos con dos líneas resistentes a antibiótico para la construcción de silenciamiento de *VvPI* y 5 líneas resistentes para la construcción para silenciamiento de *VvTM6*. Actualmente nos encontramos esperando contar con una mayor cantidad de tejido por línea para confirmar la presencia del transgén en éstas.

## 5. DISCUSIÓN

### **5.1 Contexto evolutivo de la clase B de genes MADS-box**

Debido a su compleja historia evolutiva, atravesando distintos eventos de duplicación, la clase B de genes MADS-box de floración ha sido una de las clases génicas más estudiadas en distintas especies. Sin embargo, esta clase no había sido descrita en Vides. La clase B está compuesta por dos linajes, el primero conocido como PI/GLO (PISTILLATA/GLOBOSA) y el segundo como AP3/DEF (APETALA3/DEFICIENS), debido a los ortólogos encontrados en *A. thaliana* y *A. majus*. Los genes pertenecientes a estos linajes se han asociado con la determinación de identidad de los órganos florales pétalos y estambres. Estos genes han sido estudiados por su importante función como genes homeóticos, involucrados en el desarrollo floral. Además, su estudio en distintas especies ha permitido realizar análisis evolutivos, establecer posiciones filogenéticas de determinadas especies y determinar cómo cambios en las secuencias, como duplicaciones génicas, mutaciones o cambios en marcos de lectura, pueden llevar a la aparición de nuevas funciones en plantas (Sub y neofuncionalización) (Kramer y cols., 2006). En el presente trabajo identificamos 3 genes de vides pertenecientes a la clase B de genes MADS-box: *VvPI* del linaje PI/GLO y *VvAP3* y *VvTM6* pertenecientes al linaje AP3/DEF. Estos genes, además de presentar alta identidad de secuencia con sus homólogos en otras especies, se agruparon en sus respectivos clados monofiléticos

junto a otros miembros de sus linajes. Así también y coincidentemente con los datos de genes B para otras especies, los 3 genes se expresaron en tejidos florales.

En materia evolutiva, se cree que ambos clados (PI/GLO y AP3/DEF) emergieron de una clase B primitiva, luego de una duplicación génica que habría tenido lugar poco después de la separación entre angiospermas y gimnospermas, aproximadamente 290 millones de años atrás (Kramer y cols., 1998) (Fig. N°3). De esta duplicación se habrían originado dos linajes: PI/GLO y paleoAP3. Mientras que el linaje PI/GLO parece haberse conservado altamente durante la evolución, el linaje paleoAP3 habría experimentado una diversificación importante (Kramer y cols., 1998). Se cree que una nueva duplicación del linaje *paleoAP3* habría dado origen a dos linajes parálogos, conocidos como euAP3 y TM6, proceso que habría ocurrido antes de la diversificación de las dicotiledóneas superiores (Kramer y cols., 1998; Kramer y Irish, 1999) (Fig. N° 3). Así, TM6 habría conservado de su ancestro el motivo conocido como paleoAP3 en su zona C-terminal, mientras que el linaje euAP3 habría divergido hasta presentar un nuevo motivo conocido como euAP3 (SDLTTFALLE) (Kramer y cols., 2006). Se han sugerido dos vías distintas por las que se podría haber adquirido este nuevo motivo, una de ellas es que una inserción de 8 nucleótidos habría generado un cambio en el marco de lectura en la región codificante del motivo (Vandenbussche y cols., 2003), otra explicación mas simple sería por una delección de un único nucleótido (Kramer y cols., 2006).

En nuestro estudio, vimos que VvTM6 muestra varias características del linaje TM6, como por ejemplo, la presencia del motivo paleoAP3 (YGxHDLRLA) en su zona

C-terminal. Por otro lado, VvAP3 presenta el motivo característico de su linaje euAP3 en su región C-terminal.

La mayoría de los genes descritos del tipo AP3/DEF en eudicotiledóneas pertenecen al linaje euAP3, como por ejemplo, AP3 en *Arabidopsis* y DEF en *Antirrhinum majus*. El primer gen del linaje TM6 fue encontrado en tomate el año 1991 (Tomato MADS box gene 6) (Pnueli y cols., 1991). Desde esa época existieron pocos avances en dilucidar su función, probablemente porque este gen está ausente en la planta modelo *A. thaliana*. Sólo a mediados del año 2006, se describió por primera vez la función de este gen en Tomate (de Martino y cols., 2006) y Petunia (Rijpkema y cols., 2006). De los estudios en estas especies se sugirió que luego de la posible duplicación del linaje paleoAP3, los genes euAP3 habrían adquirido una función en el desarrollo de los pétalos, mientras que TM6 habría comenzado a controlar el desarrollo de los estambres (Lamb y Irish, 2003; de Martino y cols., 2006; Kramer y cols., 2006; Rijpkema y cols., 2006). Es decir, en este caso la duplicación de un linaje de genes MADS-box habría resultado en una sub-funcionalización de genes, o sea, cuando los genes originados realizan distintos aspectos de la función del gen original. Este proceso se ha descrito también para *SHATTERPROOF* (SHP) y *AGAMOUS* en *Arabidopsis* y sus ortólogos en *Antirrhinum majus*, *PLENA* y *FARINELLI* (Causier y cols., 2005). Se cree que la sub-funcionalización de TM6 y euAP3 se debe a patrones de expresión diferenciales mas que a un cambio sustancial de sus características estructurales o de sus funciones (de Martino y cols., 2006; Kramer y cols., 2006). En el presente trabajo reportamos la presencia de los dos genes AP3 en vides: *VvTM6* y *VvAP3*. Ambos genes se expresan en

inflorescencia, aunque en diferentes tejidos y períodos de desarrollo de ésta. Estos resultados podrían sugerir que una sub-funcionalización de estos genes podría haber ocurrido también en vides.

Según los análisis realizados en este trabajo, los 3 genes MADS-box clase B encontrados, serían los únicos de esta clase presentes en el genoma de la vid. Se realizó una búsqueda *in silico* de secuencias en el genoma de *V. vinifera* cv. Pinot noir y no se encontraron “Contigs” correspondientes a otros genes clase B. Además, este análisis *in silico* nos permite sugerir que estos genes se encontrarían en copia única en el genoma.

## **5.2. Posibles funciones de los genes de clase B en vides.**

Cuando se comparó la expresión de genes de la clase B en todos los tejidos, se vio que *VvAP3* se expresa exclusivamente en inflorescencias, mientras que *VvPI* se expresa mayoritariamente en este órgano, pero también se detectó una pequeña expresión en raíces y hojas. Aunque es posible proponer que esta expresión no necesariamente representa una función del gen en estos tejidos, en la literatura es posible encontrar reportes de expresión de *PI* en tejidos no florales de otras especies. Se ha descrito expresión de *PI* en hojas de *Eucalyptus grandis* Maiden, *Gerbera hybrida* y *Zea mays* (Southerton y cols., 1998; Yu y cols., 1999; Munster y cols., 2001). A su vez, se ha postulado que *PI* participaría en el desarrollo vascular en rizomas de *Eranthis hyemalis* (Skipper, 2002). Contrariamente, en *Arabidopsis* u otras plantas modelos no se ha descrito expresión en este tipo de tejidos, por lo que

resulta muy relevante el estudio de genes MADS-box en otras especies con el fin de mejorar el conocimiento existente de la función de éstos en plantas. Así se podrá asociar la presencia de distintos genes MADS-box o de distintas regulaciones, a la gran diversidad morfológica observada en las diferentes especies.

La caracterización genética y molecular del proceso de floración en diferentes especies revela una conservación del mecanismo genético básico que controla los primeros estadios de desarrollo de la flor (Theissen y Saedler, 1999; Ng y Yanofsky, 2001). Sin embargo, se asume que debiera existir un cierto tipo de plasticidad en los complejos que se forman con proteínas MADS-box y sus funciones entre las distintas especies (Vandenbussche y cols., 2004). Aunque es probable que genes similares estén involucrados en varios procesos del desarrollo floral en diferentes especies, es altamente probable que estos sean regulados de manera diferencial. En el caso de la vid, su proceso de floración tiene características peculiares. Por ejemplo, los meristemas que originarán la inflorescencia son generados una temporada antes del desarrollo de ésta, permanecen latentes y sólo desarrollarán inflorescencias si las condiciones ambientales son las adecuadas en la siguiente primavera. Esto hace que la vid sea una especie interesante para el estudio del proceso de floración y de los mecanismos genéticos y moleculares que lo comandan.

Cuando se analizó la expresión de *VvTM6*, *VvPI* y *VvAP3* durante el desarrollo de la inflorescencia, se observaron niveles máximos de expresión diferentes para los distintos genes. *VvPI* aumenta su expresión desde la semana 6 desde la hinchazón de la yema y alcanza niveles significativamente mayores en la semana 10. Si se comparan estos niveles con el análisis microscópico del desarrollo de la flor, se

puede observar que el desarrollo de los estambres se promueve significativamente durante la semana 6, luego de que el primordio que los origina ha comenzado a desarrollarse (Fig. 13F–H). La máxima expresión de *PI* se alcanzó justo antes de que se observara polen libre capaz de alcanzar las papilas estigmáticas (Fig. 13R, S). Durante la semana 12 puede deducirse que ya ha ocurrido la polinización y fertilización, ya que se observa diferenciación celular en donde estaba el óvulo y acumulación de lignina en los integumentos externos (tinción roja). En este punto, la expresión de *PI* ha decaído drásticamente. En la literatura existía sólo una evidencia de que este gen podría estar regulado por polinización/fertilización, en donde experimentos en orquídea permitían suponer que al menos en esa especie *PI* (*PeMADS6*) era regulado por ese fenómeno (Tsai y cols., 2005).

Quisimos poner a prueba esta hipótesis, utilizando a la vid como modelo, para esto realizamos experimentos de emasculación y polinización en dos variedades distintas y observamos que en las flores que se polinizaron existía una disminución drástica de la expresión de *VvPI* y que esta disminución era significativamente menor en flores que no se habían polinizado. De esta manera confirmamos que existe un efecto negativo de la polinización en la expresión de *VvPI*. Además los mismos resultados pudieron observarse para *VvTM6*, por lo que podría suponerse que esta regulación negativa por polinización puede ser un proceso general para regular la expresión de los genes B en vides.

Para el caso de *VvAP3* y comparando con *VvPI*, se encontró una mayor cantidad de transcrito en la semana 8 manteniéndose el nivel hasta la semana 10. Esta expresión se contrasta con lo encontrado para *VvTM6*, ya que este último se

expresa de manera relativamente constante durante el desarrollo de la flor, excepto en la semana 12, en donde se observa un máximo de expresión. Esta diferencia de expresión entre *VvAP3* y *VvTM6* podría estar relacionada con la sub-funcionalización reportada para estos genes en tomate y petunia, en donde *AP3* estaría más relacionado con el desarrollo de los pétalos y *TM6* con el de los estambres (de Martino y cols., 2006; Rijpkema y cols., 2006). En vides *AP3* se expresa antes, lo que coincide con que los pétalos son unos de los primeros órganos en formarse dentro de la flor. En cambio, *TM6* se expresa de manera más tardía y podría estar involucrado en algún proceso en el desarrollo final de las anteras. Por lo tanto, aunque estos genes pertenecen a la misma clase genética, podrían actuar en períodos o tejidos diferentes durante el desarrollo de un órgano floral específico. Sería interesante estudiar la expresión de estos genes en momentos aún más tempranos del desarrollo floral, pero hay que recordar que eso requeriría estudiar yemas latentes que se forman un año antes del desarrollo de la flor.

En este estudio, en los tres genes analizados se vio una disminución en la expresión luego de las 12 semanas, coincidentemente con la caída de la caliptra y la senescencia de los estambres. Como se mencionó anteriormente, nuestros experimentos de polinización permiten suponer que esa caída es debida a un efecto negativo de la polinización sobre la expresión de estos genes.

En este trabajo también se evaluó la expresión específica de los genes en cada uno de los órganos florales mediante experimentos de qRT-PCR. En estos experimentos se detectó una expresión de *VvPI* y *VvAP3* restringida a los pétalos y estambres, concordante con lo observado en sus ortólogos. Por otro lado, *VvTM6* se

expresó también en carpelos. Estos resultados podrán ser complementados en un futuro con técnicas de hibridación *in situ*, para detectar la expresión de los genes en capas celulares específicas. Adicionalmente, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por de Martino y cols. en tomate (2006), en donde también se detectó expresión de TM6 en carpelo.

Sorprendentemente, también encontramos que *VvTM6* se expresa durante la maduración del fruto en la piel de la baya, en frutos completos y semillas. Resultado que no se había reportado para ningún otro ortólogo. Comparando la expresión en los distintos tejidos, se obtuvo un máximo en frutos completos (Incluyendo piel, pulpa y semilla) en la semana 6 post pinta. Por esta razón es posible inferir una posible función del gen en el desarrollo del fruto. En este caso, *VvTM6* tendría una función durante el desarrollo de la flor, luego su expresión decrecería y volvería a ascender durante el desarrollo del fruto.

En *Populus trichocarpa* se ha propuesto una posible función de TM6 (PTD) en regulación de proliferación celular (Sheppard y cols., 2000) y *VvTM6* podría estar cumpliendo una función similar durante las dos fases de crecimiento exponencial del fruto de la vid, antes y después de la pinta. En Petunia se reportó expresión de *PhTM6* en placenta en desarrollo y óvulos (Vandenbussche y cols., 2004; Rijpkema y cols., 2006), nuestros resultados indican que en vides esta expresión continuaría durante el desarrollo del fruto. Ahora, de estos resultados surgen interrogantes interesantes, como por ejemplo: ¿Realmente *TM6* cumple alguna función en el desarrollo del carpelo y del fruto?, ¿*TM6* actuaría como homo o heterodímero y con qué proteínas podría estar interactuando en el caso de formar heterodímeros?.

Resulta interesante suponer que los complejos proteicos formados por *VvTM6* durante el desarrollo de la flor deben ser distintos a los formados en el desarrollo del fruto, ya que los posibles factores de transcripción con los que actuaría formando tetrámeros en la flor (AP3/PI) ya no se expresan durante el desarrollo del fruto. Esto indicaría que un mismo factor de transcripción podría cumplir funciones distintas dependiendo del tejido donde se exprese y de los complejos proteicos que forme en ese momento.

En cuanto a la localización sub-celular de las proteínas B en vides no pudimos observarlas en núcleo con los métodos utilizados, por lo que es posible que necesiten formar parte de un complejo para ser destinadas a este organelo.

El año 2006 Sreekantan y cols. describieron dos variedades mutantes con aberraciones florales de *V. vinifera*. En la primera "Mourvèdre" se observaban pétalos y sépalos normales y estructuras tipo carpelo con óvulos fusionados en vez de estambres. En la segunda mutante "Bouchalès", algunas flores mostraron doble número de pétalos y estambres pequeños o ausentes. Los autores de este trabajo relacionan estas mutantes con el gen que ellos nombran *VvMADS9 (VvPI)*, ya que su expresión temporal durante el desarrollo floral está disminuida o retrasadas en ellas. Aunque esta relación podría ser correcta, esto no indica que necesariamente haya una mutación en el gen *PI* en esas variedades, ya que el retraso en la expresión del gen también podría deberse a un defecto en la región regulatoria del gen o en genes que se encuentren río arriba de él, o bien una alteración en alguna de las proteínas que actúan en el tetrámero (AP3 o proteínas SEPALLATAS).

En este trabajo nosotros obtuvimos una complementación parcial de fenotipo, cuando usamos a la mutante *pi-1* de *A. thaliana* como modelo para la expresión heteróloga de *VvPI*. Encontramos una reversión parcial en el primer, segundo y tercer verticilo de la flor, aunque esta reversión fue muy pequeña, podríamos deducir que *VvPI* en las vides podría ser un homólogo funcional (ortólogo) de PI. Sin embargo, hay que tener en cuenta, que un sistema heterólogo no siempre revela la función de un gen en su organismo de origen, es por esto que *VvPI* podría tener funciones distintas o adicionales a las de *AtPI*. La reversión fenotípica fue parcial, y nosotros creemos que esto podría estar dado por un remanente de función en el gen de la mutante, ya que la mutación está después del dominio de unión al DNA y se ha visto en las mutantes que el transcrito del gen mutante se expresa. Es por esto que el fragmento de la proteína podría estar actuando como dominante negativo, esta hipótesis también fue planteada por Krizek y Meyerowitz el año 1996, ya que vieron que el propio gen de *Arabidopsis* tampoco era capaz de restaurar completamente el fenotipo de la mutante.

A pesar de que es posible que la mutación *pi-1* esté ejerciendo una dominancia negativa, es posible también que no se vean mayores reversiones de fenotipo porque en todas las construcciones se ha utilizado el promotor constitutivo 35S y sea necesaria una expresión específica comandada por el promotor endógeno del gen.

En la mayoría de los análisis funcionales de genes PI ortólogos en la mutante *pi-1*, se han reportado niveles de complementación muy bajos (Winter y cols., 2002; Tsai y cols., 2005). Con el único ortólogo con el que se ha conseguido una mayor

complementación es con el de arveja (*Pisum sativum*), en donde sorprendentemente el gen no presenta el motivo PI en su zona 3' (Berbel y cols., 2005).

Si se comparan las especies *V. vinifera* y *A. thaliana* es posible deducir una plasticidad en los complejos multiméricos de genes MADS-box que participan en la identidad de órganos florales, por lo que además la interacción de VvPI con otros factores en *Arabidopsis* podría ser débil. La presencia de TM6 en vides ayuda a confirmar que existen diferencias en el control floral de ambas especies.

La posición filogenética de las vides aún no ha sido totalmente definida, aunque se cree que es más probable que se encuentre dentro del grupo de las rosideas en las eudicotiledóneas nucleares (Jansen y cols., 2006) y no que sea parte de las asterideas como se creía anteriormente. Así, el análisis detallado de secuencias de genes MADS-box en vides podría ayudar a definir con mayor certeza su posición dentro de las dicotiledóneas verdaderas.

Algunos de los resultados hasta aquí discutidos fueron publicados en un artículo que se incluye en el Anexo N°1.

### **5.3 Descripción de una red de genes asociados a floración en *V. vinifera***

Además de caracterizar la clase B de genes de floración en vides, en este trabajo quisimos caracterizar la expresión de otros genes relacionados con floración, que pudieran estar río arriba o abajo de nuestros genes, de genes que codifican para proteínas que pudieran actuar como compañeros de complejo proteico de los genes B, que pudieran actuar como represores u otros que no necesariamente estuvieran

relacionados con los genes B, pero que se han asociado al desarrollo de verticilos florales. De esta manera, caracterizamos los patrones de expresión de 3 genes que habían sido descritos previamente en vides (*LFY* o *VFL*; *VvGAI* y *VvSEP1* o *VvMADS2*), de dos genes que no lo habían sido (*VvNAP* y *VvSPY*) y de un gen que había sido descrito recientemente en nuestro laboratorio (*VvMYB24*).

Para el caso de genes que pudieran estar río abajo de los genes B, quisimos identificar el homólogo en vides al gen *NAP* “*NAC-LIKE, ACTIVATED BY AP3/PI*”, que a la fecha es el único gen que en *Arabidopsis* se ha descrito como blanco directo de *AP3* y *PI*. Se cree que en esta especie *NAP* tendría una función en controlar el paso desde división a expansión celular en el crecimiento de estos órganos (Sablowski y Meyerowitz, 1998). Además, este gen se ha asociado con otros procesos como la senescencia en hojas de la roseta en *Arabidopsis* (Guo y Gan, 2006) y se ha identificado su expresión en el centro quiescente de la raíz (Nawy y cols., 2005).

*NAP* sólo se había descrito anteriormente en *Arabidopsis* y nosotros quisimos identificarlo y analizar su patrón de expresión en vides, para realizar una correlación con los patrones de expresión de *PI/AP3*. Identificamos el posible homólogo de *NAP* y lo nombramos *VvNAP*. Encontramos que en vid, *VvNAP* se expresa de manera significativamente mayor en pétalos y estambres, lo que coincide con lo esperado para un gen blanco de *VvPI/VvAP3*, ya que es en esos órganos en donde encontramos expresión de estos genes. Con respecto a la expresión del gen en el desarrollo de la inflorescencia, se puede observar que *VvNAP* tiene su máximo de expresión luego de que se han observado los máximos de *VvPI* y *VvAP3*. Así *VvNAP*

alcanza su máximo de expresión en la semana 12, cuando ya se observa una elongación de los filamentos de la antera y también de las células de la caliptra. Estos datos podrían correlacionarse con la posible función de NAP en Arabidopsis de estimulación de la elongación celular. Por lo tanto, nuestros datos permiten suponer que *VvNAP* es un gen blanco de *VvPI/VvAP3*. Sin embargo, experimentos mas complejos, como por ejemplo inmunoprecipitación de cromatina o geles de retardo permitirían evaluar una interacción directa entre los factores de transcripción B y el promotor del gen *VvNAP*. Además, sería interesante evaluar si *VvTM6* tiene alguna función en la activación de *VvNAP*, ya que como los experimentos existentes se han realizado en Arabidopsis, y esta especie carece de *VvTM6*, no existe información al respecto.

Luego, se quiso analizar la expresión de un posible gen inductor de los genes B, y se analizó la expresión del homólogo a *LEAFY* (*LFY*) en vides (*VvLFY* o *VvVFL*). En Arabidopsis se ha visto que *LFY* regula positivamente la expresión de *AP3*, *PI* y *AG*. En el caso de *PI*, se sabe que la inducción temprana de *PI* es producida por *LFY*, que se une a una región distal de su promotor, y que luego la expresión es mantenida por autorregulación del gen, cuya proteína se une a una región inicial de su promotor (Honma y Goto, 2000).

En vides, el homólogo de este gen se conoce como *VFL* (*VvLFY*), y se ha descrito que se expresa en la primera temporada, durante la inducción floral, especialmente en las zonas meristemáticas florales (Carmona y cols., 2002). Además, se ha detectado expresión de *VFL* en otras regiones meristemáticas, como el meristema apical y el lateral que originará los zarcillos. Así también, se expresa en

primordios de hojas y en los márgenes de hojas en crecimiento. Nosotros estudiamos la expresión de este gen durante el desarrollo de la inflorescencia y en los órganos de la flor, encontrando que sus patrones de expresión coinciden con lo que podría ser un gen inductor de *VvAP3* y *VvPI*, ya que tiene una expresión mucho más temprana que estos últimos. Encontramos expresión en los tres órganos florales, lo que podría tener relación con la inducción de los genes de identidad floral que participan en estos tres órganos en vides.

Se ha demostrado que la Giberelina (GA) regula varios procesos del desarrollo vegetal a través de la supresión de un grupo de proteínas nucleares supresoras conocidas como DELLA (Peng y cols., 1997). Existen 5 proteínas DELLA (GAI, RGA, RGL1, RGL2 y RGL3) en el genoma de *Arabidopsis*. Todas ellas contienen un dominio (DELLA) conservado en el N-terminal, que está involucrado en la degradación de estas proteínas inducida por GA. GAI y RGA son reguladores negativos de la respuesta a GA en elongación del tallo, crecimiento de la raíz y control del tiempo de floración (Peng y cols., 1999). En cuanto al tiempo de floración se ha visto que GAI es capaz de reprimir la activación de LFY, retrasando la floración (Blazquez y Weigel, 2000). Además, la GA promovería el desarrollo floral oponiéndose a la función de varios represores DELLA, promoviendo así la expresión de los genes *AP3*, *PI* y *AG* (Yu y cols., 2004).

En vides, se ha descrito una mutante para el gen *GAI* (*Gibberelic acid insensitive*) que presenta varios defectos, como reducción en el largo de internodos y transformación de zarcillos en inflorescencias (Boss y Thomas, 2002). Esta mutante presentó fenotipo sólo cuando se produjeron plantas completas a partir de la capa

celular L1 de una variedad que contenía esta variación somaclonal. En ese trabajo, se postula que la proteína mutante *gai* es insensible a GA (que normalmente reprimiría su función, enviándola a degradación) y que por lo tanto las GAs tendrían una función inhibitoria en la promoción de la floración, ya que GAI normalmente estaría promoviendo la formación de inflorescencias en vez de zarcillos. De esto, los autores deducen que en vides, las GAs tendrían un efecto inhibitorio en la floración, al contrario de lo que se ha reportado para la mayoría de las especies. Nosotros creemos que esta es aún una hipótesis por estudiar, ya que no se ha comprobado que la mutación puntual presente en la proteína sea funcional y genere insensibilidad GA. Además, podría haber distintas proteínas DELLA actuando en distintos blancos, y por lo tanto la acción de GAs podría ser dependiente de las proteínas que controla río abajo. Aquí estudiamos la expresión de este gen en las semanas de desarrollo de la vid, en conjunto con la del gen *SPINDLY (SPY)*, que es un gen que no había sido descrito en vides, que también está involucrado en la señalización de GA y que se ha descrito activaría al gen *GAI* en *Arabidopsis* (Blazquez, 2000; Blazquez y cols., 2002). Encontramos una expresión de *GAI* y *SPY* muy coordinada durante el desarrollo de la inflorescencia, especialmente, cuando ambos se activan desde la semana 8 de desarrollo. Ambos genes se expresan en todos los órganos de la flor y además se expresan durante el desarrollo del fruto. Boss y Thomas no habían encontrado expresión de VvGAI en fruto en sus estudios en Pinot Meunier el año 2002, es posible que la diferencia en los resultados sea por la diferencia en el cultivar o porque ellos utilizan hibridación por Northern, técnica que puede ser menos sensible que el PCR en tiempo real. Es posible que el aumento en la expresión de

ambos genes pueda relacionarse con la disminución de la expresión de *LFY* o bien con la disminución de los genes *PI* y *AP3*.

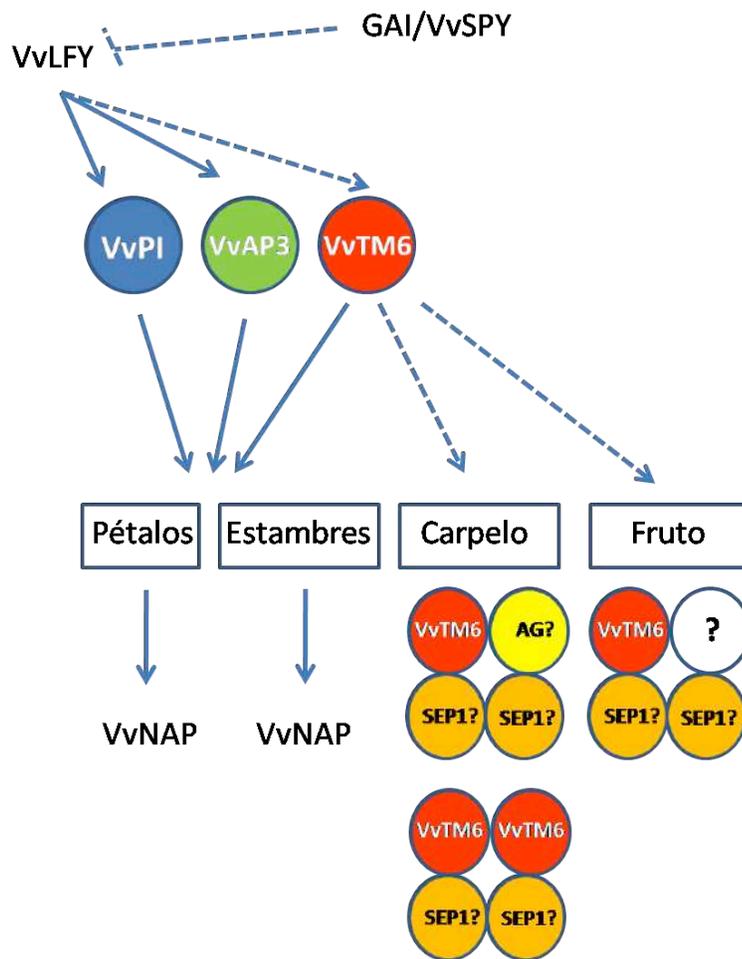
También quisimos evaluar la expresión de un gen de clase E, por lo que estudiamos la expresión del homólogo en vides a *SEPALLATA1* (*SEP1*) en vides, en nuestros tiempos de estudio encontramos expresión hacia los estadios más tardíos del desarrollo floral, en la semana 12, cuando las caliptras aún no se desprendían de la flor y observamos que el gen se expresa en los 3 órganos estudiados, pero se encuentra expresado mayormente en el carpelo, también pudimos detectar expresión en fruto pre-pinta. Ya que el gen se expresa tardíamente en el desarrollo floral y mayormente en carpelo, es posible suponer que su proteína podría estar interactuando con proteínas ABC que también se expresan en estas etapas u órganos, como es el caso de *VvTM6* o *AG* (que debiera tener un patrón de expresión similar). Cabe destacar que también quisimos identificar a *AG* en vides, para contar con la caracterización de un gen clase C. Pero lamentablemente no fue posible identificar en el genoma, un homólogo de alta identidad. Esta dificultad esta dada porque en plantas existen una gran cantidad de proteínas conocidas como “AG-like” con gran similitud a *AG* y resulta muy difícil reconocer a su ortólogo.

Por último quisimos estudiar un gen que en *Arabidopsis* se ha relacionado con el desarrollo de anteras conocido como *AtMYB24* y cuyo homólogo se había sido descrito en vides recientemente por nuestro laboratorio, *VvMYB24*. En plantas los genes *MYB* son factores de transcripción que regulan varios procesos del desarrollo y respuestas de defensa. *AtMYB24*, es un miembro de la familia génica R2R3-MYB de *Arabidopsis*, que se ha descrito se expresa mayoritariamente en las flores y en

micro esporas y su expresión es altamente regulada durante el desarrollo de la antera (Yang y cols., 2007). La sobre-expresión de este gen en plantas transgénicas produce distintos efectos, como plantas enanas, defectos en la flor y anteras no dehiscentes (que no se abren para liberar el polen) (Yang y cols., 2007).

En nuestro laboratorio se había identificado el homólogo de este gen en vides, viéndose una expresión mayoritaria en inflorescencia y en menor cantidad en bayas y semillas (Matus y cols., 2008). Quisimos evaluar su expresión durante el desarrollo de la inflorescencia y en los órganos de la flor. Encontramos que *VvMYB24* comienza a incrementar intensamente su expresión (más de 400 veces) en las etapas más tardías del desarrollo de la flor. En cuanto a los órganos florales, se expresa en gran cantidad en estambres y carpelo. Por lo tanto, en vides este gen también podría ser importante en el desarrollo de la antera, aunque por su alto nivel de expresión en carpelo, es posible que este gen tenga relevancia en el desarrollo de este órgano o mas adelante, cuando éste se diferencia a fruto.

Según los resultados obtenidos, asociando patrones de expresión génica de los genes aislados y estudiados, en conjunto con el uso de datos presentes en la literatura para otras especies, podemos proponer un modelo de red génica que estaría operando en vides para regular la identidad de los órganos florales (Fig. N° 27).



**Figura N° 27: Modelo de interacciones entre proteínas involucradas en la formación de órganos florales, según el análisis de los patrones de expresión de sus transcritos.**

Este modelo se plantea según los datos de expresión génica obtenidos en el presente trabajo y datos obtenidos de la literatura para otras especies, según fue planteado en la discusión. Las líneas punteadas y los signos de interrogación indican posibles funciones o interacciones. Se muestran las 3 proteínas pertenecientes a la clase B de genes MADS-box en *V. vinifera* y cómo estas actuarían en los distintos verticilos florales o sus meristemas. Para el caso de VvTM6 se plantea una posible función en carpelo y fruto y se muestran los posibles tetrámeros proteicos que podría formar en estos órganos, debido a que posee patrones de expresión similar en la flor con *VvSEP1* es posible que esta última proteína participe en el complejo. Se desconoce si en estos órganos VvTM6 podría actuar como homo o heterodímero. VvLFY podría actuar como proteína inductora de la expresión de *VvPI* y *VvAP3*, para el caso de *VvTM6* es más difícil hacer esta asociación, ya que este último gen tiene un pico de expresión más tardío que las dos primeras. Las proteínas GAI y SPY podrían ser las responsables de la disminución en la expresión de *VvLFY* durante el desarrollo tardío de la inflorescencia o bien podrían actuar directamente inhibiendo la expresión de los genes B, como se ha descrito en *A. thaliana*.

#### **5.4 Relación de los genes B y el desarrollo del fruto**

Distintas evidencias nos permitían suponer al principio de esta tesis que los genes B y específicamente *PI*, podrían tener algún efecto en el desarrollo del fruto. Por ejemplo, mutantes en *PI* en manzana, producían frutos en ausencia de polinización (frutos partenocárpicos) (Yao y cols., 2001), es decir, no se necesitaba de la polinización para iniciar y completar el desarrollo del fruto. Además, algunas variedades de tomate que presentaban alteraciones en sus anteras y óvulos, fenotipo que coincide con alteraciones en el gen *PI*, generaban también frutos partenocárpicos (Mazzucato y cols., 1998). Estas evidencias nos hicieron plantear la hipótesis de que *PI* tendría un efecto negativo en el desarrollo del fruto. En este sentido, en la literatura se había propuesto que los estambres cumplían una función inhibitoria en el desarrollo del fruto de *Arabidopsis* (Vivian-Smith y cols., 2001) y nosotros nos planteamos la posibilidad de que los genes que controlan el desarrollo del estambre fueran los responsables de esta inhibición. Desafortunadamente esta hipótesis es difícil de probar en una especie de ciclo de vida largo como la vid, en donde llegar a ver el fruto de una planta transformada podría tardar hasta 5 años. Quisimos evaluar la hipótesis en *Arabidopsis* utilizando plantas de *Arabidopsis* mutantes en el gen *PI* (mutantes *pi-1*), en estas plantas realizamos emasculación y cuantificamos el posible desarrollo del fruto, comparando este con el desarrollo de flores silvestres emasculadas y flores silvestres polinizadas. Según los antecedentes, esperábamos que de ocurrir lo mismo en *Arabidopsis* que en manzana, las flores de plantas mutantes *pi-1* desarrollaran un fruto aunque fuera pequeño, en ausencia de

fertilización, y que en las flores de plantas silvestres no polinizadas no se observara desarrollo de fruto. En esta especie no pudimos detectar un fenómeno de partenocarpia asociado a la mutación del gen *PI*. Esto podría deberse a que en esta especie el control del desarrollo del fruto no se comporta como manzana, su fruto se origina a partir del crecimiento del carpelo y el de manzana lo hace a partir del crecimiento de todos los órganos de la flor, o bien, la mutante utilizada no es adecuada para este experimento (como se menciona en la sección Resultados). Lamentablemente, actualmente no se cuenta con otras mutantes para este gen. También hemos intentado silenciar el gen mediante silenciamiento génico, pero no hemos tenido resultados satisfactorios.

Hasta la fecha nos encontramos evaluando la hipótesis en Tomate (*Solanum lycopersicum*), cuyo fruto al igual que la vid, se origina a partir de un engrosamiento de las paredes del ovario y tiene un ciclo de vida mas corto que la vid. Para esto, hemos realizado transformaciones génicas con vectores para inducir el silenciamiento del gen *PI* de tomate. Hemos obtenido plantas transgénicas y nos encontramos esperamos que estas produzcan flores para evaluar el fenotipo y evaluar si el mecanismo de silenciamiento es eficiente.

Para el caso de la vid, ya hemos realizado construcciones de silenciamiento para *VvPI* y *VvTM6*. Aunque ya contamos con plantas resistentes a antibiótico que presumiblemente son transgénicas, el tiempo de generación de la vid, no nos permitirá evaluar fenotipo hasta algunos años más, cuando aparezcan las flores de estas plantas.

Aunque por razones de tiempo y dificultades experimentales, no hemos podido validar nuestra hipótesis, referente al efecto de los genes B en el desarrollo del fruto, afortunadamente cada día existe más evidencia de que podría ser efectivo de estos tengan alguna función en el desarrollo de este órgano. Por ejemplo, el año 2006, en el trabajo que describe la función de *TM6* en tomate, se menciona que las plantas silenciadas en este gen generan pequeños frutos partenocárpicos cuando no son polinizadas (de Martino y cols., 2006). Recientemente, se propuso que en tomate, el homólogo de *AP3* (*SIDEF*) tendría una función en el control del desarrollo del fruto, ya que se expresa diferencialmente en las mutantes partenocárpicas *pat* y *pat-2*, en donde disminuye su expresión durante el desarrollo de la flor mucho antes de lo que ocurre normalmente en las flores silvestres. Por lo que los autores concluyen que la mutación *pat-2* estaría río arriba de esta cascada (Mazzucato y cols., 2008).

Según los antecedentes, creemos por ejemplo, que *PI* podría ser un regulador positivo del desarrollo de los estambres y a su vez actuar como regulador negativo de la diferenciación de las estructuras asociadas al fruto, nuestros experimentos de polinización y expresión de *PI* nos permiten pensar en que esta regulación negativa del desarrollo del fruto podría liberarse al ocurrir la polinización con la consiguiente disminución de la expresión del gen. De todas maneras, nuevos experimentos tendrán que validar esta hipótesis, estos experimentos no carecerán de dificultad, porque la ausencia de *PI* implica forzosamente la ausencia de estambres, por lo que será extremadamente difícil separar el efecto de los estambres como órgano o tejido y la presencia del gen *PI* en el control del desarrollo del fruto.

## 6. CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis aislamos y caracterizamos la clase B de genes MADS-box de floración en *V. vinifera*, clase génica que no había sido descrita en esta especie. En esta clase identificamos 3 genes pertenecientes a los linajes euAP3, TM6 y PI. Por estudios *in silico* de homología de secuencias, construcción filogenética, presencia de dominios y motivos conservados, estos genes fueron denominados *VvAP3* (*V. vinifera APETALA3*), *VvPI* (*V. vinifera PISTILLATA*) y *VvTM6* (*V. vinifera TM6*). Además, uno de estos genes (*VvPI*) fue caracterizado funcionalmente, mediante expresión heteróloga en mutantes de *A. thaliana*. Según la información presente en las bases de datos de secuencias del genoma de la vid, podemos proponer que estos genes son los únicos miembros de la clase B en el genoma de la especie. Mediante estudios de cuantificación de la expresión por RT-PCR en tiempo real, pudimos determinar que los tres genes poseen patrones de expresión restringidos dentro de la planta, en donde *VvAP3* y *VvPI* se expresan casi exclusivamente en inflorescencia. Por otro lado, *VvTM6* tiene expresión en inflorescencia pero también se detectó una alta expresión durante todo el desarrollo del fruto y en semilla. Este último dato fue bastante sorprendente, ya que no se había descrito en ninguna especie que un gen de clase B continuara expresándose durante el desarrollo del fruto. Dentro de la flor, los genes también tuvieron patrones de expresión restringidos, *VvAP3* y *VvPI* se expresaron exclusivamente en pétalos y estambres, por lo que podemos sugerir su participación en el desarrollo de estos verticilos florales, explicando así la formación de una flor hermafrodita en esta

especie. *VvTM6* también se expresa en pétalos y estambres y además se encuentra en carpelo, por lo que comenzaría expresándose el carpelo y luego continuaría expresándose cuándo este órgano se diferencia a fruto. Los patrones de expresión diferenciales entre *VvAP3* y *VvTM6* nos permiten deducir que a pesar de la cercanía filogenética entre ambos genes, es probable que cumplan distintas funciones en el desarrollo reproductivo de la vid.

Análisis de cortes histológicos de distintos estadios de desarrollo de la inflorescencia nos permitieron correlacionar los patrones de expresión de los 3 genes clase B con distintos eventos de desarrollo y diferenciación dentro de la flor, en este experimento pudimos observar que existía una disminución de la expresión de *VvAP3* y *VvPI* cuando el polen ya se había liberado de las anteras. Con este resultado, nos surgió la interrogante de si la polinización podía ser un mecanismo de inhibición de la expresión de los genes clase B y mediante un experimento de polinización controlada en campo, pudimos comprobar que la polinización disminuye significativamente la expresión de *VvPI* y *VvTM6*.

También estudiamos las dinámicas de expresión de distintos genes que en otras especies se habían descrito como asociados de alguna manera con determinación de órganos florales o relacionados a la clase B. Estos análisis nos permitieron por ejemplo, identificar un probable gen blanco de los productos proteicos de *VvPI* y *VvAP3* y a LFY como posible inductora de la expresión de los genes B. Las interacciones génicas propuestas durante este trabajo, mediante un análisis de los patrones de expresión de distintos genes, podrán ser confirmadas

mas adelante con otro tipo de experimentos que involucren a los respectivos productos proteicos de estos genes.

Por último, quisimos evaluar la hipótesis de que los genes de la clase B podrían estar ejerciendo un efecto inhibitorio en el comienzo del desarrollo del fruto, para esto hemos realizado distintas construcciones de silenciamiento génico, para inducir el silenciamiento de genes B tanto en Tomate (*Solanum lycopersicum*) como modelo de estudio de con ciclo de vida mas corto y en vides. En este momento ya contamos con líneas transgénicas y en un futuro habrá que evaluar primero, cuáles son los efectos del silenciamiento de estos genes en el desarrollo de los órganos florales y luego si es que se produce algún efecto en el desarrollo del fruto.

## 7. REFERENCIAS

- Alvarez-Venegas R, Pien S, Sadler M, Witmer X, Grossniklaus U, Avramova Z** (2003) ATX-1, an Arabidopsis homolog of trithorax, activates flower homeotic genes. *Curr Biol* **13**: 627-637
- APGII** (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* **141**: 399-436
- Berbel A, Navarro C, Ferrandiz C, Canas LA, Beltran JP, Madueno F** (2005) Functional conservation of PISTILLATA activity in a pea homolog lacking the PI motif. *Plant Physiology* **139**: 174-185
- Birnboim HC** (1988) Citation Classic - a Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Current Contents/Life Sciences*: 12-12
- Blazquez M** (2000) Flower development pathways. *J Cell Sci* **113 ( Pt 20)**: 3547-3548
- Blazquez MA, Soowal LN, Lee I, Weigel D** (1997) LEAFY expression and flower initiation in Arabidopsis. *Development* **124**: 3835-3844
- Blazquez MA, Trenor M, Weigel D** (2002) Independent control of gibberellin biosynthesis and flowering time by the circadian clock in Arabidopsis. *Plant Physiol* **130**: 1770-1775
- Blazquez MA, Weigel D** (2000) Integration of floral inductive signals in Arabidopsis. *Nature* **404**: 889-892
- Boss PK, Sensi E, Hua C, Davies C, Thomas MR** (2002) Cloning and characterisation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) MADS-box genes expressed during inflorescence and berry... *Plant Science* **162**: 888-895
- Boss PK, Thomas MR** (2002) Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature* **416**: 847-850
- Boss PK, Vivier M, Matsumoto S, Dry IB, Thomas MR** (2001) A cDNA from grapevine (*Vitis vinifera* L.), which shows homology to AGAMOUS and SHATTERPROOF, is not only expressed in flowers but also throughout berry development. *Plant Mol Biol* **45**: 541-553
- Bowman JL, Smyth DR, Meyerowitz EM** (1989) Genes Directing Flower Development in Arabidopsis. *Plant Cell* **1**: 37-52
- Burgeff C, Liljegren SJ, Tapia-Lopez R, Yanofsky MF, Alvarez-Buylla ER** (2002) MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of Arabidopsis thaliana roots. *Planta* **214**: 365-372

- Calonje M, Cubas P, Martinez-Zapater JM, Carmona MJ** (2004) Floral meristem identity genes are expressed during tendril development in grapevine. *Plant Physiol* **135**: 1491-1501
- Carmona MJ, Chaib J, Martinez-Zapater JM, Thomas MR** (2008) A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. *J Exp Bot* **59**: 2579-2596
- Carmona MJ, Cubas P, Martinez-Zapater JM** (2002) VFL, the grapevine FLORICAULA/LEAFY ortholog, is expressed in meristematic regions independently of their fate. *Plant Physiol* **130**: 68-77
- Causier B, Castillo R, Zhou JL, Ingram R, Xue YB, Schwarz-Sommer Z, Davies B** (2005) Evolution in action: Following function in duplicated floral homeotic genes. *Current Biology* **15**: 1508-1512
- Chen X** (2004) A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science* **303**: 2022-2025
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**: 735-743
- Coen ES, Meyerowitz EM** (1991) The War of the Whorls - Genetic Interactions Controlling Flower Development. *Nature* **353**: 31-37
- Colombo L, Franken J, Koetje E, van Went J, Dons HJ, Angenent GC, van Tunen AJ** (1995) The petunia MADS box gene FBP11 determines ovule identity. *Plant Cell* **7**: 1859-1868
- Corbesier L, Coupland G** (2006) The quest for florigen: a review of recent progress. *J Exp Bot* **57**: 3395-3403
- Davies B, Egea-Cortines M, de Andrade Silva E, Saedler H, Sommer H** (1996) Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins. *Embo J* **15**: 4330-4343
- de Martino G, Pan I, Emmanuel E, Levy A, Irish VF** (2006) Functional analyses of two tomato APETALA3 genes demonstrate diversification in their roles in regulating floral development. *Plant Cell* **18**: 1833-1845
- Ditta G, Pinyopich A, Robles P, Pelaz S, Yanofsky MF** (2004) The SEP4 gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Curr Biol* **14**: 1935-1940
- Downey MO, Harvey JS, Robinson SP** (2003) Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **9**: 15-27
- Dry P aC, B, ed** (2004) Revised version of "Grapevine growth stages-The modified E-L system" *Viticulture* 1, Ed 2
- Egea-Cortines M, Saedler H, Sommer H** (1999) Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is

- involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. *Embo J* **18**: 5370-5379
- Fan HY, Hu Y, Tudor M, Ma H** (1997) Specific interactions between the K domains of AG and AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins. *Plant J* **12**: 999-1010
- Favaro R, Pinyopich A, Battaglia R, Kooiker M, Borghi L, Ditta G, Yanofsky MF, Kater MM, Colombo L** (2003) MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**: 2603-2611
- Felsenstein J** (1992) Estimating Effective Population-Size from Samples of Sequences - a Bootstrap Monte-Carlo Integration Method. *Genetical Research* **60**: 209-220
- Ferrandiz C, Gu Q, Martienssen R, Yanofsky MF** (2000) Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development* **127**: 725-734
- Gillaspy G, Ben-David H, Grissem W** (1993) Fruits: A Developmental Perspective. *The Plant Cell* **5**: 1439-1451
- Goes da Silva F, Iandolino A, Al-Kayal F, Bohlmann MC, Cushman MA, Lim H, Ergul A, Figueroa R, Kabuloglu EK, Osborne C, Rowe J, Tattersall E, Leslie A, Xu J, Baek J, Cramer GR, Cushman JC, Cook DR** (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
- Goto K, Kyojuka J, Bowman JL** (2001) Turning floral organs into leaves, leaves into floral organs. *Current Opinion in Genetics & Development* **11**: 449-456
- Guo Y, Gan S** (2006) AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *Plant J* **46**: 601-612
- Honma T, Goto K** (2000) The Arabidopsis floral homeotic gene PISTILLATA is regulated by discrete cis-elements responsive to induction and maintenance signals. *Development* **127**: 2021-2030
- Honma T, Goto K** (2001) Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* **409**: 525-529
- Irish VF** (2003) The evolution of floral homeotic gene function. *Bioessays* **25**: 637-646
- Irish VF, Litt A** (2005) Flower development and evolution: gene duplication, diversification and redeployment. *Current Opinion in Genetics & Development* **15**: 454-460
- Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A, Legeai F, Huguency P, Dasilva C, Horner D, Mica E, Jublot D, Poulain J, Bruyere C, Billault A, Segurens B, Gouyvenoux M, Ugarte E, Cattonaro F, Anthouard V, Vico V, Del Fabbro**

- C, Alaux M, Di Gaspero G, Dumas V, Felice N, Paillard S, Juman I, Moroldo M, Scalabrin S, Canaguier A, Le Clainche I, Malacrida G, Durand E, Pesole G, Laucou V, Chatelet P, Merdinoglu D, Delledonne M, Pezzotti M, Lecharny A, Scarpelli C, Artiguenave F, Pe ME, Valle G, Morgante M, Caboche M, Adam-Blondon AF, Weissenbach J, Quetier F, Wincker P, Public F-I** (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**: 463-U465
- Jansen RK, Kaittani C, Saski C, Lee SB, Tomkins J, Alverson AJ, Daniell H** (2006) Phylogenetic analyses of *Vitis* (Vitaceae) based on complete chloroplast genome sequences: effects of taxon sampling and phylogenetic methods on resolving relationships among rosids. *BMC Evolutionary Biology* **9**:32
- Johansen DA** (1940) *Plant microtechnique*, New York
- Kim S, Koh J, Yoo MJ, Kong H, Hu Y, Ma H, Soltis PS, Soltis DE** (2005) Expression of floral MADS-box genes in basal angiosperms: implications for the evolution of floral regulators. *Plant J* **43**: 724-744
- Kim ST, Yoo MJ, Albert VA, Farris JS, Soltis PS, Soltis DE** (2004) Phylogeny and diversification of B-function MADS-box genes in angiosperms: Evolutionary and functional implications of a 260-million-year-old duplication. *American Journal of Botany* **91**: 2102-2118
- Kramer EM, Dorit RL, Irish VF** (1998) Molecular evolution of genes controlling petal and stamen development: Duplication and divergence within the APETALA3 and PISTILLATA MADS-box gene lineages. *Genetics* **149**: 765-783
- Kramer EM, Hall JC** (2005) Evolutionary dynamics of genes controlling floral development. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 13-18
- Kramer EM, Irish VF** (1999) Evolution of genetic mechanisms controlling petal development. *Nature* **399**: 144-148
- Kramer EM, Su HJ, Wu CC, Hu JM** (2006) A simplified explanation for the frameshift mutation that created a novel C-terminal motif in the APETALA3 gene lineage. *Bmc Evolutionary Biology* **6**: -
- Krizek BA, Fletcher JC** (2005) Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nat Rev Genet* **6**: 688-698
- Krizek BA, Meyerowitz EM** (1996) The Arabidopsis homeotic genes APETALA3 and PISTILLATA are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development* **122**: 11-22
- Kumar S, Tamura K, Nei M** (2004) MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**: 150-163

- Lalusin AG, Nishita K, Kim SH, Ohta M, Fujimura T** (2006) A new MADS-box gene (IbMADS10) from sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) is involved in the accumulation of anthocyanin. *Mol Genet Genomics* **275**: 44-54
- Lamb RS, Irish VF** (2003) Functional divergence within the APETALA3/PISTILLATA floral homeotic gene lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 6558-6563
- Lartey R, Ghoshroy S, Ho J, Citovsky V** (1997) Movement and subcellular localization of a tobamovirus in Arabidopsis. *Plant Journal* **12**: 537-545
- Lenhard M, Bohnert A, Jurgens G, Laux T** (2001) Termination of stem cell maintenance in Arabidopsis floral meristems by interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. *Cell* **105**: 805-814
- Liljegren SJ, Ditta GS, Eshed HY, Savidge B, Bowman JL, Yanofsky MF** (2000) SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis. *Nature* **404**: 766-770
- Liu YG, Huang N** (1998) Efficient amplification of insert end sequences from bacterial artificial chromosome clones by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant Molecular Biology Reporter* **16**: 175-181
- Matus J, Aquea F, Arce-Johnson P** (2008) Analysis of the grape MYB R2R3 subfamily reveals expanded winequality-related clades and conserved gene structure organization across Vitis and Arabidopsis genomes. *BMC Plant Biology* **8**: 83
- Mazzucato A, Olimpieri I, Siligato F, Picarella ME, Soressi GP** (2008) Characterization of genes controlling stamen identity and development in a parthenocarpic tomato mutant indicates a role for the DEFICIENS ortholog in the control of fruit set. *Physiologia Plantarum* **132**: 526-537
- Mazzucato A, Taddei AR, Soressi GP** (1998) The parthenocarpic fruit (pat) mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. *Development* **125**: 107-114
- McGonigle B, Bouhidel K, Irish VF** (1996) Nuclear localization of the Arabidopsis APETALA3 and PISTILLATA homeotic gene products depends on their simultaneous expression. *Genes & Development* **10**: 1812-1821
- Mullins MG, Bouquet A, Williams LE** (1992) *Biology of the Grapevine*. In. Cambridge University Press, Cambridge
- Munster T, Pahnke J, DiRosa A, Kim JT, Martin W, Saedler H, Theissen G** (1997) Floral homeotic genes were recruited from homologous MADS-box genes preexisting in the common ancestor of ferns and seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 2415-2420
- Munster T, Wingen LU, Faigl W, Werth S, Saedler H, Theissen G** (2001) Characterization of three GLOBOSA-like MADS-box genes from maize:

- evidence for ancient paralogy in one class of floral homeotic B-function genes of grasses. *Gene* **262**: 1-13
- Murashige, Skoog** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**: 473-479
- Nawy T, Lee JY, Colinas J, Wang JY, Thongrod SC, Malamy JE, Birnbaum K, Benfey PN** (2005) Transcriptional profile of the Arabidopsis root quiescent center. *Plant Cell* **17**: 1908-1925
- Nesi N, Debeaujon I, Jond C, Stewart AJ, Jenkins GI, Caboche M, Lepiniec L** (2002) The TRANSPARENT TESTA16 locus encodes the ARABIDOPSIS BSISTER MADS domain protein and is required for proper development and pigmentation of the seed coat. *Plant Cell* **14**: 2463-2479
- Ng M, Yanofsky MF** (2001) Activation of the arabidopsis B class homeotic genes by APETALA1. *Plant Cell* **13**: 739-753
- Ng M, Yanofsky MF** (2001) Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nature Reviews Genetics* **2**: 186-195
- Nitsch JP, Nitsch C** (1969) Haploid Plants from Pollen Grains. *Science* **163**:85-87
- Parcy F, Nilsson O, Busch MA, Lee I, Weigel D** (1998) A genetic framework for floral patterning. *Nature* **395**: 561-566
- Pena L, Martin-Trillo M, Juarez J, Pina JA, Navarro L, Martinez-Zapater JM** (2001) Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. *Nat Biotechnol* **19**: 263-267
- Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP** (1997) The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* **11**: 3194-3205
- Peng J, Richards DE, Hartley NM, Murphy GP, Devos KM, Flintham JE, Beales J, Fish LJ, Worland AJ, Pelica F, Sudhakar D, Christou P, Snape JW, Gale MD, Harberd NP** (1999) 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* **400**: 256-261
- Pnueli L, Abuabeid M, Zamir D, Nacken W, Schwarzsommer Z, Lifschitz E** (1991) The Mads Box Gene Family in Tomato - Temporal Expression During Floral Development, Conserved Secondary Structures and Homology with Homeotic Genes from Antirrhinum and Arabidopsis. *Plant Journal* **1**: 255-266
- Pozueta-Romero J, Houlne G, Canas L, Schantz R, Chamarro J** (2001) Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for Agrobacterium-mediated transformation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **67**: 173-180
- Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F, Lund ST** (2006) An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *Bmc Plant Biology* **6**: -
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ,**

- Ghandehari D, Sherman BK, Yu G** (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**: 2105-2110
- Riechmann JL, Meyerowitz EM** (1997) Determination of floral organ identity by Arabidopsis MADS domain homeotic proteins AP1, AP3, PI, and AG is independent of their DNA-binding specificity. *Molecular Biology of the Cell* **8**: 1243-1259
- Riechmann JL, Wang MQ, Meyerowitz EM** (1996) DNA-binding properties of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS. *Nucleic Acids Research* **24**: 3134-3141
- Rijkema AS, Royaert S, Zethof J, van der Weerden G, Gerats T, Vandebussche M** (2006) Analysis of the Petunia TM6 MADS box gene reveals functional divergence within the DEF/AP3 lineage. *Plant Cell* **18**: 1819-1832
- Sablowski RW, Meyerowitz EM** (1998) A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. *Cell* **92**: 93-103
- Sheppard LA, Brunner AM, Krutovskii KV, Rottmann WH, Skinner JS, Vollmer SS, Strauss SH** (2000) A DEFICIENS homolog from the dioecious tree black cottonwood is expressed in female and male floral meristems of the two-whorled, unisexual flowers. *Plant Physiology* **124**: 627-639
- Shiokawa T, Yamada S, Futamura N, Osanai K, Murasugi D, Shinohara K, Kawai S, Morohoshi N, Katayama Y, Kajita S** (2008) Isolation and functional analysis of the CjNdly gene, a homolog in *Cryptomeria japonica* of FLORICAULA/LEAFY genes. *Tree Physiol* **28**: 21-28
- Shore P, Sharrocks AD** (1995) The MADS-box family of transcription factors. *Eur J Biochem* **229**: 1-13
- Skipper M** (2002) Genes from the APETALA3 and PISTILLATA lineages are expressed in developing vascular bundles of the tuberous rhizome, flowering stem and flower primordia of *Eranthis hyemalis*. *Annals of Botany* **89**: 83-88
- Soltis DE, Ma H, Frohlich MW, Soltis PS, Albert VA, Oppenheimer DG, Altman NS, Depamphilis C, Leebens-Mack J** (2007) The floral genome: an evolutionary history of gene duplication and shifting patterns of gene expression. *Trends in Plant Science* **12**: 358-367
- Southerton SG, Marshall H, Mouradov A, Teasdale RD** (1998) Eucalypt MADS-box genes expressed in developing flowers. *Plant Physiology* **118**: 365-372
- Sparkes I, Runions J, Kearns A, Hawes C** (2006) Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature Protocols* **1**: 2019-2025.

- Sreekantan L, Torregrosa L, Fernandez L, Thomas MR** (2006) VvMADS9, a class B MADS-box gene involved in grapevine flowering, shows different expression patterns in mutants with abnormal petal and stamen structures. *Functional Plant Biology* **33**: 877-886
- Srinivasan C, Mullins MG** (1978) Control of flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.): formation of inflorescences in vitro by isolated tendrils. *Plant Physiology* **61**: 127–130.
- Theissen G, Melzer R** (2007) Molecular mechanisms underlying origin and diversification of the angiosperm flower. *Annals of Botany* **100**: 603-619
- Theissen G, Saedler H** (1999) The golden decade of molecular floral development (1990-1999): A cheerful obituary. *Developmental Genetics* **25**: 181-193
- Tsai WC, Lee PF, Chen HI, Hsiao YY, Wei WJ, Pan ZJ, Chuang MH, Kuoh CS, Chen WH, Chen HH** (2005) PeMADS6, a GLOBOSA/PISTILLATA-like gene in *Phalaenopsis equestris* involved in petaloid formation, and correlated with flower longevity and ovary development. *Plant and Cell Physiology* **46**: 1125-1139
- Vandenbussche M, Theissen G, Van de Peer Y, Gerats T** (2003) Structural diversification and neo-functionalization during floral MADS-box gene evolution by C-terminal frameshift mutations. *Nucleic Acids Research* **31**: 4401-4409
- Vandenbussche M, Zethof J, Royaert S, Weterings K, Gerats T** (2004) The duplicated B-class heterodimer model: Whorl-specific effects and complex genetic interactions in *Petunia hybrida* flower development. *Plant Cell* **16**: 741-754
- Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA CA, Pruss D, Pindo M, Fitzgerald LM VS, Reid J, Malacarne G, Iliev D, Coppola G, Wardell B,, Micheletti D MT, Facci M, Mitchell JT, Perazzolli M, Eldredge G, Gatto P,, Oyzerski R MM, Gutin N, Stefanini M, Chen Y, Segala C, Davenport C,, Demattè L MA, Battilana J, Stormo K, Costa F, Tao Q, Si-Ammour A, Harkins T,, Lackey A PC, Taillon B, Stella A, Solovyev V, Fawcett JA, Sterck L,, Vandepoele K GS, Toppo S, Moser C, Lanchbury J, Bogden R, Skolnick M,, Sgaramella V BS, Fontana P, Gutin A, Van de Peer Y, Salamini F, Viola , R.** (2007) A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE* **2**: e1326.
- Vivian-Smith A, Luo M, Chaudhury A, Koltunow A** (2001) Fruit development is actively restricted in the absence of fertilization in Arabidopsis. *Development* **128**: 2321-2331
- Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W, Giovannoni J** (2002) A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. *Science* **296**: 343-346

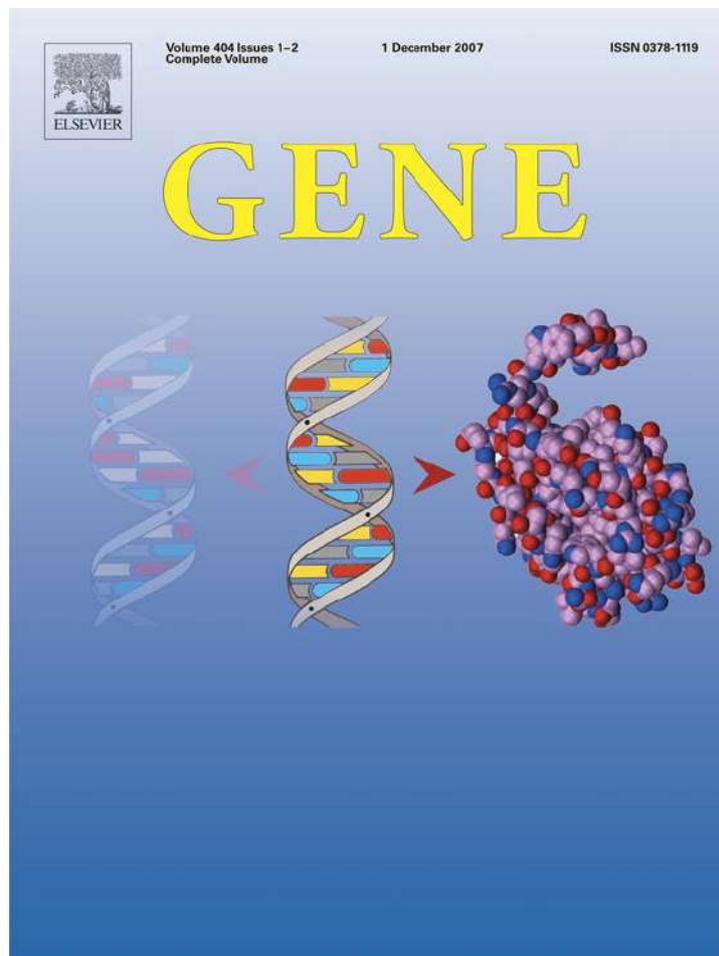
- Winter KU, Saedler H, Theissen G** (2002) On the origin of class B floral homeotic genes: functional substitution and dominant inhibition in Arabidopsis by expression of an orthologue from the gymnosperm Gnetum. *Plant Journal* **31**: 457-475
- Yang XY, Li JG, Pei M, Gu H, Chen ZL, Qu LJ** (2007) Over-expression of a flower-specific transcription factor gene AtMYB24 causes aberrant anther development. *Plant Cell Rep* **26**: 219-228
- Yang Y, Fanning L, Jack T** (2003) The K domain mediates heterodimerization of the Arabidopsis floral organ identity proteins, APETALA3 and PISTILLATA. *Plant J* **33**: 47-59
- Yao JL, Dong YH, Morris BAM** (2001) Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 1306-1311
- Yu DY, Kotilainen M, Pollanen E, Mehto M, Elomaa P, Helariutta Y, Albert VA, Teeri TH** (1999) Organ identity genes and modified patterns of flower development in *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *Plant Journal* **17**: 51-62
- Yu H, Ito T, Zhao YX, Peng JR, Kumar PP, Meyerowitz EM** (2004) Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 7827-7832
- Zhang MZ, Ye D, Wang LL, Pang JL, Zhang YH, Zheng K, Bian HW, Han N, Pan JW, Wang JH, Zhu MY** (2008) Overexpression of the cucumber LEAFY homolog CFL and hormone treatments alter flower development in gloxinia (*Sinningia speciosa*). *Plant Mol Biol* **67**: 419-427
- Zik M, Irish VF** (2003) Global identification of target genes regulated by APETALA3 and PISTILLATA floral homeotic gene action. *Plant Cell* **15**: 207-222

**Anexo N° 1:**

Artículo: "Isolation of the three grape sub-lineages of B-class MADS-box TM6, PISTILLATA and APETALA3 genes which are differentially expressed during flower and fruit development"

**ANEXO 2: Mapas de vectores tipo GATEWAY utilizados**

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article was published in an Elsevier journal. The attached copy is furnished to the author for non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution, sharing with colleagues and providing to institution administration.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



# Isolation of the three grape sub-lineages of B-class MADS-box *TM6*, *PISTILLATA* and *APETALA3* genes which are differentially expressed during flower and fruit development

María Josefina Poupin<sup>a,1</sup>, Fernán Federici<sup>a,1</sup>, Consuelo Medina<sup>a</sup>, José Tomás Matus<sup>b</sup>,  
Tania Timmermann<sup>a</sup>, Patricio Arce-Johnson<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Pontificia Universidad Católica de Chile, PO Box 114-D, Santiago, Chile

<sup>b</sup> Departamento de Fruticultura y Enología, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

Received 28 March 2007; received in revised form 7 August 2007; accepted 9 August 2007

Available online 24 August 2007

Received by G. Theissen

## Abstract

The B class of MADS-box floral homeotic genes specifies petal and stamen identity in angiosperms. While this group is one of the most studied in herbaceous plant species, it has remained largely uncharacterized in woody species such as grapevine. Although the B class *PI/GLO* and *AP3/DEF* clades have been extensively characterized in model species, the role of the *TM6* subgroup within the *AP3* clade is not completely understood, since it is absent in *Arabidopsis thaliana*. In this study, the coding regions of *VvTM6* and *VvAP3* and the genomic sequence of *VvPI*, were cloned. *VvPI* and *AtPI* were confirmed to be functional homologues by means of complementation of the *pi Arabidopsis* mutant. Expression analysis revealed that *VvPI* and *VvAP3* transcripts are restricted almost exclusively to inflorescences, although *VvPI* was detected at low levels in leaves and roots. *VvTM6* expresses throughout the plant, with higher levels in flowers and berries. A detailed chronological study of grape flower progression by light microscopy and temporal expression analysis throughout early and late developmental stages, revealed that *VvPI* expression increases during pollen maturation and decreases between the events of pollination and fertilization, before the cap fall. On the other hand, *VvTM6* is expressed in the last stage of anther development. Specific expression of *VvAP3* and *VvPI* was detected in petals and stamens within the flower, while *VvTM6* was also expressed in carpels. Moreover, this work provides the first evidence for expression of a *TM6*-like gene throughout fruit growth and ripening. Even if these genes belong to the same genetic class they could act in different periods and/or tissues during reproductive organ development.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** ABC model; *Vitis vinifera*; Flowering; Berry; Quantitative RT-PCR; Arabidopsis mutant complementation; AP3; PI; Grape Genome Sequence

## 1. Introduction

In angiosperms, species from different taxa have colonized almost every habitat, resulting in an enormous range of morphological diversity in reproductive organs. Therefore, it is not surprising that genes involved in the control of floral development have become an important focus in the study of plant development and evolution.

One of the most studied group of flowering genes are those belonging to the MADS-box gene family (reviewed by Jack, 2004). MADS-box genes encode transcription factors containing a 58 amino acid DNA binding motif (MADS domain) and

**Abbreviations:** AP3, APETALA 3; AtPI, *Arabidopsis thaliana* PISTILLATA; DEF, DEFICIENS; GLO, GLOBOSA; GOI, gene of interest; I domain, Intervening domain; K domain, Keratin like domain; M domain, MADS domain; PI, PISTILLATA; TM6, Tomato MADS-box gene 6; VvPI, *Vitis vinifera* PISTILLATA; VvAP3, *Vitis vinifera* APETALA 3; VvTM6, *Vitis vinifera* TM6; WPBB, weeks post bud break.

\* Corresponding author. Alameda 340, casilla 114D, Santiago, Chile. Tel.: +56 2 6862897; fax: +56 2 2225515.

E-mail address: [parce@bio.puc.cl](mailto:parce@bio.puc.cl) (P. Arce-Johnson).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

participate in diverse eukaryotic physiological processes. They have been defined on the basis of primary sequence similarity of numerous proteins from different organisms, including yeast, plants, insects, amphibians and mammals (Shore and Sharrocks, 1995). In plants, they regulate a variety of other developmental processes, such as root architecture (Burgeff et al., 2002), dehiscence of dry fruits (Liljegren et al., 2000; Ferrandiz et al., 2000), ripening in fleshy fruits (Vrebalov et al., 2002), anthocyanin production (Lalusin et al., 2006) and seed pigmentation (Nesi et al., 2002), among many other functions. The MADS-box genes correspond to a monophyletic gene superclade. Within this clade the MIKC-type MADS-box genes have a conserved structural organization, including the MADS (M), Intervening (I), Keratin-like (K) and C-terminal (C) domains (Theissen et al., 2000; Becker et al., 2000).

Genetic studies of the MADS-box family in *Arabidopsis thaliana* and *Anthirrinum majus* lead to the proposal of the ABC model, which explains how the development of a specific floral organ takes place within a specific section of the flower (Coen and Meyerowitz, 1991). In this model, floral organ identity genes have been subdivided into five different classes, termed A, B, C, D and E class genes, which act in a combinatorial manner to determine the formation of sepals, petals, stamens, carpels and ovules (Weigel and Meyerowitz, 1994; Theissen et al., 2000; Honma and Goto, 2001). With the exception of *APETALA2* (*AP2*), all genes belonging to these classes are MADS-box genes.

All B-function genes belong to the MADS-box family. They fall into either one of two different lineages, named *APETALA3/DEFICIENS* (*AP3/DEF*) and *PISTILLATA/GLOBOSA* (*PI/GLO*) (Theissen et al., 1996). The *AP3* and *PI* lineage genes are thought to represent paralogous gene lineages that arose from a duplication event before the origin of the angiosperms (Kramer et al., 1998; Theissen et al., 2000). In addition, the *AP3* lineage underwent another major duplication at the base of the core eudicots, giving rise to two *AP3* sub lineages: the *euAP3* and the *Tomato MADS-box gene 6* (*TM6*) (Kramer et al., 1998; Kramer and Irish, 2000).

In *Arabidopsis*, *AP3* and *PI* genes are both required to specify petal and stamen identities and their expression is restricted to these organs. Similar expression patterns have been reported in other core eudicots such as apple (*Malus domestica*, Yao et al., 2001) and petunia (*Petunia hybrida*, Vandebussche et al., 2004). Homeotic changes are produced in *Arabidopsis* when there is a loss of function of either *PI* or *AP3*, producing flowers with two whorls of sepals and double numbers of carpels, without any stamens or petals (Bowman et al., 1989). Among the *AP3* sublineages, *euAP3* proteins have been studied extensively, but little is known about the function of *TM6* in higher eudicots since this gene is absent in *Arabidopsis* (Lamb and Irish, 2003). Recently, the functional characterization of *TM6* was reported in tomato (*Solanum lycopersicum*) and petunia (De Martino et al., 2006; Rijpkema et al., 2006). These studies demonstrated functional diversification between *euAP3* and *TM6*, in which the former plays a role in petal development and the latter appears to play a predominant role in stamen differentiation.

Although the flowering process in herbaceous species has been well characterized, the genetic and environmental factors regulating flowering in woody species are far from being elucidated. In grapevine (*Vitis* species), flower organ formation begins with an uncommitted flower primordium (floral initiation) which takes place within the dormant buds of growing shoots just after bloom of the current season's flower cluster (Mullins et al., 1992). The flower primordium is capable of differentiating into either a flower cluster or a tendril, depending on the environmental conditions which affects gibberellin synthesis (Boss and Thomas, 2002). Within buds, flower clusters continue to develop from this primordium in the spring of the following season during the first stages of shoot growth (Pratt, 1971). Sepal development is minimal and five petals develop over the floral apex. The petals are interlocked at their margins by special cells, forming a protective covering known as the cap, that is also present in some balsaminoid asterids such as *Marcgravia* (Geuten et al., 2006) and which protects the reproductive floral organs (Srinivasan and Mullins, 1978). Upon anthesis, the flower does not open at the tip; instead the cap becomes detached at the base and falls away in a process known as dehiscence or bloom. After pollination and fertilization, each ovary from the inflorescence develops to form a berry.

The latest studies on understanding the molecular basis of flowering in *Vitis* species have described the cloning and characterization of flowering time genes and A, C and E-class genes. The *VFL* gene, an ortholog of the *Arabidopsis* flowering initiation *LFY*, was found to play a role in the development of some vegetative organs, in addition to flowering meristem specification and development (Carmona et al., 2002), and could be related to the maintenance of indeterminacy before the differentiation of apical meristems into flowers, leaves or tendrils. Some grape MADS-box genes have also been cloned. To study the early steps of flower initiation and development in grapevine, Calonje et al. (2004) isolated two grapevine MADS-box orthologs, *VFUL-L* and *VAP1*, which belong to the A-class, and analyzed their expression patterns during vegetative and reproductive development. Related to the C-class genes, *VvMADS11* was identified showing homology to the *Arabidopsis* *AG*, *SHP1* and *SHP2* genes (Boss et al., 2001). This gene was expressed in flowers and throughout most of grape berry development, suggesting a regulatory role in flower and fruit development. Additional C-class genes include *VvMADS3*, related to *AGAMOUS-LIKE6* and *13*, and *VvMADS5*, related to *AGAMOUS-LIKE11* (Boss et al., 2002). Associated to the E-class, *VvMADS2* and *VvMADS4*, related to *SEPALLATA* genes, were also identified (Boss et al., 2002).

With the exception of *VvMADS9*, a *PISTILLATA* homologue sequence recently identified (Sreekantan et al., 2006), all of these grape genes are not members of the B-class. In addition, no grape B-class genes have been functionally characterized. In this study, we report the isolation of three B-class MADS box genes, *VvTM6*, *VvPI* and *VvAP3*. The functional and expression analyses undertaken may contribute to understand their function in flowering and other processes regarding, for instance, fruit development.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant materials and growth conditions

Different vegetative and reproductive tissues were collected from grapevine plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet-Sauvignon) growing in commercial fields in central Chile. Wild-type and mutant *Arabidopsis thaliana* plants were grown in hydroponic media (Gibeaut et al., 1997) in a culture chamber under  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  photosynthetically active radiation and a 16/8 h light/dark photoperiod at  $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 2.2. Tissue and organ sampling, nucleic acid isolation and cDNA synthesis

Genomic DNA was isolated as described by Porebski et al., 1997. cDNA was prepared from young leaves, *in vitro* roots, prebloom-inflorescences, and fruit (complete berries and seeds) at 6 weeks post veraison. RNA from all stages of inflorescence development were included and 10 week post bud break (WPBB) flowers were dissected into carpels, stamens and petals (cap structure) for RNA isolation. In addition, nine grape clusters were sampled from three plants at two week intervals during grape development, beginning four weeks before veraison and ending four weeks post-veraison. Berries from a single plant for each date were grouped and skins were frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  until required for RNA extraction and cDNA synthesis.

Total RNA was isolated from grape tissues according to the procedure of Reid et al. (2006), using a CTAB-Spermidine extraction buffer. For cDNA synthesis,  $1 \mu\text{g}$  of total RNA was reverse transcribed with random hexamer primers in an  $18 \mu\text{l}$  reaction mixture using the StrataScript<sup>®</sup> reverse transcriptase (Statagene) according to the manufacturer's instructions.

### 2.3. Cloning of B-class MADS-box genes

The sequence of *Arabidopsis* PISTILLATA was aligned with orthologous genes from apple and *Antirrhinum majus* using the Clustal W algorithm-based AlignX Module from vector NTI software (Invitrogen, USA). Degenerate primers to amplify coding sequences of putative grapevine MADS-box genes were designed in the two most similar regions. The forward primer (F) MADS1: 5'ATGGGDMGBGGRAARRTHGA, complementary to the 5' MADS-box region, and the reverse primer (R)MADS2: 5'TTBGGCTGMATHGGYTGTVAC, complementary to the 3' region, were used (B=GCT, R=AG, H=ACT, M=AC, V=ACG, D=ATG, Y=CT). PCR amplification of grapevine flower cDNA was carried out as follows: initial denaturation at  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  for 4 min; then 35 cycles of  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  for 1 min,  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  for 1 min, and  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  for 2 min, with a final extension of 5 min at  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ . Bands of expected sizes were cut from agarose gels, cloned in pGEM-T Easy Vector (Promega) and sequenced with universal M13 Forward and Reverse primers. Clones containing *VvPI* and *VvTM6* were obtained. To obtain the 3' terminal region of *VvPI*, 3' RACE was performed, using (F)VvPI3: 5'GCAATGTGAGA-GAGGTGGA. The complete genomic sequence of *VvPI* was obtained with (F)PID3: 5'ATGGGGAGAGG-GAAGATTGAG

and (R)VvPI3UTR: 5'GAGGGTAATGGCTGAAGGAG. In order to obtain the *VvPI* 5'UTR, a TAIL-PCR reaction from genomic DNA was carried out, following the cycling conditions described by Liu and Huang (1998). Six degenerate forward primers; AD1, AD2, AD5, AD6, AD7 and AD10, and the following reverse primers that align within the 5' region were used: Tail0: 5'CCCAGAGCCTCTTCCCAGACTGC, Tail1: 5'GTGCATCTTCCAGAGCTAGC, Tail2: 5'AGAACAGT-GATCTCCTTGCC and Tail3: 5'CTCAATCTTCCCTCTCC-CAT. After three PCR cycles, reactions using AD7-Tail2 and AD7-Tail3 resulted in fragments of 400 and 300 bp respectively. These were cloned in pGEM-T Easy Vector and sequenced. The *VvTM6* sequence obtained was compared with a highly-similar tentative *TM6* consensus in the TIGR grape gene database (TC38893) and specific primers were designed for coding sequence amplification: *VvTM6* (F) 5'ATGGGTCGTGGGAAGATT-GAGA and *VvTM6* (R) 5' GAACCAGACAATAGAGAGC.

*VvAP3* was amplified using primers AP3(F): 5'ATGGCTA-GAGGAAAGATTGAG and AP3(R): 5'ATAATGGTGACGA-AGAGGTAA. Amplicons of the expected size were cloned in the pGEMT-Easy cloning vector (Promega) and six independent clones were sequenced using the universal M13 forward and reverse primers.

### 2.4. Phylogeny reconstruction and alignment

The deduced amino-acid sequences of *VvPI*, *VvTM6* and *VvAP3* were aligned with 31 sequences from other plant species stored in GenBank, using the Clustal W algorithm-based AlignX<sup>®</sup> module, available from Vector NTI Suite 8.0 software (Invitrogen, USA). This alignment was performed keeping only the conserved and phylogenetic informative residues of the sequences (174 residues from the MADS, the I, and the K domains) (Vandenbussche et al., 2003a). Sequences were imported into PAUP 4.0b8 software for phylogenetic analysis and the phylogenetic tree was constructed using Neighbor Joining. Tree nodes were evaluated by bootstrap analysis for 1000 replicates (Felsenstein, 1992).

### 2.5. Microscopic analysis of flower development

Early inflorescence clusters or developed single flowers were sampled every two weeks beginning at 4 WPBB until floral cap structures were detached from each flower, at 14 WPBB. Half the flowers collected were frozen in liquid nitrogen for RNA extraction, while the rest were fixed in 5% glacial acetic acid, 3.7% formaldehyde and 50% ethanol. Samples were vacuum treated and passed through an increasing ethanol series for complete tissue dehydration. These were then paraffin-embedded, cut in 6–8  $\mu\text{m}$  sections and stained with Safranin and Fast Green as described previously (Johansen, 1940).

### 2.6. Quantitative comparison of *VvTM6*, *VvPI* and *VvAP3* gene expression in different grape organs, throughout flower and berry development and organ-specific expression in flowers

Relative transcript quantification of B-class genes was achieved by real time RT-PCR. Real time RT-PCR was

performed using the Brilliant® SYBR® Green QPCR Master Reagent Kit (Stratagene) and the Mx3000P detection system (Stratagene) as described in the manufacturer's manual. Plant tissue sampling, RNA extraction and cDNA synthesis was performed as described above. Primers used included (F) RTTM6: 5'ATTATGAATCAGCGGTGGCATT and (R) RTTM6: 5'TCCCCATCATGGTGAAGA, which amplify a 96 bp fragment in the *VvTM6* 3' region, VvPIRT(F) 5'GAGAGCTGTGAGGGACTACAATCC and VvPIRT(R) 5'GAGTTATATCCTCTCCTGTAAGTTTGG, which amplify 88bp in the *VvPI* 3' region and VvAP3RT(F) 5'CAGCC-TAACCCGCCTAATGA and VvAP3RT(R) 5'GGGAAC-GATGTGTGGATTTCAG, which amplify 93bp in the *VvAP3* 3' region. Amplification of *UBIQUITIN* gene (99 bp) was used for normalization (Downey et al., 2003), as its expression was previously checked as a positive control for grape organ development (Reid et al., 2006). The PCR mixture (25 µl) contained 2.0 µl of cDNA template (diluted 1:10) and 140 nM of each primer, and amplification was performed under the following conditions: 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 94 °C, 30 s; 55 °C, 40 s; and 72 °C, 40 s, followed by a melt cycle from 55 °C to 95 °C. Gene expression levels were calibrated to the average value of all tissues or all ripening stages to obtain a calibrated  $\Delta C_t$  for each gene. A previous standard quantification curve with serial dilutions of PCR products was constructed for each gene to calculate amplification efficiency according to the Eq. (1):

$$\left(E = \left[10^{(-1/\text{slope})} - 1\right]\right). \quad (1)$$

This value was then used to obtain an accurate ratio between the gene of interest (*GOI*) and the housekeeping gene expression, using the Eq. (2):

$$\frac{(1 + E_{GOI})^{-\Delta C_t}}{(1 + E_{Ubiquitin})^{\Delta C_t}} = \frac{(1 + E_{GOI})^{-(C_t GOI - C_t GOI \text{ calibrated})}}{(1 + 1 + E_{Ubiquitin})^{-(C_t Ubi - C_t Ubi \text{ calibrated})}} \quad (2)$$

Efficiency values for *PI*, *TM6*, *AP3* and *UBIQUITIN* amplification during the standard curve calibration were 0.94, 0.926, 0.89 and 0.996, respectively, and in all cases,  $r^2$  values for these curves were over 90%.  $C_t$  values for *UBIQUITIN* varied no more than 1 unit between all samples analyzed for each real time experiment. All experiments were performed with three biological replicates and two technical replicates. In all cases the reaction specificities were tested with melt gradient dissociation curves, electrophoresis gels and cloning and sequencing of each PCR product. To test for significant differences in gene expression, one-way ANOVA was performed, using Kolmogorov–Smirnov and Cochran tests for normality, and Hartley and Bartlett tests for homogeneity of variances. Statistical analyses were carried out using the General Linear Models option in the statistical software package STATISTICA (version 6.0; StatSoft Inc., Tulsa, OK). When differences in the means were significant, a Tukey (HSD)

test was performed (Sokal and Rohlf, 1997). A Bonferroni correction was applied to adjust significance levels for multiple comparisons.

## 2.7. *Arabidopsis pi* mutant complementation

The complete *VvPI* coding sequence was amplified from flower cDNA using primers (F)PIIn: 5'AAGCTTAGATC-TATGGGGAGAGGGGAAGA and (R)PIfin2: 5'CACGTGTTA-TATCCTCTCCTGTAAGTT, which introduce *BglIII* and *PmlI* restriction sites (underlined) at the 5' and 3' terminal regions of the *VvPI* gene, respectively. The coding sequence was introduced in pCAMBIA1302 vector, pre-treated with *BglIII* and *PmlI*, replacing the *GFP* gene, placing *VvPI* under the control of the 35S promoter from Cauliflower Mosaic Virus. Wild type *Arabidopsis* plants were transformed using the floral dip method, described by Clough and Bent (1998). Transgenic lines were verified by amplification and sequencing of the transgene and the 35 S promoter using (F)35Sin 5'ATGGTGGAGCACGACTCTC and (R)PID4. Transgene expression was checked by RT-PCR (data not shown). Transgenic plants were used as pollen donors to pollinate homozygous mutant [*pi-1*] plants. F2 plants were genotyped by PCR amplification using (F)GPI-1 5'TACCA-GAAGTTATCTGGCAAGAAATCATG and, (R)Pintron-11 5'CCAATTTTCATGATATCTAGCTCAG and cutting with *BspHI* and *EcoRV* restriction enzymes, as described by Riechmann and Meyerowitz (1997).

Complemented transgenic plants were analyzed under a Nikon SMZ800 binary scope, and prepared for scanning electronic microscopy (SEM). For electronic microscopy analysis, samples were fixed in cacodylate-buffer 1% (pH 7.2) and 3% glutaraldehyde for 24 h at room temperature according to Lartey et al. (1997). Subsequently, samples were dehydrated in a series of ethanol and then 100% acetone. Samples were critical-point dried, sputter-coated with gold and observed under a Jeol JSM-25-SII SEM.

### 2.7.1. Accession numbers in alphabetical order

AmAG (*A. majus*, CAB42988), AmAPI (*A. majus*, CAA45228), AmAP3 (*Antirrhinum majus*, X52023), AmPI (*A. majus*, CAA48725), AtAPI (*A. thaliana*, AAM28457), AtAP3 (*Arabidopsis thaliana*, AF115814), AtPI (*A. thaliana*, AAF15284), CmAP3 (*Chrysanthemum x morifolium*, AAO22985), GhTM6 (*Gerbera hybrid*, CAA08803), HmAP3 (*Hieracium piloselloides*, AAD53326), HmTM6 (*Hydrangea macrophylla*, AF230703), LeAG (*S. lycopersicum*, AAM33099), LeTM6 or SITM6 (*Solanum lycopersicum*, X60759), LjAP3 (*Lotus japonicus*, AAX13301), LrAP3 (*Lilium regale*, BAB91550), LrPI (*L. regale*, BAB91551), MdPI (*M. domestica*, BAC11906), MdTM6 (*Malus domestica*, AB081093), MfAP3, *Michelia figo*, AF052877), NbTM6 (*Nicotiana benthamiana*, AY577817), NtPI (*Nicotiana tabacum*, CAA48142), OsPI (*O. sativa*, AAC05723), PbTM6 or PTD (*Populus balsamifera*, AF057708), PhAG (*Petunia x hybrida*, BAB79434), PhAP3 (*Petunia x hybrida*, X69946), PhPI (*Petunia x hybrida*, AAS46018), PhPI (*Petunia x hybrida*, CAA49568), PhTM6 (*Petunia x hybrida*, AF230704), RrPI (*Rosa rugosa*,

BAB11939), StAP3 (*Solanum tuberosum*, CAA47846), VvAPI (*V. vinifera*, AAT07447), VvMADS1 (*V. vinifera*, AF265562) and ZmPI (*Z. mays*, CAC33848).

From this study: VvPI (DQ988043), VvTM6 (DQ979341) and VvAP3 (EF418603).

### 3. Results

#### 3.1. Cloning of grape B-class MADS genes

With the aim of obtaining B-class MADS-box genes involved in flower development of *V. vinifera*, degenerate primers were designed using conserved regions of MADS-box gene sequences from Arabidopsis, apple and Antirrhinum. These primers were used in PCR reactions with cDNA and genomic DNA of *V. vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon isolated from pre-bloom inflorescences. Four of the isolated cDNA clones had significant similarity with the *PISTILLATA* gene from Arabidopsis and 3 clones with *TM6* from tomato. Sequences obtained were named *V. vinifera PISTILLATA* (*VvPI*) (GenBank accession no. DQ988043) and *V. vinifera TM6* (*VvTM6*) (GenBank accession no. DQ979341). *VvPI* was 639 bp in length with an open reading frame corresponding to 212 deduced amino acid residues, while *VvTM6* was 678 bp in length, encoding a deduced protein of 225 amino acid residues. In addition, a Tentative Consensus sequence similar to *APETALA3* (TC54810) was found in the TIGR grape gene index. The 681 bp open reading frame (ORF) of TC54810 was amplified by PCR from the same inflorescence cDNA samples. The isolated ORF was named *VvAP3* (GenBank accession no. EF418603). Deduced AP3 protein sequence resulted in 226 amino acid residues. The deduced protein sequences of *VvPI*, *VvTM6* and *VvAP3* presented 63%, 70% and 69% identity with *A. thaliana* PI, *Solanum lycopersicon* TM6 and *Lotus japonicus* AP3, respectively.

On the basis of the *VvPI* sequence obtained, primers were designed to amplify the PI genomic and the 5'UTR sequences by means of PCR and TAIL PCR, respectively. Using TAIL PCR and genomic DNA, a 237 bp fragment upstream of the start ATG codon was obtained. 109 bp from the 3'UTR region were obtained by 3'RACE (Fig. 1A). The complete genomic sequence (2283 bp) was used to determine the exon-intron structure (Fig. 1A). *VvPI* has seven exons and six introns, coincident, for example, with the apple *PISTILLATA* gene structure (Yao et al., 2001).

Sequence analyses of these grape B-class genes revealed that all possess the characteristic domains of PI, TM6 and AP3 lineages. Full-length multiple sequence alignments confirmed that there is an extensive sequence similarity between *VvPI* and other PI-related proteins (Fig. 1B). All the common domains of a MADS-box MIKC type protein were present in *VvPI* (Kramer et al., 1998; Lamb and Irish, 2003) (Fig. 1B). The most similar

regions corresponded to MADS, Intervening and Keratin-like domains, but this similarity decreases in the C-terminal zone. *VvPI* possessed the PI motif (MPF<sub>x</sub>FRVQP<sub>x</sub>QPNLQE, x indicating a variable site) in the C-terminal region between amino acid residues 195 and 210, which is present in almost all described PI type proteins (Kramer et al., 1998).

*VvTM6* showed high similarity to three TM6 type deduced proteins from other angiosperms. *VvTM6* has the classical TM6 motif: the paleoAP3 in the C-terminal region. The paleoAP3 motif (YGxHDLRLA) was located between amino acids 217 and 225 (Sheppard et al., 2000). Furthermore, *VvTM6* presented the conserved and synapomorphic 15 amino acids E8, K9, I28, L45, K66, K100, H141, K144, L157, G162, V190, A191, N198, L199, F 202, from the TM6 clade (Fig. 1C).

Additionally, there was an extensive sequence similarity between *VvAP3* and other AP3-related proteins (Fig. 1D). The MADS, keratin like and intervening domains were distinguishable. Moreover, the typical motif of AP3 proteins, the euAP3 motif (Kramer et al., 1998) was located in the C-terminal region of the protein between amino acids 218 and 226 (Fig. 1D).

To place the obtained sequences in phylogenetic context, a phylogeny reconstruction was performed with the predicted amino acid sequences of *VvPI*, *VvAP3* and *VvTM6* and 31 MADS-box sequences belonging to different lineages. These results confirm the placement of *VvPI*, *VvTM6* and *VvAP3* in their corresponding subfamilies (Fig. 2).

In order to find possible homologues of B-class genes in grape, we performed a BLAST search using the isolated B-class gene sequences against the Whole Genome Shotgun draft sequence of *V. vinifera* cv. Pinot noir available at NCBI (Velasco et al., unpublished data). Using both the whole nucleotide sequences and the regions corresponding to the MADS-box domains from *VvPI*, *VvAP3* and *VvTM6*, we found one shotgun contig with a high quality match for each of these genes (accession numbers AM435405, AM469149 and AM476720, respectively). Contig AM435405 allowed us to confirm the seven exon structure that we obtained for *VvPI*. A seven exon structure was also observed for *VvAP3* and *VvTM6* when aligned to each corresponding contig (data not shown). TM6 and AP3-containing contigs were also present as weaker matches, in the *VvAP3* and *VvTM6* BLAST results, respectively, reflecting the close relationship of these genes. No other contigs corresponding to other B-class MADS box genes were obtained in the BLAST results for any of the three genes (out of 400 hits).

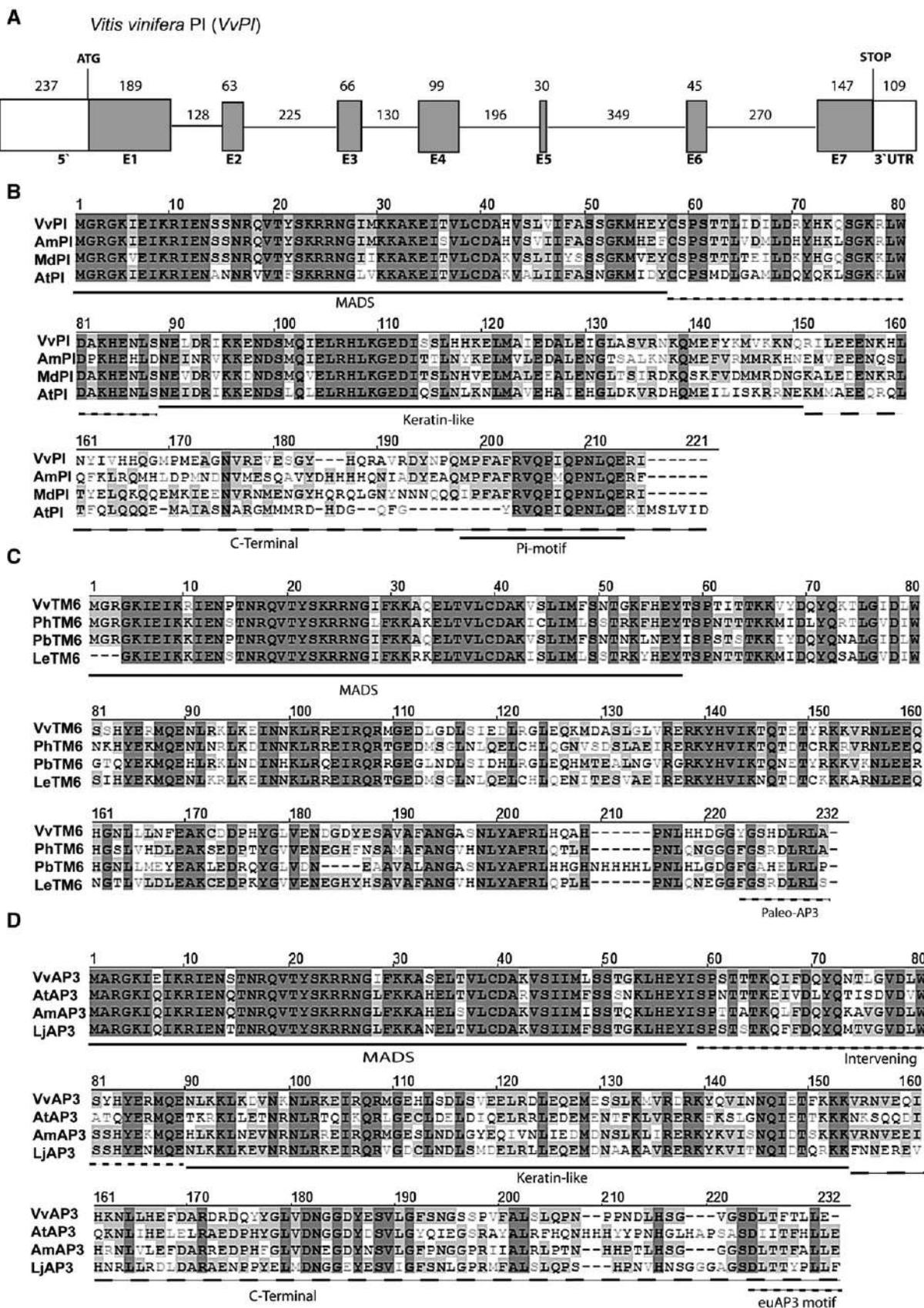
#### 3.2. Expression of B-class genes in grape organs

Different vegetative and reproductive grape tissues were used to evaluate *VvPI*, *VvTM6* and *VvAP3* gene expression profiles.

Fig. 1. *PISTILLATA*, *TM6* and *AP3* genes identified in *Vitis vinifera*. A) Genomic structure of *VvPI*. Gray boxes show exons, open boxes correspond to the 5' and 3' untranslated regions (UTR). The total length of the coding region is 2283 bp (including 3'UTR), and the lengths of each exon, intron and 5'-3' regions are shown above B) Best-fit alignment of the deduced amino acid sequence of *VvPI* and three *PISTILLATA* homologues: AtPI, *Arabidopsis thaliana*; MdPI, *Malus domestica* and AmPI, *Anthirrhinum majus* (also *GLOBOSA*). Conserved domains of MADS-box and PI proteins are underlined. C) Alignment of the deduced amino acid sequence of *Vitis vinifera* TM6 and three TM6 related proteins: SITM6, *Solanum lycopersicum*; PhTM6, *Petunia hybrida* and PbTM6 (PTD), *Populus balsamifera*. D) Alignment of the deduced amino acid sequence of *Vitis vinifera* AP3 and three euAP3 proteins: AtAP3, *A. thaliana*; AmAP3, *Antirrhinum majus* and LjAP3, *Lotus japonicus*.

Preliminary RT-PCR analysis showed that *VvPI* expression was associated with inflorescences at different developmental stages, whereas no expression was detected in fruits and a much less

intense amplification product was obtained in roots and leaves (data not shown). These results were partially confirmed by northern blot analysis (data not shown), where it was only



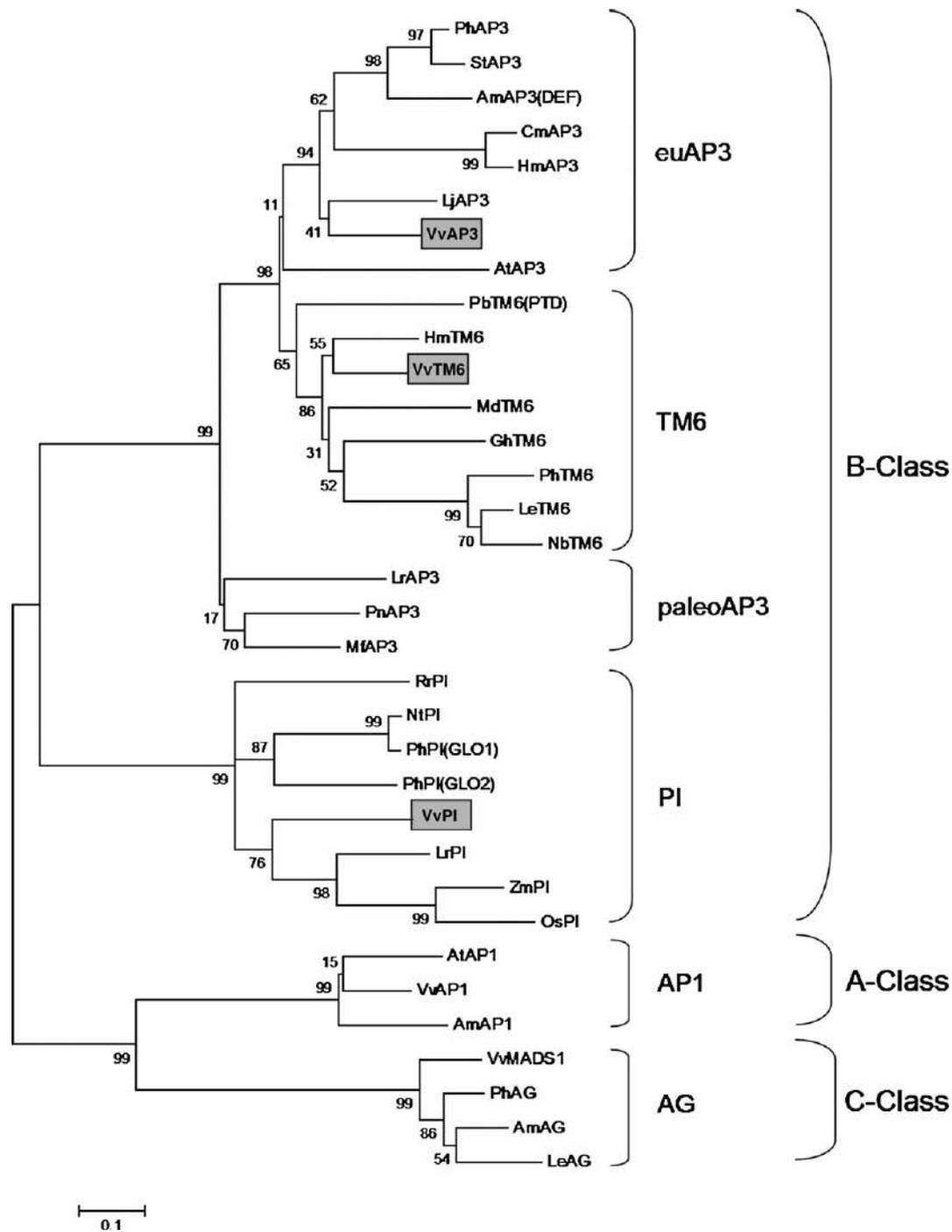


Fig. 2. Phylogeny reconstruction. Neighbor Joining tree derived from sequences of plant MADS-box proteins (MADS, I and K domains). Numbers above nodes represent bootstrap values for 1000 replicates. VvPI, VvTM6 and VvAP3 appear inside gray boxes. Published plant MADS-box protein sequences were retrieved from the GenBank database (see species names and accession numbers in Materials and methods section).

possible to detect a 0.8 kb *VvPI* transcript in inflorescences. Using real time RT-PCR, *VvPI* expression was over 400 times higher in inflorescences than leaves and roots (Fig. 3A) and no expression was detected in fruits or seeds. Average *VvPI* expression in grape tissues show significant differences among all the studied organs ( $p=0.0084$ ). *A posteriori* analysis revealed that differences were significant when inflorescences were compared with leaves and roots ( $p=0.0112$  and  $p=0.01129$ , respectively).

Quantitative RT-PCR analysis revealed that *VvAP3* was expressed in inflorescences but was not detected in any other organ (not shown). For *VvTM6*, it was possible to detect significant expression differences between all grape organs studied (Fig. 3B). Although *VvTM6* is expressed in all organs, its expression relative to *UBIQUITIN* was much higher in fruits, inflorescences, and seeds, than in leaves and roots. When average *VvTM6* expression was analyzed, significant differences were found when compared between organ ( $p=0.0004$ ),

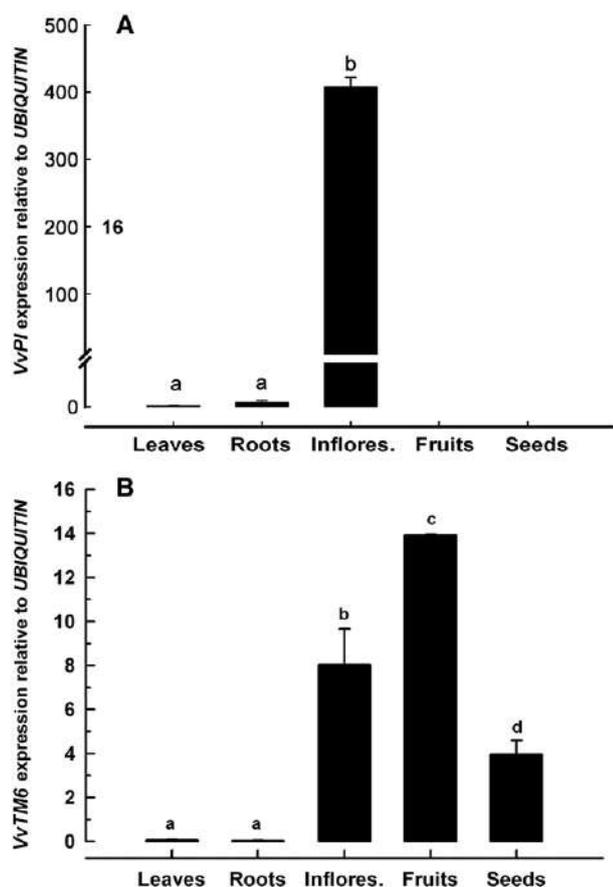


Fig. 3. Quantitative gene expression of *VvPI* (A) and *VvTM6* (B) in young leaves, *in vitro* roots, pre-bloom inflorescences, and 6 weeks post-veraison whole berries and seeds. The calibrated expression ratios relative to *UBIQUITIN* of *VvPI* were 0.03, 0.1 and 408.21 in leaves, roots and inflorescences, respectively. For *VvTM6* these values were 0.06, 0.04, 8.04, 13.92 and 3.94 in leaves, roots, inflorescences, fruits and seeds, respectively. Standard deviations (SD) are the result of three independent replicates. Similar letters indicate non significant differences among tissues or stages. *VvAP3* transcripts were only detected in inflorescences (not shown).

with the exception of leaves and roots, where the expression is similar and much less intense ( $p=0.999$ ).

### 3.3. Microscopic characterization of inflorescence development, temporal expression of B-class genes throughout flower and berry growth and organ-specific expression in flowers

Flower development was characterized at different growth stages beginning at 4 WPBB, when inflorescences were visually detected and separated from shoot apical meristems. Flowers at all stages were photographed and collected for light microscope observation. Safranin and Fast Green staining was performed in all slides for identifying nuclei, nucleoli and lignin accumulation in red, and cellulose walls and cytoplasm in green (Johansen, 1940). At 4 and 6 WPBB a highly compacted flower cluster is observed, where modified leaves (bracts) protect each flower (Fig. 4A, E). At 4 WPBB, small sepals are developed and petals have already formed the cap structure. Stamen primordia have also developed (Fig. 4B–D). At 6 WPBB stamens are

distinguishable and the carpel primordium is observed. At this stage, the cap structure invaginates further, apparently by basal cell division and elongation of the upper region (Fig. 4F–H). During 8WPBB flowers are beginning to separate from each other as the inflorescence raquis has elongated (Fig. 4I). In addition, stamen filaments begin to elongate, anthers present their characteristic four pollen sacs (Fig. 4K) and developed carpels are observed, in which ovules are formed (Fig. 4L). At 10 WPBB anthers are more defined (Fig. 4N–P). At 12 WPBB anther membranes are degraded and mature pollen grains are released, while the cap is still attached to the flower (Fig. 4Q–S). At this stage an early seed structure has begun to develop. Changes in red staining are observed in the outer layers of this structure (Fig. 4T). The development of the seed is observed in Fig. 4V–X, in which the cap has detached from the flower and fallen away (Fig. 4U, V). Anthers in this stage are beginning to dry and fall, although in the microscopic sections these are not observed as they were removed during the fixation procedure.

*VvPI*, *VvTM6* and *VvAP3* gene expression was analyzed throughout flower development by means of quantitative real time PCR (Fig. 5). *VvAP3* expression was significantly higher during weeks 8 and 10 post bud break, and then decreased ( $p=0.0001$ ). *VvPI* transcripts increased from 6WPBB and highest expression levels were achieved at 10WPBB ( $p=0.00021$ ). *VvTM6* was expressed at significant levels at 12WPBB ( $p=0.000139$ ).

The expression of the three genes was analyzed in dissected floral organs: petals, stamens and carpels (Fig. 6). Sepals are almost absent in the grape flower structure, and therefore were not included in this analysis. *VvPI* and *VvAP3* were expressed just in the second and third whorls (Fig. 6A and B) and *VvTM6* was expressed in these organs but also in the carpel (Fig. 6 C).

Finally, when the expression of *VvTM6* was analyzed during berry skin ripening, it was possible to detect expression during all studied stages (Fig. 7). Differences were considered as significant using one-way ANOVA ( $p=0.00724$ ). A *posteriori* analysis revealed that differences were significant when the following growth stages were compared: 2 weeks before veraison (–2) with 2 and 4 weeks post veraison ( $p=0.0127$  and  $p=0.0074$ , respectively).

### 3.4. Constitutive expression of *VvPI* in *Arabidopsis pi-1* mutant

To ascertain a putative function for *VvPI* in flower development, transgenic lines of *Arabidopsis* were used as a model system for heterologous expression. Homozygous *pi-1* mutants of *Arabidopsis* can not be transformed by means of floral dip since their flowers do not have stamens (Fig. 8B). To achieve a successful transformation, wild type plants were transformed with a construct in which the *VvPI* cDNA was fused to the 35 S promoter of Cauliflower Mosaic Virus. Pollen from three independent lines of 35 S::*VvPI* was used to fertilize *pi-1* mutants, and F2 lines were further analyzed. The genotype of 121 plants was analyzed by PCR and enzyme restriction (See materials and methods section). The relation among WT, heterozygous and homozygous *pi-1* mutants was statistically similar to the expected (1:2:1) ( $\chi^2 > 0.05$ ). The presence of the

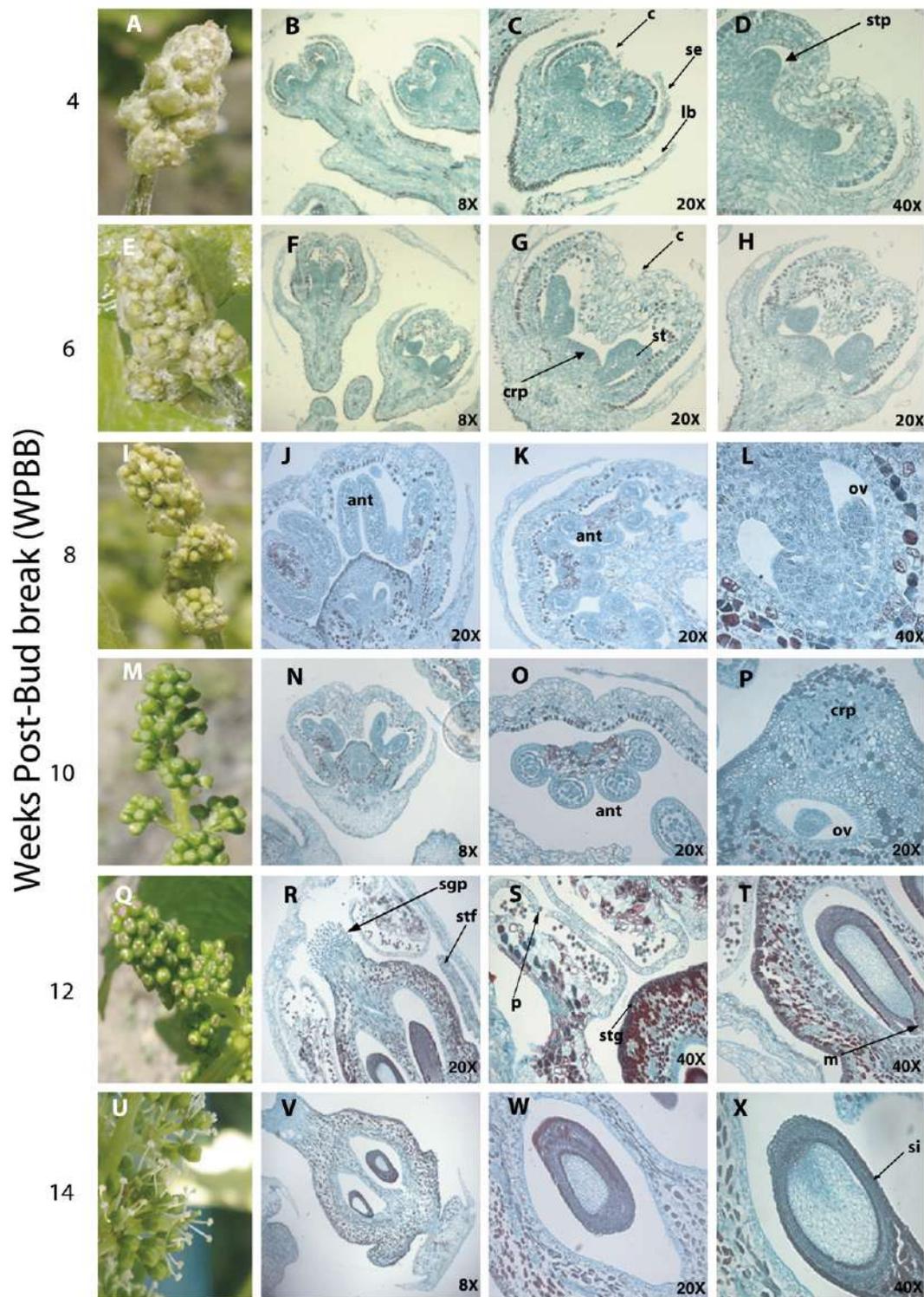


Fig. 4. Macroscopic and microscopic analysis of early and late inflorescence development. Inflorescences at different growth stages were sampled and photographed every two weeks beginning at 4 WPBB until the floral cap structure was detached from each flower, at 14 WPBB (A, E, I, M, Q, U). Floral tissues were examined for organ development at each growth stage (See description in Section 3.3). Microscopy sections were stained with Safranin and Fast Green as described in Materials and methods section. c: cap; se: sepal; stp: stamen primordium; st: stamen; crp: carpel promordium; ant: anthers; ov: ovule; sg: stigma; p: pollen; sgp: stigmatic papillae; lb: leaf bracts; stf: stamen filament; m: micropyle; si: seed integument; stp: stamen primordium.

transgene was corroborated by PCR in 28 mutant plants growing on hygromycin selection media. The expression of *VvPI* in the transgenic mutant plants was confirmed by RT-

PCR (data not shown). In these plants the vegetative organs were normal, and no effect on flowering time was detected. Partial phenotypic reversions occurred in transformant flowers,

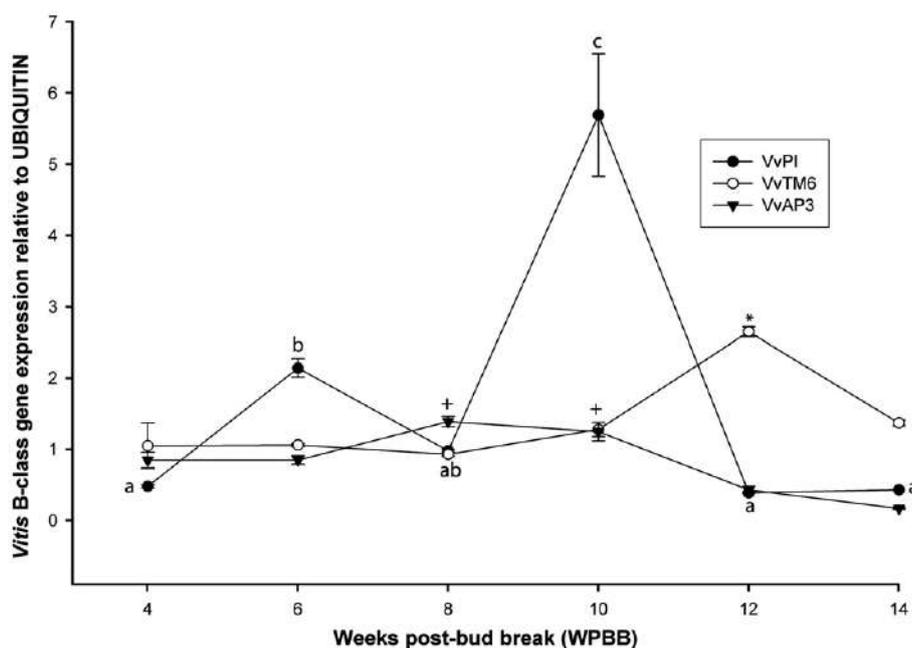


Fig. 5. The temporal expression of *VvPI*, *VvTM6* and *VvAP3* during flower development. Standard deviations (SD) are the result of three independent replicates. Similar letters indicate non significant differences in *VvPI* expression among tissues or stages. Asterisk indicates the only significant stage for *VvTM6* gene expression. (+) Symbol indicates significant differences in *VvAP3* expression compared to the other growth stages.

indicating that the grapevine orthologue of PI is capable of complementing the Arabidopsis defective gene (Fig. 8). As was described previously in heterologous expression experiments of other PI genes in Arabidopsis *pi* mutants (Winter et al., 2002; Berbel et al., 2005), analysis by scanning electron microscopy (SEM) corroborated the presence of mosaic organs in the first whorl of the 35 S:*VvPI pi-1* plants. In these plants petaloid-shaped margins were observed (Fig. 8F, G), compared with the cell structure and organization of wild type sepals (Fig. 8C), *pi-1* mutants sepals (Fig. 8D) and wild type petals (Fig. 8E). Additionally, flowers presented filaments in the third whorl (Fig. 8H), and in flowers with the strongest phenotype, these filaments had an anther-like structure (Fig. 8I, J), although these filaments did not attain the same stamen structures as wild type plants (Fig. 8A).

## 4. Discussion

### 4.1. A scenario for the evolution of B-class MADS-box genes in Grapes

While the B class of MADS-box genes is the most studied group in other plant species, it has remained largely uncharacterized in grapes. B-class genes comprise the *PI/GLO* and *AP3/DEF* lineages, whose members have been associated with petal and stamen organ fate determination. In addition to this important homeotic function, B class genes have been used as a model to study how sequence changes (i.e. gene duplication and frameshift mutations) have allowed sub and neofunctionalization of these genes throughout evolution (Kramer et al., 2006). Here we identified three sequences in grape, *VvPI* belonging to the *PI/GLO* lineage, and *VvAP3* and *VvTM6*

belonging to the *AP3/DEF* lineage. In addition to possessing high identity to *AtPI*, *LjAP3* and *SITM6* (63, 69 and 70%, respectively), these sequences are grouped in monophyletic clades with the other *PI*, *AP3* and *TM6* members, respectively. In agreement with findings for B-class genes in other plant species, all these genes were expressed in grape flower tissues.

It is widely thought that both *PI* and *AP3* clades emerged from an ancestral B-class gene, after duplication events that took place during the separation of gymnosperms and angiosperms. While the *PI* lineage appears to be highly conserved, the *AP3* lineage (paleo*AP3* at that stage) has experienced significant diversification (Kramer et al., 1998). It is thought that a new duplication of paleo*AP3* then gave origin to the two paralogous lineages, *euAP3* and *TM6* before the diversification of the major higher eudicot subclasses (Kramer et al., 1998; Kramer and Irish, 1999). Thus, while *TM6* seems to have preserved, from its ancestor, the paleo*AP3* motif at the C-terminal, the *euAP3* lineage has diverged to obtain a new motif (SDLTTFALLE), called *euAP3* (reviewed by Kramer et al., 2006). A frameshift mutation in the coding sequence of the paleo*AP3* motif created by the addition of an eight-aminoacid novel sequence (Vandenbussche et al., 2003b) or a single nucleotide deletion (Kramer et al., 2006) has been suggested to be the origin of this *euAP3* motif. In our study, *VvTM6* showed more synapomorphic features of *TM6* lineage members, such as paleo*AP3* motifs, and lacked those characteristics of *euAP3*. *VvTM6* presented a motif in the C-terminal that matched perfectly with the consensus YGxHDLRLA, typical of *TM6* and ancestral paleo*AP3* lineages. On the other hand, *VvAP3* presented the *euAP3* motif in its C-terminal region (Kramer et al., 2006).

Most of the *AP3*-type genes functionally described within core eudicots, such as *AP3* and *DEF*, belong to the *euAP3*

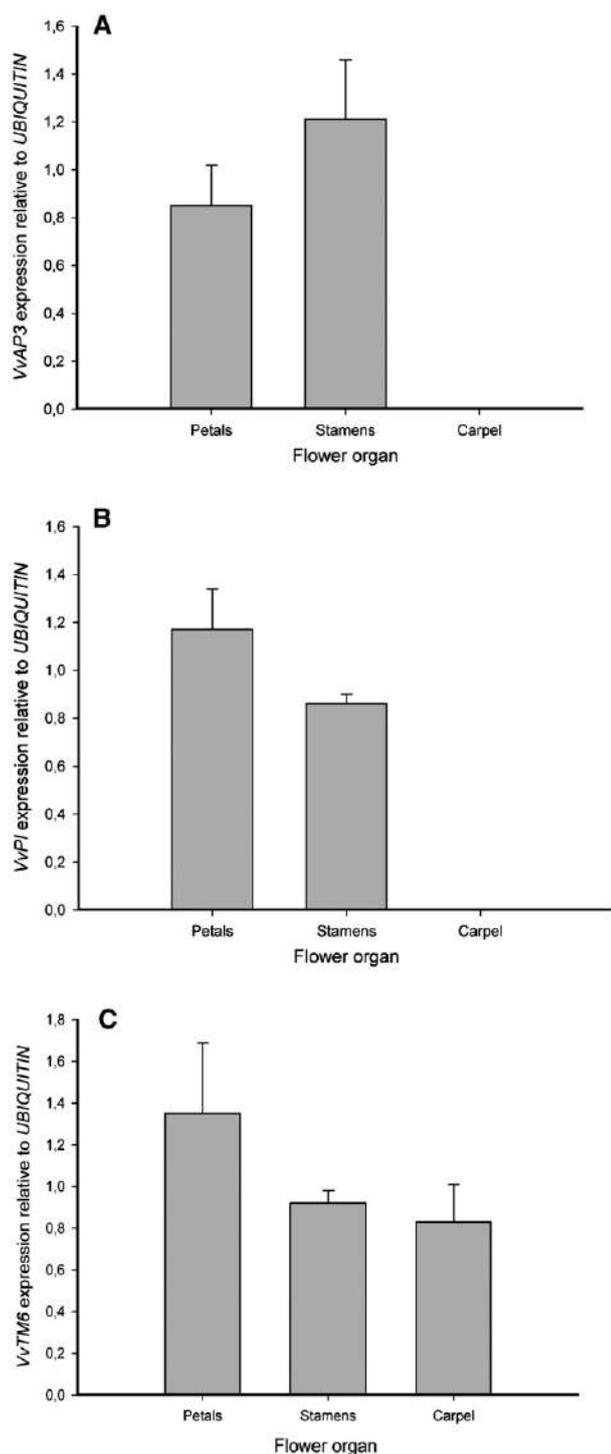


Fig. 6. Real time RT-PCR analyses to determine the organ-specific expression of *VvAP3* (A), *VvPI* (B) and *VvTM6* (C). Floral organs were dissected from 10 WPBB flowers and pooled. Expression data were normalized with *UBIQUITIN* and calibrated against the average of each gene's expression for all tissues.

lineage, whereas only a few members of the *TM6* lineage have been found and studied, perhaps due to the fact that *Arabidopsis* lacks this gene. The first *TM6* member to be discovered was *TM6* (*Tomato MADS box gene 6*) in tomato (Pnueli et al., 1991). However, it is highly likely that more members of this

family will be identified and studied in the near future because of the increasing interest in understanding how changes in some homeotic genes can explain morphological evolution. Hence, two *TM6* members have been functionally characterized recently in petunia and tomato (Rijkema et al., 2006; De Martino et al., 2006). From these studies, it has been suggested that possibly after eu*AP3/TM6* duplication, eu*AP3* genes acquired a role in petal development whilst *TM6* began to control stamen development (Lamb and Irish, 2003; Kramer et al., 2006; De Martino et al., 2006; Rijkema et al., 2006). Thus, the *AP3* lineage would be another case in MADS where gene duplication resulted in subfunctionalization (the duplicated gene performs different aspects of the original gene's function), a process which occurred for *SHATTERPROOF* and *AGAMOUS* in *Arabidopsis* or their orthologs in *Antirrhinum*, *PLENA* and *FARINELLI* (Causier et al., 2005). This subfunctionalization has been attributed to a differential expression pattern of *TM6* and eu*AP3* rather than to substantial changes in their structural features and thus in their functions (Kramer et al., 2006; De Martino et al., 2006, and references therein). In this work we reported the presence of both *VvTM6* and *VvAP3* in grape and that both are expressed during inflorescence development, but in different tissues and periods. These results could suggest that subfunctionalization of these genes also occurs in grapes.

It seems that the three genes found in this work could be the only B-class MADS box genes found in grape. A search throughout the draft genome sequence of *V. vinifera* cv. Pinot Noir showed that no other contigs corresponding to other B-class MADS-box genes were present. This *in silico* analysis allows us to suggest that these genes are present in a single copy in the genome and that there are no other B-class homologue genes in grape. Since in some other species several B-class genes can be found, (e.g. at least five B-class homologues in *Marcgravia*; Geuten et al., 2006), it would be necessary to conduct future Southern blot experiments to confirm this hypothesis.

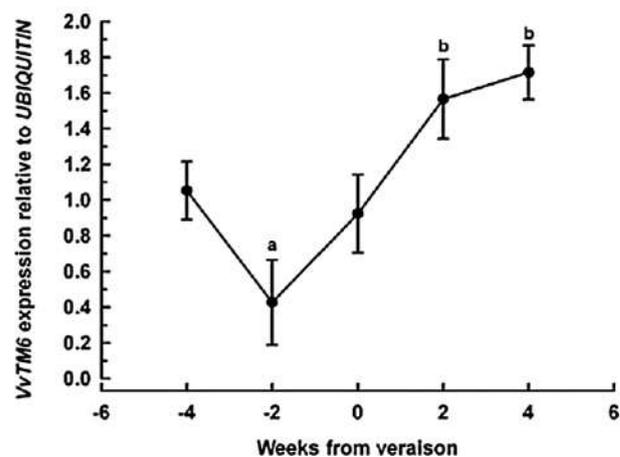


Fig. 7. *VvTM6* expression pattern during berry skin growth and ripening. Veraison was set when clusters were 50% coloured and sugar concentration reached near 5°brix. Standard deviations (SD) are the result of three independent replicates. Similar letters indicate non significant differences among tissues or stages.

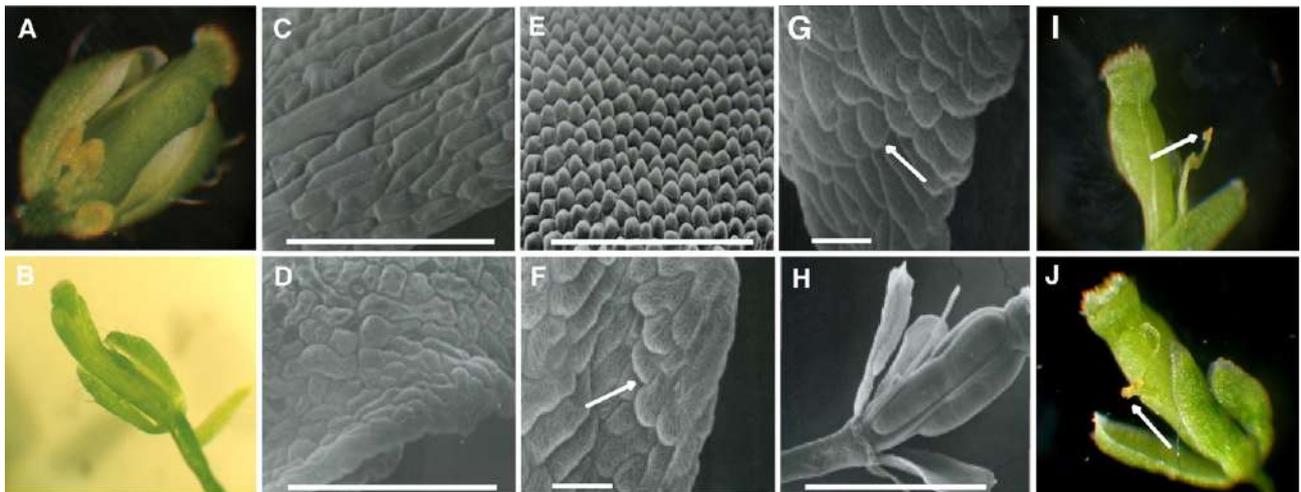


Fig. 8. Transgenic *A.thaliana pi-1* mutants expressing *VvPI*. Phenotypic analysis of wild-type Arabidopsis (A, C and E), mutant *pi-1* plants (B and D) and transgenic *pi-1* mutant plants (F–J). Scanning electron micrographs (C–H) and light microscopy images (A, B, I and J) are shown. A) Wild-type flower (an external sepal was removed); B) *pi-1* mutant flower; C) wild type sepal cells; D) *pi-1* sepals cells; E) wild-type petal cells; F and G) transgenic sepals (arrows indicate petaloid cells in the margin); H) filament structures of transgenic *pi-1* flower expressing *VvPI*; I and J) transgenic *pi-1* flower showing a stamen-like structure (the external whorl was removed). Bars indicate: C, D and E: 100  $\mu$ m; H: 1000  $\mu$ m; F and G: 10  $\mu$ m.

#### 4.2. Putative roles for B-class genes in grapevine

When expression of B-class genes was compared in all tissues, *VvAP3* expression was entirely restricted to inflorescences. *VvPI* transcripts were restricted almost exclusively to this organ, but a very small amount of expression was detected in roots and leaves. Southerton et al. (1998), Yu et al. (1999), and Munster et al. (2001) reported *PI* gene expression in leaves from *Eucalyptus grandis* Maiden, *Gerbera hybrida* and *Zea mays* respectively, and we observed expression of *VvPI*, albeit at a very low level, in this organ, and in roots. In addition, it has been postulated that *PISTILLATA* participates in the development of vascular tissue in tuberous rhizomes of *Eranthis hyemalis* (Skipper, 2002). In contrast, the expression of this gene could be inhibited in leaves by other regulatory genes in Arabidopsis (Serrano-Cartagena et al., 2000), highlighting the necessity to survey other plant systems in order to improve our understanding of all the possible functions of MADS-box genes.

Genetic and molecular characterization of the flowering process in different species reveals a conservation of the basic genetic mechanisms controlling the early stages of flower formation (Theissen and Saedler, 1999; Ng and Yanofsky, 2001). However, some plasticity in the types of MADS-box protein complexes formed and their function in plant species is assumed (Vandenbussche et al., 2004). Although similar genes may be involved at various stages of the flowering process in different species, it is highly probably that they are differentially regulated.

When the expression of *VvTM6*, *VvPI* and *VvAP3* was analyzed during inflorescence development, different expression peaks were observed. *VvPI* expression increased from 6 WPBB with a significantly higher expression at 10 WPBB. As seen by the microscopy analysis, stamen development is

strongly promoted at 6 WPBB, after stamen primordia have begun to differentiate (Fig. 4F–H). The highest expression of *VvPI* was achieved just before mature pollen could reach the stigmatic papillae (Fig. 4R, S). After pollination and fertilization, the embryo has begun to develop, as indicated by cell differentiation and by the accumulation of lignin in the outer integuments (red staining). After this point, *PI* expression decreased drastically. The same expression pattern is observed in Orchid, where the expression of *PI* ortholog *PeMADS6* is strongly repressed after the pollination/fertilization event occurs (Tsai et al., 2005). In the case of *VvAP3* and compared to *VvPI*, previous transcript accumulation was observed at 8 WPBB and maintained until 10 WPBB. This could be related to the recently reported sub-function of this gene in petal development (De Martino et al., 2006; Rijpkema et al., 2006), which is formed before the stamen structures. *VvTM6* is expressed constantly throughout flower development, except for 12 WPBB, where an expression peak was observed. At this moment, pollen grains have already been released from the anthers, before the cap has fallen. This could be related for instance with some function of *VvTM6* in the final stages of anther development. A role for *TM6* in stamen development was proposed recently in tomato and petunia (De Martino et al., 2006; Rijpkema et al., 2006). In tomato, RNA interference-induced reduction of tomato *TM6* expression resulted in flowers with homeotic defects, primarily in stamen development. For all genes identified, their levels decreased after 12 WPBB, coinciding with cap fall and stamen senescence. These findings give some insights into the molecular mechanisms of control in grape flower development. For instance, *PI* could act as a positive and a negative regulator in stamen differentiation and embryo-associated structures development, respectively. On the other hand, *TM6* could be involved in regulating the final stages of anther development. Even if these genes belong to the same genetic class they could

act in different periods and/or tissues during a specific floral organ development. Expression studies of even earlier stages of flower development would require the analysis of latent buds that were formed during the last growth season, in which the establishment of sepal and petal primordia are achieved. Quantitative RT-PCR experiments were also conducted for analyzing specific floral organ gene expression of B class genes. *VvPI* and *VvAP3* expression was restricted to petals and stamens, while *VvTM6* was also expressed in the carpels. These results could be complemented in a future *in situ* hybridization analysis to elucidate the expression of these genes in specific cell layers. In addition, our results are in agreement with those obtained by De Martino et al. (2006) for tomato *TM6*, expression of which was also detected in the carpels. Additionally, we found that *VvTM6* is also expressed during fruit ripening. We found expression of *VvTM6* in whole berries, seed and in berry skins at different stages of ripening during fruit development. Comparing the different tissues, the maximal accumulation of transcripts was in whole berries (including fruit, flesh and seeds) at 6 weeks post veraison, but a significant proportion of these transcripts are probably due to seed-specific expression. For this reason, a possible functional role in fruit development could be suggested. In fact, this is the first study which detects expression of a flowering related B-class gene during fruit development and ripening. *PTD*, the *Populus trichocarpa* *TM6* ortholog, has been postulated to play a role in regulating cell proliferation (Sheppard et al., 2000), and *VvTM6* could perform a similar role during both exponential growth phases of grape berry development, before and after veraison. Vandebussche et al. (2004) reported the expression of *PhTM6* of petunia in developing placenta and ovules and our results indicate that in grape, the expression continues throughout berry development. Interesting questions arise from these findings; does *VvTM6* play a role in carpels and fruits, could *VvTM6* act as a homodimer or as heterodimer with other proteins and with which other proteins is it interacting in these organs?

Sreekantan et al. (2006) recently described flowering mutants in the Mourvèdre and Bouchalès cultivars of *V. vinifera*. While the former presented normal sepals and petals, carpelloid structures fused to pseudo-ovules were present instead of stamens. In the latter mutant, some flowers showed double petals and shorter or absent stamens. The authors relate these phenotypes with *VvMADS9* (a *PI* homologue), as its temporal expression during flower development is diminished or delayed in these mutants. Although this assertion could be correct, the observation that its expression is delayed in Bouchalès could be explained if changes are present in the regulatory region or that upstream regulators are altered in these mutants.

Here, partial phenotypic complementation was obtained in the functional analysis using the Arabidopsis *pi* mutant as a heterologous model, because there were homeotic changes in the first, second and third whorls of transgenic *pi* mutants overexpressing *VvPI*. Given the ability of the grape gene to partially reverse an Arabidopsis mutant phenotype, it is possible to argue that these genes could be functional homologues, and that the role of *VvPI* in grape cells is the same as it was in the complemented specie. However, it should be noted that a

heterologous system may not always reveal gene function. In this way, *VvPI* could have distinct, additional or interchangeable roles when compared to *AtPI*. Phenotype recovery was partial, possibly because *pi-1* could be acting in a dominant negative manner, as was described by Krizek and Meyerowitz (1996). The *pi-1* mutation results in a stop codon 22 amino acids after the MADS domain, so perhaps *VvPI* is not efficient enough to restore the phenotype, as observed when *PI* from Arabidopsis is over-expressed in the mutant (Krizek and Meyerowitz, 1996). It is also possible that tissue-specific expression could be necessary for correct gene function. Most of the functional analyses of *PI* orthologs have reported partial complementations (Winter et al., 2002; Tsai et al., 2005), but efficient complementation was obtained when *Pisum sativum* *PISTILLATA* gene was used, even though this gene lacks the *PI* motif (Berbel et al., 2005). Some plasticity in the multimeric complexes of MADS-box genes involved in floral identity could be occurring between both species (*Vitis* and Arabidopsis), so the necessary interactions between other MADS-box with *VvPI* in Arabidopsis could be weak. Additionally, the presence of both *TM6* and *AP3* in grapes helps to confirm that there are some differences in the control of flower development between this species and Arabidopsis.

*Vitis* (*Vitaceae*) species belong to the eudicots, but their position within a specific monophyletic group has not been resolved unequivocally. These species are generally considered to be an early branching core eudicot, most likely of Rosid affinities (Jansen et al., 2006). Thus detailed sequence, expression and functional analysis of ABC MADS-box genes could help in elucidating their position among eudicots.

### Acknowledgments

We gratefully acknowledge Dr. Beth Krizek for providing Arabidopsis *pi-1* mutant seeds. Thanks to Vicente Castro for their advice in phylogenetic analysis and to Dr. Marco Lardies for his statistical analysis assistance. This work was supported by Chilean Wine Consortium 05CTE01-03, Fruit Consortium and by Fellowships awarded to MJ Poupin (CONICYT) and JT Matus (MECESUP and CONICYT AT24060171).

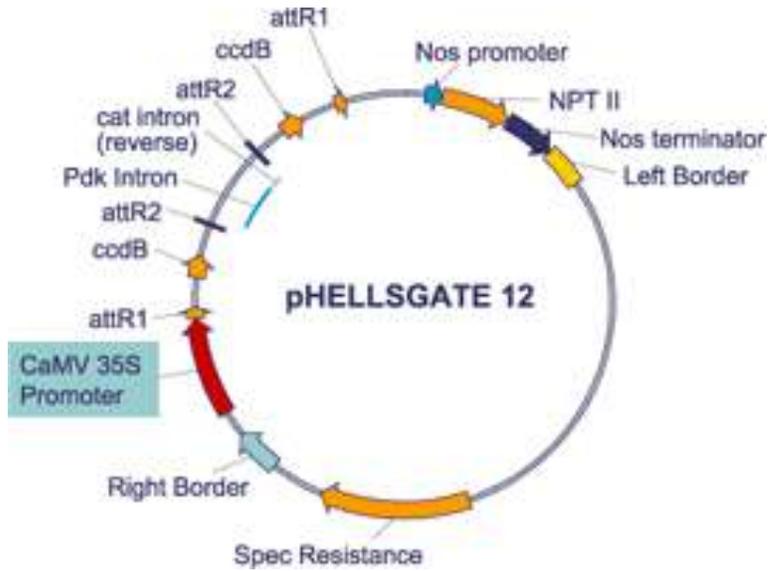
### References

- Becker, A., Winter, K.U., Meyer, B., Saedler, H., Theissen, G., 2000. MADS-box gene diversity in seed plants 300 million years ago. *Mol. Biol. Evol.* 17, 1425–1434.
- Berbel, A., Navarro, C., Ferrandiz, C., Canas, L.A., Beltran, J.P., Madueno, F., 2005. Functional conservation of *PISTILLATA* activity in a pea homolog lacking the *PI* motif. *Plant Physiol.* 139, 174–185.
- Boss, P.K., Thomas, M.R., 2002. Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature* 416, 847–850.
- Boss, P.K., Vivier, M., Matsumoto, S., Dry, I.B., Thomas, M.R., 2001. A cDNA from grapevine (*Vitis vinifera* L.), which shows homology to *AGAMOUS* and *SHATTERPROOF*, is not only expressed in flowers but also throughout berry development. *Plant Mol. Biol.* 45, 541–553.
- Boss, P.K., Sensi, E., Hua, C., Davies, C., Thomas, M.R., 2002. Cloning and characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) MADS-box genes expressed during inflorescence and berry development. *Plant Sci.* 162, 887–895.
- Bowman, J.L., Smyth, D.R., Meyerowitz, E.M., 1989. Genes directing flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* 1, 37–52.

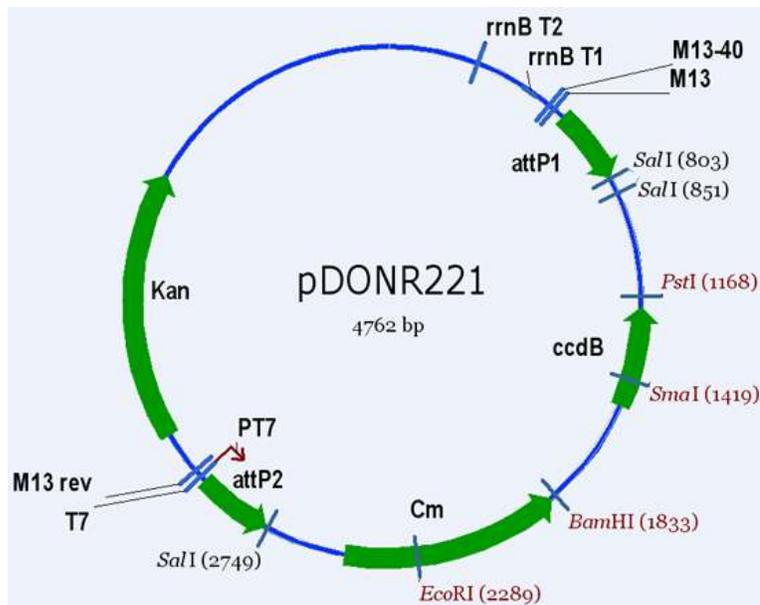
- Burgeff, C., Liljegren, S.J., Tapia-Lopez, R., Yanofsky, M.F., Alvarez-Buylla, E.R., 2002. MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* 214, 365–372.
- Calonje, M., Cubas, P., Martinez-Zapater, J.M., Carmona, M.J., 2004. Floral meristem identity genes are expressed during tendril development in grapevine. *Plant Physiol.* 135 (3), 1491–1501.
- Carmona, M.J., Cubas, P., Martinez-Zapater, J.M., 2002. VFL, the grapevine FLORICAULA/LEAFY ortholog, is expressed in meristematic regions independently of their fate. *Plant Physiol.* 130 (1), 68–77.
- Causier, B., et al., 2005. Evolution in action: following function in duplicated floral homeotic genes. *Curr. Biol.* 15 (16), 1508–1512.
- Clough, S.J., Bent, A.F., 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16 (6), 735–743.
- Coen, E.S., Meyerowitz, E.M., 1991. The war of the whorls — genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353, 31–37.
- De Martino, G., Pan, I., Emmanuel, E., Levy, A., Irish, V.F., 2006. Functional analyses of two tomato APETALA3 genes demonstrate diversification in their roles in regulating floral development. *Plant Cell* 18 (8), 1833–1845.
- Downey, M., Harvey, J., Robinson, S., 2003. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Aust. J. Grape Wine R.* 9, 15–27.
- Felsenstein, J., 1992. Estimating effective population size from samples of sequences: a bootstrap Monte Carlo integration method. *Genet. Res.* 60 (3), 209–220.
- Ferrandiz, C., Liljegren, S.J., Yanofsky, M.F., 2000. Negative regulation of the SHATTERPROOF genes by FRUITFULL during *Arabidopsis* fruit development. *Science* 289, 436–438.
- Geuten, K., et al., 2006. Petaloidy and petal identity MADS-box genes in the balsaminoid genera *Impatiens* and *Marcgravia*. *Plant J.* 47, 501–518.
- Gibeaut, D.M., Hulett, J., Cramer, G.R., Seemann, J.R., 1997. Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions. *Plant Physiol.* 115, 317–319.
- Honma, T., Goto, K., 2001. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* 409, 525–529.
- Jack, T., 2004. Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell* 16, S1–S17.
- Jansen, R.K., et al., 2006. Phylogenetic analyses of *Vitis* (Vitaceae) based on complete chloroplast genome sequences: effects of taxon sampling and phylogenetic methods on resolving relationships among rosids. *BMC Evol. Biol.* 9 (6), 32.
- Johansen, D.A., 1940. *Plant microtechnique*. MacGraw-Hill Book Company, New York.
- Kramer, E.M., Irish, V.F., 1999. Evolution of genetic mechanisms controlling petal development. *Nature* 399 (6732), 144–148.
- Kramer, E.M., Irish, V.F., 2000. Evolution of the petal and stamen developmental programs: Evidence from comparative studies of the lower eudicots and basal angiosperms. *Int. J. Plant Sci.* 161, S29–S40.
- Kramer, E.M., Dorit, R.L., Irish, V.F., 1998. Molecular evolution of genes controlling petal and stamen development: duplication and divergence within the APETALA3 and PISTILLATA MADS-box gene lineages. *Genetics* 149, 765–783.
- Kramer, E.M., Su, H.J., Wu, C.C., Hu, J.M., 2006. A simplified explanation for the frameshift mutation that created a novel C-terminal motif in the APETALA3 gene lineage. *BMC Evol. Biol.* 6, 30.
- Krizek, B.A., Meyerowitz, E.M., 1996. The *Arabidopsis* homeotic genes APETALA3 and PISTILLATA are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development* 122, 11–22.
- Lalusin, A.G., Ohta, M., Fujimura, T., 2006. Temporal and spatial expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis during sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.) root development. *Int. J. Plant Sci.* 167, 249–256.
- Lamb, R.S., Irish, V.F., 2003. Functional divergence within the APETALA3/PISTILLATA floral homeotic gene lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 6558–6563.
- Lartey, R., Ghoshroy, S., Ho, J., Citovsky, V., 1997. Movement and subcellular localization of a tobamovirus in *Arabidopsis*. *Plant J.* 12 (3), 537–545.
- Liljegren, S.J., Ditta, G.S., Eshed, H.Y., Savidge, B., Bowman, J.L., Yanofsky, M.F., 2000. SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* 404, 766–770.
- Liu, Y.-G., Huang, N., 1998. Efficient amplification of insert end sequences from bacterial artificial chromosome clones by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant Mol. Biol. Rep.* 16, 175–181.
- Mullins, M.G., Bouquet, A., Williams, L.E., 1992. *Biology of the Grapevine*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Munster, T., Ursula, W.L., Fagil, W., Werth, S., Saedler, H., Theissen, G., 2001. Characterization of three GLOBOSA-like MADS-box genes from maize: evidence for ancient paralogy in one class of floral homeotic B-function genes of grasses. *Gene* 262, 1–13.
- Nesi, N., et al., 2002. The transparent Testa16 locus encodes the *Arabidopsis* bSister mads domain protein and is required for proper development and pigmentation of the seed coat. *Plant Cell* 14, 2463–2479.
- Ng, M., Yanofsky, M.F., 2001. Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nat. Rev., Genet.* 2 (3), 186–195.
- Pnueli, L., Abu-Abaid, M., Zamir, D., Nacken, W., Schwarz-Sommer, Z., 1991. The MADS box gene family in tomato: temporal expression during floral development, conserved secondary structures and homology with homeotic genes from *Antirrhinum* and *Arabidopsis*. *Plant J.* 1, 255–266.
- Porebski, S., Bailey, L.G., Baum, B.R., 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15 (1), 8–15.
- Pratt, C., 1971. Reproductive anatomy in cultivated grape. A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 22, 92–109.
- Reid, K., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., Lund, S., 2006. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol.* 6, 27.
- Riechmann, J.L., Meyerowitz, E.M., 1997. Determination of floral organ identity by *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins AP1, AP3, PI, and AG is independent of their DNA-binding specificity. *Mol. Biol. Cell.* 8 (7), 1243–1259.
- Rijpkema, A.S., Royaert, S., Zethof, J., van der Weerden, G., Gerats, T., Vandenbussche, M., 2006. Analysis of the petunia TM6 MADS box gene reveals functional divergence within the DEF/AP3 lineage. *Plant Cell* 18 (8), 1819–1832.
- Serrano-Cartagena, J., et al., 2000. Genetic analysis of incurvata mutants reveals three independent genetic operations at work in *Arabidopsis* leaf morphogenesis. *Genetics* 156 (3), 1363–1377.
- Sheppard, L.A., et al., 2000. A DEFICIENS homolog from the dioecious tree black cottonwood is expressed in female and male floral meristems of the two-whorled, unisexual flowers. *Plant Physiol.* 124 (2), 627–640.
- Shore, P., Sharrocks, A.D., 1995. The mads-box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 229, 1–13.
- Skipper, M., 2002. Genes from the APETALA3 and PISTILLATA lineages are expressed in developing vascular bundles of the tuberous rhizome, flowering stem and flower Primordia of *Eranthis hyemalis*. *Ann. Bot.* 89 (1), 83–88.
- Sokal, R., Rohlf, F., 1997. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, 3rd edition. WH Freeman and Co., New York.
- Southerton, S.G., Marshall, H., Mouradov, A., Teasdale, R.D., 1998. Eucalypt MADS-box genes expressed in developing flowers. *Plant Physiol.* 118 (2), 365–372.
- Sreekantan, L., Torregrosa, L., Fernandez, L., Thomas, M.R., 2006. VvMADS9, a class B MADS-box gene involved in grapevine flowering, shows different expression patterns in mutants with abnormal petal and stamen structures. *Funct. Plant Biol.* 33, 877–886.
- Srinivasan, C., Mullins, M.G., 1978. Control of flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.): formation of inflorescences in vitro by isolated tendrils. *Plant Physiol.* 61 (1), 127–130.
- Theissen, G., Saedler, H., 1999. The golden decade of molecular floral development (1990–1999): a cheerful obituary. *Dev. Genet.* 25 (3), 181–193.
- Theissen, G., Kim, J.T., Saedler, H., 1996. Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 43, 484–516.
- Theissen, G., et al., 2000. A short history of MADS box genes in plants. *Plant Mol. Biol.* 42, 115–149.

- Tsai, W.C., et al., 2005. Pemads6, a Globosa/Pistillata-like gene in *Phalaenopsis equestris* involved in petaloid formation, and correlated with flower longevity and ovary development. *Plant Cell Physiol.* 46, 1125–1139.
- Vandenbussche, M., et al., 2003a. Toward the analysis of the petunia MADS box gene family by reverse and forward transposon insertion mutagenesis approaches: B, C, and D floral organ identity functions require SEPALLATA-like MADS box genes in petunia. *Plant Cell* 15, 2680–2693.
- Vandenbussche, M., Theissen, G., Van de Peer, Y., Gerats, T., 2003b. Structural diversification and neo-functionalization during floral MADS-box gene evolution by C-terminal frameshift mutations. *Nucleic Acids Res.* 31, 4401–4409.
- Vandenbussche, M., Zethof, J., Royaert, S., Weterings, K., Gerats, T., 2004. The duplicated B-class heterodimer model: whorl-specific effects and complex genetic interactions in *Petunia hybrida* flower development. *Plant Cell* 16 (3), 741–754.
- Velasco R., et al. unpublished data. The first genome sequence of an elite grapevine cultivar (Pinot noir *Vitis vinifera* L.): coping with a highly heterozygous genome. Available at NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>.
- Vrebalov, J., et al., 2002. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (Rin) locus. *Science* 296, 343–346.
- Weigel, D., Meyerowitz, E.M., 1994. The Abcs of floral homeotic genes. *Cell* 78, 203–209.
- Winter, K.U., Saedler, H., Theissen, G., 2002. On the origin of class B floral homeotic genes: functional substitution and dominant inhibition in *Arabidopsis* by expression of an orthologue from the gymnosperm *Gnetum*. *Plant J.* 31, 457–475.
- Yao, J., Dong, Y., Morris, B.A., 2001. Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (3), 1306–1311.
- Yu, D., et al., 1999. Organ identity genes and modified patterns of flower development in *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *Plant J.* 17, 51–62.

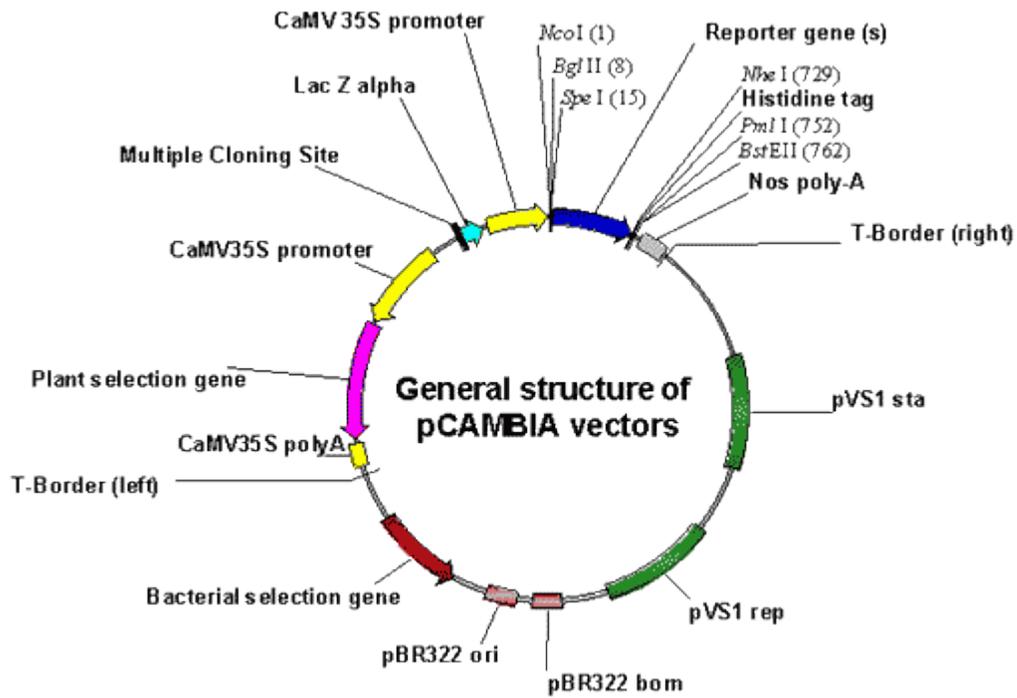
**pHELLSGATE 12:**



**pDONR 221:**



**Estructura general de vectores pCAMBIA:**



**pK7FGW2.0:**

