



Universidad de Concepción
Facultad Farmacia

CARACTERIZACIÓN DE GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN PEDICELO DE UVA DE MESA EN RESPUESTA A DESGRANE POR TRATAMIENTO CON ÁCIDO GIBERÉLICO

CARLOS FELIPE CARRASCO PÉREZ

Tesis presentada en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor guía

Dr. Patricio Vicente Hinrichsen Ramírez
INIA-La Platina
Instituto de Investigaciones Agropecuarias

Patrocinante

Dr. Homero Enrique Urrutia Briones
Centro de Biotecnología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

**Mayo 2022
Concepción, Chile**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

© 2022, Carlos Felipe Carrasco Pérez

Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Poscosecha en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA- La Platina, Santiago.

Dedicado a mis padres y hermanas, gracias por ser mi soporte durante toda mi carrera universitaria por su apoyo y amor durante todo este período.

Y a mi esposo por ser la persona en la que encuentro paz cuando más lo necesito y me ayuda a crecer cada día más.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar al Profesor Patricio Hinrichsen Ramírez por permitirme realizar y financiar mi tesis dentro del proyecto FONDEF-GRG D131-0003 “Estudios Fisiológicos y Genómicos para la Identificación de Genes Relacionados al Desgrane de Poscosecha de Uva de Mesa, y su Posible uso en Mejoramiento Asistido”.

También agradezco al equipo de trabajo del Laboratorio de Poscosecha del centro de investigación INIA La Platina que me ayudo a lo largo de todo el proceso de elaboración de esta tesis. En especial a los investigadores:, Miguel García Rojas, Mauricio Agüayo y Marco Meneses por brindarme su ayuda y conocimientos para profundizar más dentro de mi tema.

Agradezco a mis padres por todas las formas en las que me han apoyado a lo largo de mi vida, en especial, por este reciente periodo de mi vida .

Por último quiero agradecer a todas las personas que me apoyaron durante todo este proceso, ya sea de forma profesional y/o como amigos.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	iv
TABLA DE CONTENIDOS	v
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	ix
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Exportación Uva de mesa	1
1.2. Desarrollo fenológico en variedades apirénicas	2
1.3. Ácido giberélico, regulador de crecimiento	3
1.4. Efectos no deseados: Abscisión y desgrane	6
1.5. Estudios en pedicelo.....	9
1.6. Análisis transcriptómicos en uva de mesa	13
2. HIPÓTESIS.....	17
3. OBTEJIVOS	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5. RESULTADOS.....	30
5.1. Caracterización fisiológica del pedicelo en cepas susceptibles y no susceptibles a desgrane por tratamiento con ácido giberélico	30
5.2. Identificación de genes candidatos a partir de análisis transcriptómico en pedicelo en genotipo susceptible al desgrane por tratamiento con ácido giberélico	37
5.3. Validación de la expresión en genes seleccionados en genotipos susceptibles al desgrane por tratamiento con ácido giberélico en su desarrollo fenológico	49
6. DISCUSIÓN.....	62
6.1. Caracterización fisiológica del pedicelo en cepas susceptibles y no susceptibles a desgrane por tratamiento con ácido giberélico	62

6.2. Identificación de genes candidatos a partir de análisis transcriptómico en pedicelo en genotipo susceptible al desgrane por tratamiento con ácido giberélico	64
6.3. Validación de la expresión en genes seleccionados en genotipos susceptibles al desgrane por tratamiento con ácido giberélico en su desarrollo fenológico	66
7. CONCLUSIÓN	74
8. REFERENCIAS	76

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 5-1.** Datos recolectados a partir de caracterización fisiológica en pedicelo. Se describe los valores de grosor (mm), largo (mm) y desgrane (porcentaje) para los diferentes puntos de muestreo: 7 días posaplicación de GA₃ (7dpa), envero (Env), 1 semana antes de cosecha (1AC), cosecha (Cos) y posteriormente a 30 días de guarda en frío (30SF)..... Página 36.
- Tabla 5-2.** Resumen de la calidad de lecturas tomando en cuenta el total de las 4 librerías..... Página 40.
- Tabla 5-3.** Resumen de la distribución de lecturas del mapeo considerando las lecturas utilizables..... Página 40.
- Tabla 5-4.** Lista final de genes seleccionados mediante análisis bioinformático para caracterización de expresión. Se seleccionó un total de 10 genes a partir de análisis transcriptómico en precosecha ($p < 0.05$), correspondiente al estado fenológico de envero..... Página 42.
- Tabla 5-5.** Relevancia de genes seleccionados mediante ensayo transcriptómico para la elaboración de perfiles de expresión en diferentes estados del desarrollo de uva de mesa, considerando la ruta metabólica y función biológica asociada en pedicelo su posible efecto en el desgrane..... Página 43.
- Tabla 5-6.** Partidores para los genes previamente seleccionados y diseñados mediante el programa Primer Premier 5™..... Página 44.
- Tabla 5-7.** Eficiencia de los partidores, tasa de error y coeficiente de determinación (R^2) obtenidos a partir de la curva de calibración generada para cada gen por ensayo PCR en tiempo real..... Página 51.
- Tabla 5-8.** Resumen de los niveles de expresión relativa en Thompson Seedless (TS) y Línea de Selección #23 (L#23) en todos los genes estudiados. La expresión fue normalizada por medio del gen TCPB y posteriormente contrastada con la expresión del punto envero control. ($p < 0.05$ test de Tukey)..... Página 61.

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1-1. Efecto del tratamiento con ácido giberélico en baya de uva Thompson Seedless. Las vides fueron rociadas con 200 ppm de GA₃. En cosecha los racimos fueron pesados y posteriormente agitados durante 1 minuto. Las bayas caídas fueron recolectadas y pesadas para determinar el porcentaje de desgrane (Ben-Tal 1990)..... Página 6.

Figura 1-2. Medición en cosecha 2015/2016 del desgrane en 'Thompson seedless' y línea # 23 tratadas (GA₃) o no (control) con ácido giberélico. Análisis realizado en cosecha y posteriormente a distintos días de almacenaje en frío (SF). (García-Rojas et al., 2018)..... Página 8.

Figura 1-3. Raquis, pedicelo y baya de uva sin semillas. En azul se observa el sistema vascular y las flechas indican la dirección de agua y/o nutrientes. Ilustración modificada de Knipfer *et al.*, 2015..... Página 10.

Figura 1-4. Desarrollo de pedicelos en pera oriental (*Pyrus pyrifolia*) sin tratar (A-D) y tratados con ácido giberélico (E-H) a diferentes intervalos de días posfloración (DAFB). La aplicación exógena de GA₃ se realizó 35 días posfloración. Park 2017.....Página 11.

Figura 1-5. Crecimiento del tamaño relativo de baya (verde) y pedicelo (rojo) en intervalos de 10 días después de la floración, en conjunto se indican los niveles °Brix cuantificables en baya. Ilustración modificada de Jordan Koutroumanidis, Practical Winery & Vineyard Journal 2002..... Página 13.

Figura 4-1. Ruta del análisis bioinformático para la selección de genes a partir del análisis transcriptómico (ARN-Seq) realizado en pedicelo de la selección línea #23 en el estado fenológico de envero (precosecha) de la temporada 2015/2016..... Página 25.

Figura 4-2. Ruta de la metodología utilizada para el análisis de las lecturas obtenidas a partir de la secuenciación de ARN total (ARN-Seq) realizado en pedicelo de la selección línea #23 en el estado fenológico de envero (precosecha) de la temporada 2015/2016..... Página 26.

Figura 5-1. Medición del grosor del pedicelo en la cosecha 2016/2017 en la variedad de uva de mesa Thompson Seedless (A) y en la selección Línea 23 (B), ambos genotipos fueron tratados (GA₃) o no (Control) con ácido giberélico. Análisis realizado 7 días posaplicación de GA₃ (7dpa), envero (Env), 1 semana antes de

cosecha (1AC), cosecha (Cos) y posteriormente a 30 días de guarda en frío (30SF)..... Página 32.

Figura 5-2. Medición del largo del pedicelo en la cosecha 2016/2017 en la variedad de uva de mesa Thompson Seedless (A) y en la selección Línea 23 (B), ambos genotipos fueron tratados (GA_3) o no (Control) con ácido giberélico. Análisis realizado 7 días posaplicación de GA_3 (7dpa), envero (Env), 1 semana antes de cosecha (1AC), cosecha (Cos) y posteriormente a 30 días de guarda en frío (30SF)..... Página 33.

Figura 5-3. Medición en cosecha 2016/2017 del desgrane en la variedad de uva de mesa Thompson Seedless (A) y en la selección Línea 23 (B), ambos genotipos fueron tratados (GA_3) o no (Control) con ácido giberélico. Análisis realizado en cosecha (Cos) y posteriormente a 30 días de guarda en frío (30SF)..... Página 35.

Figura 5-4. Puntuación Q20/Q30 a partir de lecturas crudas obtenidas para la secuenciación de las muestras del estado fenológico de Envero tanto para control (réplica 1 y 2) como para el tratamiento GA_3 (réplica 1 y 2)..... Página 38.

Figura 5-5. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para comprobar por medio de PCR convencional la presencia y correcta temperatura de alineamiento de los partidores en muestras de pedicelo correspondientes al estado fenológico de envero..... Página 44.

Figura 5-6. Electroforesis en gel denaturante de agarosa al 1,5% para comprobar la correcta extracción del ARN total a partir de la integridad de las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 18S y 28S. El ARN fue obtenido a partir de pedicelos de la variedad de uva de mesa Thompson Seedless (A) y en la selección Línea 23 (B)..... Página 46.

Figura 5-7. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para comprobar la correcta obtención ADNc. El ADNc fue obtenido a partir del ARN total extraído de pedicelos de la variedad de uva de mesa Thompson Seedless (A) y en la selección Línea 23 (B)..... Página 48.

Figura 5-8. Expresión relativa en Thompson Seedless (A) y Línea 23 (B) del gen Fenilalanina amonioliase (PAL). La expresión fue normalizada por medio del gen TCPB y posteriormente contrastada con la expresión del punto envero control. Diferentes letras entre el estado fenológico y tratamiento representan diferencias significativas con $p < 0.05$ por test de Tukey..... Página 52.

Figura 5-9. Expresión relativa en Thompson Seedless (A) y Línea 23 (B) del gen Cafeoil-CoA O-metiltransferasa (CCOMT). La expresión fue normalizada por medio del gen TCPB y posteriormente contrastada con la expresión del punto envero control. Diferentes letras entre el estado fenológico y tratamiento representan diferencias significativas con $p < 0.05$ por test de Tukey..... Página 53.

Figura 5-10. Expresión relativa en Thompson Seedless (A) y Línea 23 (B) del gen Factor de transcripción sensible a etileno RAP2-3 (RAP2-3). La expresión fue normalizada por medio del gen TCPB y posteriormente contrastada con la expresión del punto envero control . Diferentes letras entre el estado fenológico y tratamiento representan diferencias significativas con $p < 0.05$ por test de Tukey Página 54.

Figura 5-11. Expresión relativa en Thompson Seedless (A) y Línea 23 (B) del gen Cinamoil-CoA reductasa 1 (CCR1). La expresión fue normalizada por medio del gen TCPB y posteriormente contrastada con la expresión del punto envero control. Diferentes letras entre el estado fenológico y tratamiento representan diferencias significativas con $p < 0.05$ por test de Tukey..... Página 55.

Figura 5-12. Expresión relativa en Thompson Seedless (A) y Línea 23 (B) del gen S-adenosil sintasa 5 (METK5). La expresión fue normalizada por medio del gen TCPB y posteriormente contrastada con la expresión del punto envero control. Diferentes letras entre el estado fenológico y tratamiento representan diferencias significativas con $p < 0.05$ por test de Tukey..... Página 56.

Figura 5-13. Expresión relativa en Thompson Seedless (A) y Línea 23 (B) del gen Lacasa 12 (LAC12). La expresión fue normalizada por medio del gen TCPB y posteriormente contrastada con la expresión del punto envero control . Diferentes letras entre el estado fenológico y tratamiento representan diferencias significativas con $p < 0.05$ por test de Tukey Página 57.

Figura 5-14. Expresión relativa en Thompson Seedless (A) y Línea 23 (B) del gen Giberelina 2-beta-dioxigenasa (GA2ox8). La expresión fue normalizada por medio del gen TCPB y posteriormente contrastada con la expresión del punto envero control . Diferentes letras entre el estado fenológico y tratamiento representan diferencias significativas con $p < 0.05$ por test de Tukey..... Página 58.

Figura 5-15. Expresión relativa en Thompson Seedless (A) y Línea 23 (B) del gen BAHD aciltransferasa DCR (DCR). La expresión fue normalizada por medio del gen TCPB y posteriormente contrastada con la expresión del punto envero control. Diferentes letras entre el estado fenológico y tratamiento representan diferencias significativas con $p < 0.05$ por test de Tukey..... Página 59.

Figura 5-16. Expresión relativa en Thompson Seedless (A) y Línea 23 (B) del gen Jasmonato O-metiltransferasa (JMT). La expresión fue normalizada por medio del gen TCPB y posteriormente contrastada con la expresión del punto envero control . Diferentes letras entre el estado fenológico y tratamiento representan diferencias significativas con $p < 0.05$ por test de Tukey..... Página 60.

RESUMEN

La susceptibilidad al desgrane de ciertos genotipos de uva de mesa está asociada a la expresión diferencial de genes expresados en el pedicelo en respuesta al tratamiento con ácido giberélico (GA_3). Se caracterizaron genes diferencialmente expresados en la estructura en genotipos susceptibles a desgrane por tratamiento con ácido giberélico. Para ello se estudió la expresión de genes identificados mediante análisis transcriptómico (ARN-Seq) por comparación de muestras tratadas y no tratadas con la fitohormona y seleccionándolas a partir de su función biológica asociada al fenotipo (desgrane). Estos genes se validaron mediante análisis PCR tiempo real comparando muestras de ARN obtenidas de variedades que presentan diferentes respuestas contrastantes al desgrane frente a aplicaciones de GA_3 y sus respectivos controles. Esto se realizó con la toma de muestras en diferentes estados fenológicos para observar su perfil de expresión a lo largo del desarrollo de la baya. Un total de 9 genes fueron seleccionados para ser analizados: VvPAL, VvCCOAOMT, VvRAP2-3, VvCCR1, VvMETK5, VvLAC12, VvGA2ox8, VvDCR y VvJMT. Estos genes presentaron una expresión diferencial y posteriormente podrían servir para desarrollar marcadores de selección para descartar progenitores y variedades con propensión a desgrane.

ABSTRACT

Shatter susceptibility in certain table grape genotypes is associated with a differential expression of genes expressed in the pedicel in response to treatment with gibberellic acid (GA₃). Genes differentially expressed in the structure were characterized in genotypes susceptible to shatter by treatment with gibberellic acid. To accomplish this, the expression of the genes was identified by transcriptomic analysis (RNA-seq) and studied by comparing samples treated and non-treated with the phytohormone and selecting them based on their biological function associated with the phenotype (shatter). These genes were validated by qPCR analyses comparing RNA samples obtained from varieties that present contrasting responses to shatter compared to GA₃ applications and their respective controls. This was done by taking samples in different phenological stages to observe their expression profile throughout the development of the berry. A total of 9 genes were selected to be analyzed: VvPAL, VvCCOAOMT, VvRAP2-3, VvCCR1, VvMETK5, VvLAC12, VvGA2ox8, VvDCR, and VvJMT. These genes showed a differential expression and could later be used to develop selection markers to rule out parents and segregants with a propensity to shatter.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Exportación Uva de mesa

A nivel mundial la vid (*Vitis vinifera L.*) es uno de los principales frutales, con un área cultivada de alrededor de 7,5 millones de hectáreas y una producción aproximada de 80 millones de toneladas ocupando así el tercer lugar mundial en producción, después de las bananas y manzanas (Datos FAO 2018). De acuerdo con la Organización Internacional de Viñas y Vinos, del total producido a nivel mundial un 30% correspondería a uva de mesa, en cuyo caso la frescura, el color, el sabor, la textura y el tamaño de los racimos y bayas son importantes para el consumidor (OIV 2016).

En Chile, la uva de mesa (excluyendo a la uva para vinificación) lidera la lista como la principal especie frutal con aproximadamente 47.800 hectáreas distribuidas principalmente entre la zona norte (Región de Atacama) y centro del territorio continental (Región de Ñuble), con una producción total de entre 730.000 y 800.000 toneladas para exportación, correspondientes a un monto aproximado de US\$ 1.700 millones por temporada (ODEPA 2019). Esto posiciona a Chile como el principal exportador a nivel mundial por un amplio margen, con destino preferente a los mercados estadounidense, europeo y adentrándose de forma creciente al mercado asiático (ODEPA 2019).

La exportación total de Chile se concentra principalmente en cuatro variedades: la variedad con semillas 'Red Globe' (27,7%), seguida de 'Thompson Seedless' (24,5%), 'Crimson Seedless' (21%) y 'Flame Seedless' (11,4%), las tres últimas apirenas (es decir, sin semillas) y que representan en conjunto más de un 60% del total enviado al extranjero (ODEPA 2019). El alto porcentaje de variedades apirénicas exportadas se condice con el atractivo comercial que representan éstas para los consumidores de los principales mercados señalados anteriormente.

1.2. Desarrollo fenológico en variedades apirénicas

El desarrollo del fruto de la uva de mesa se grafica en el crecimiento de la baya, representado por medio de una curva sigmoidea de doble de crecimiento separada por una fase de latencia (Kennedy 2002). La primera etapa corresponde a una fase de división celular durante las primeras semanas, resultando en un aumento acelerado del tamaño y peso de la baya; esta fase posee una duración de 4 a 10 semanas dependiendo de la variedad y al final de ésta el número total de células en la baya ha sido fijado (Coombe 1992). Seguidamente comienza la segunda etapa, la que se caracteriza como una fase de latencia entre 1 a 3 semanas en la que se reduce la tasa de crecimiento de la baya (Kennedy 2002). El paso a la tercera etapa comienza en el punto de inflexión conocido como envero, marcando el inicio de la maduración del fruto con una rápida acumulación de azúcares y expansión celular que genera el aumento a un doble del tamaño a la cosecha (Kennedy 2002).

A pesar de su alto interés comercial, la ausencia de semillas en variedades apirénicas tendría un efecto negativo en el tamaño del producto deseado, ya que las giberelinas (GA_s), fitohormonas que fomentan el desarrollo de la planta, serían sintetizadas en su mayoría en dicho órgano (Dennis y Nitsch 1966), específicamente en el embrión (Kaneko *et al.*, 2003). En estos cultivos la fertilización es seguida por el aborto del endosperma (estenospermocarpia), y como consecuencia, el desarrollo de la semilla se detiene; éstas solo servirían como una fuente primaria de giberelinas (Conde *et al.*, 2007), las que son transportadas al fruto para fomentar el crecimiento; es más, el número de semillas suele presentar una correlación lineal con el tamaño de la baya y, por lo tanto, con el tamaño final del racimo (Walker *et al.* 2005); esto no solo acontece en uva de mesa, sino que también en otras frutas (NCBI 2022). Como consecuencia de lo anterior es que estas variedades presentan un tamaño pequeño por contener niveles bajos de GA_s (Iwahori *et al.*, 1967). Es más, se ha demostrado en estudios de mutantes deficientes en giberelinas endógenas su importancia en el desarrollo de la mayoría de los órganos y tejidos en desarrollo (Hedden y Phillips, 2000).

1.3. Ácido giberélico, regulador de crecimiento

Los primeros reportes de la presencia de giberelinas endógenas en uva sugieren que estarían involucradas en la regulación del tamaño de la baya durante la primera etapa de crecimiento y que podría ser un factor limitante del tamaño de bayas en uvas apirénicas (Coombe 1960); de hecho, el contenido máximo alcanzable se daría

en las etapas I y II. Incluso se encontrarían mayores niveles en variedades con semilla de aquellas que no tienen y disminuirían a medida que avanza el estado fenológico, obteniendo dos máximos, el mayor entre 17 a 21 días después de la antesis (durante el inicio de la etapa I) y el otro (en menor grado) se detecta entre el final del periodo de letargo y el inicio del segundo periodo de crecimiento (Pérez *et al.*, 2000). Es por esto, que en las variedades apirénicas se requiere la aplicación externa de giberelinas, y por preferencia de ácido giberélico (GA₃) para el crecimiento de baya, ya que sin este regulador de crecimiento endógeno la baya/racimo no alcanza un tamaño de interés comercial (Gao *et al.*, 2022).

De las 136 giberelinas identificadas, la mayoría no son biológicamente activas y entre las que sí lo son, las más comunes en plantas superiores son GA₁, GA₄ y GA₇ (McMillan 2001) y, a pesar de estar presentes en bajas concentraciones en plantas, regulan procesos tan importantes como el crecimiento de la baya mediado por división celular, el alargamiento celular, o ambos (Sachs y Weaver, 1968).

El GA₃ es una de las principales giberelinas bio-activas (junto a GA₁, GA₄ y GA₇) (Yamaguchi 2008). Este compuesto fue descubierto al observar que el hongo *Gibberella fujikuroi* causaba el aumento desmedido del tamaño y aborto de semillas en arrozales; el componente asociado a este efecto fue aislado del hongo, revelándose luego su estructura química (Chasan 1995). A partir de su descubrimiento, el GA₃ es la giberelina más utilizada a nivel industrial en agronomía y horticultura, debido a su bajo costo y fácil síntesis, que emulan al compuesto natural (Trindade *et al.*, 2015).

La utilización de ácido giberélico para incrementar el tamaño de las bayas en variedades de *Vitis vinífera* carentes de semillas fue introducido hace más de medio siglo (Weaver 1958) e incluso se logró demostrar que el momento de aplicación en función del estado fenológico de la vid era crucial para determinar un efecto específico en la planta (Coombe 1973), es decir, la utilización de la fitohormona en cierto punto del crecimiento causaría una determinada respuesta a nivel biológico. Por ejemplo, la aplicación de GA₃ en cultivares con semillas anterior a la etapa de antesis aumenta la cuaja e induce la partenocarpia (Chundawat *et al.*, 1971); causa lignificación y contorsión del raquis (Agüero *et al.*, 2000) e induce el alargamiento de las bayas en algunos cultivares (Nijjar y Bhatia, 1969), y en otros, reduce el tamaño (Chundawat *et al.*, 1971). Al menos dos aplicaciones de GA₃ (40 ppm o 40 µL L⁻¹) son recomendadas comercialmente en uva de mesa ‘Thompson Seedless’ en condiciones locales de cultivo (Pérez 1994). Sin embargo, los agricultores tienden a usar el regulador de crecimiento en exceso para obtener un tamaño de baya acorde a los mercados internacionales, aumentando la tasa de desgrane en esta variedad (Retamales y Cooper 1993). En otros lugares, como Sudáfrica, se recomienda realizar no más de tres aplicaciones (Mariette *et al.* 2007). Como se aprecia en la Figura 1-1, el número de aplicaciones y la concentración son proporcionales al desgrane de la baya, lo que limita el uso de la fitohormona.

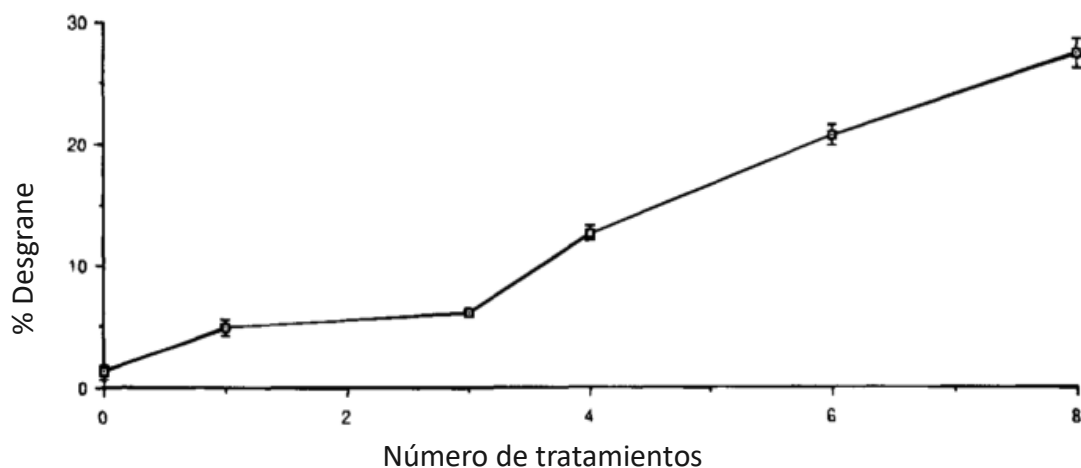


Figura 1-1. Efecto del tratamiento con ácido giberélico en baya de uva Thompson Seedless. Las vides fueron rociadas con 200 ppm de GA_3 . En cosecha los racimos fueron pesados y posteriormente agitados durante 1 minuto. Las bayas caídas fueron recolectadas y pesadas para determinar el porcentaje de desgrane. Obtenido desde Ben-Tal 1990.

1.4. Efectos no deseados: Abscisión y desgrane

La respuesta al tratamiento con GA_s es diversa y dependiente a la sensibilidad de cada variedad (Wolf y Loubser, 1992), incluso se han descrito distintos grados de respuesta sujeto a tejido y/o órganos entre un mismo cultivar (Agüero *et al.*, 2000; Mullins *et al.*, 1992;) sin saberse el porqué de esto hasta el día de hoy. Además de su influencia en el tamaño de la baya, los racimos tienden a eliminar frutos al ser rociados durante la floración con GA_3 , causando una gran reducción en el número de bayas desarrolladas por racimo, alivianando así la labor para realizar una poda apropiada (Lynn C. 1966; Williams L. 1987). Sin embargo, el tratamiento con GA_3 también causa un mayor porcentaje de la caída de bayas en racimos maduros, es decir, se genera el desgrane o abscisión del fruto, especialmente en los periodos de

cosecha y poscosecha (Jensen y Bettiga 1983). Estos efectos combinados del tratamiento en 'Thompson Seedless' han sido conocidos durante muchos años (Ben-Tal 1990), sin embargo, ha sido muy difícil determinar la concentración exacta, número y tiempos de aplicaciones de esta fitohormona en los que el daño (desgrane) comienza a superar los beneficios obtenidos (mejor poda y bayas más grandes). El desgrane aumenta al madurar la uva y usualmente la severidad es mayor en variedades sin semilla ('Flame Seedles', 'Thomspson Seedless', 'Crimson Seedless', entre otras) y menor en las que sí tienen ('Red Globe') (Cheng *et al.*, 2013). Es más, la severidad varía entre temporadas, variedades e incluso cultivos; esto ha sido confirmado en varios estudios (Cheng *et al.*, 2013; García-Rojas *et al.*, 2018), encontrando una gran variedad de respuestas en distintos genotipos de uva de mesa (Figura 1-2).

El manejo también incide considerablemente en el desgrane. Por ejemplo, el uso de reguladores de crecimiento tales como el ácido giberélico y forclorfenurón (fitohormona perteneciente al grupo de las citoquininas), no solo inducen un aumento del tamaño de la baya, sino que promueven el engrosamiento del pedicelo (Zoffoli *et al.*, 2009). Todas las variedades de uva presentan un menor o mayor grado de susceptibilidad al desgrane de forma natural. Sin embargo, el tratamiento con ácido giberélico generaría un aumento de la predisposición a este fenómeno (Ben-Tal 1990). Uno de los ejemplos característicos es la variedad asiática 'Kyoho', la que presenta serios problemas posaplicación, reflejándose en la pérdida de una parte significativa de la cosecha y de un almacenamiento problemático, dificultando así, su comercialización en mercados internacionales (Lv *et al.*, 1994). De esta

manera, la abscisión de las bayas en poscosecha no solo es un tema de interés científico, sino que también tiene implicancias productivas y comerciales.

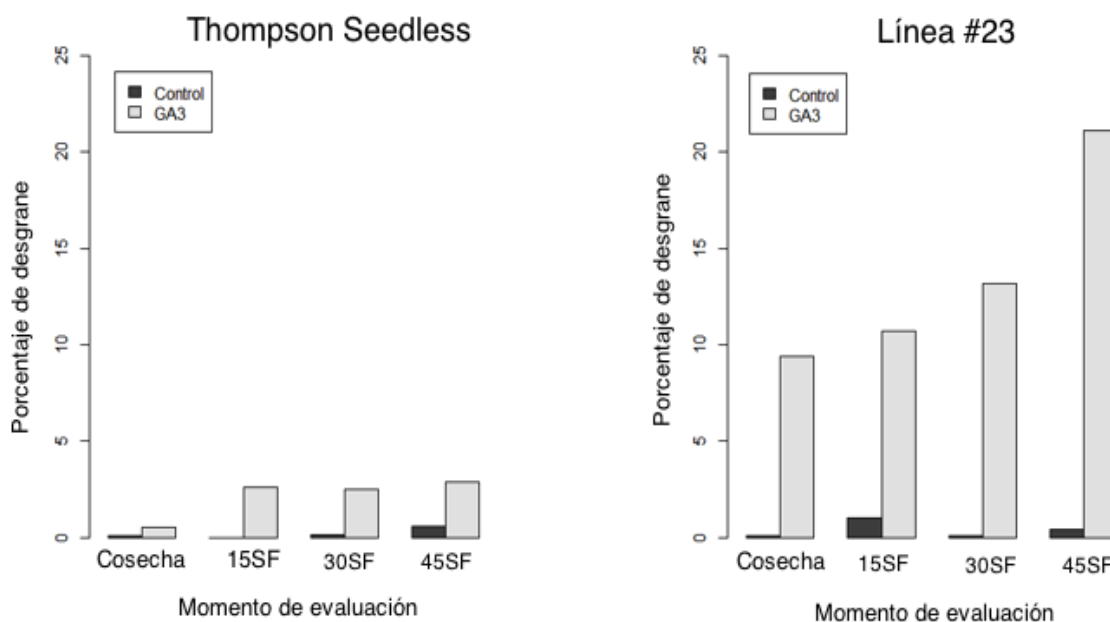


Figura 1-2. Medición en cosecha 2015/2016 del desgrane en ‘Thompson seedless’ y línea # 23 tratadas (GA₃) o no (control) con ácido giberélico. Análisis realizado en cosecha y posteriormente a distintos días de almacenaje en frío (SF) (García-Rojas *et al.*, 2018).

En general la abscisión ocurre naturalmente en hojas, flores y frutas; este fenómeno forma parte del ciclo de vida y consiste en la separación de la estructura del resto de la planta (González-Carranza *et al.*, 1998). Si bien los mecanismos involucrados en el desgrane son desconocidos, se cree que serían multifactoriales (García-Rojas *et al.* 2018). De hecho, muchas de las bases fisiológicas sugieren que este proceso estaría programado para generar alteraciones morfológicas de células y arreglos

del tejido (Knipfer *et al.*, 2015). La zona de abscisión juega un rol crucial en el desgrane del fruto, y se caracteriza por la formación de una banda conformada por células compactas y morfológicamente distinguibles a sus vecinas, variando en su espesor de 2 a 50 células (Taylor y Whitelaw, 2001). Esta zona se forma en la unión de la baya con el pedicelo, produciendo la separación entre ambas estructuras de forma natural o por manipulación del racimo.

1.5. Estudios en pedicelo

El pedicelo es una parte del tallo que se extiende para unir la flor y el fruto (dependiendo del estado de desarrollo de la planta) a la inflorescencia, especializado para ofrecer soporte mecánico y generar un flujo para el intercambio de nutrientes y agua por medio de la vía vascular entre la planta y la fruta (Figura 1-3), lo que jugaría un rol clave en su crecimiento, esto ha sido descrito por Mazzeo *et al.* 2013 en kiwi (*Actinidia deliciosa*). También, se ha descrito en 'Thompson Seedless' que el tratamiento con ácido giberélico disminuiría significativamente la flexibilidad del pedicelo debido al aumento de su diámetro, correlacionándose con un mayor porcentaje de desgrane, en este caso, la rigidez impediría al pedicelo resistir las fuerzas mecánicas al ser manipulado durante la cosecha y poscosecha, lo que generaría el quiebre por exceso de fuerza en la zona de abscisión (Retamales y Cooper 1993).

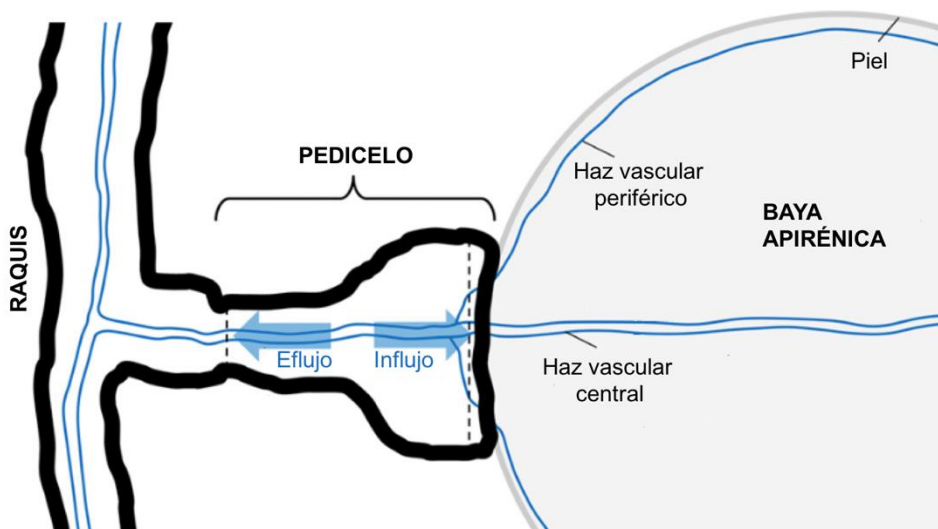


Figura 1-3. Raquis, pedicelo y baya de uva sin semillas. En azul se observa el sistema vascular y las flechas indican la dirección de agua y/o nutrientes. Ilustración modificada desde Knipfer *et al.*, 2015.

A su vez, estudios histológicos realizados recientemente por Park (2017) en pera oriental 'Wonhwang' (*Pyrus pyrifolia*) demuestran que el diámetro del pedicelo en fruta tratada alcanza su tamaño máximo en un tiempo menor que el grupo control; esto debido a la expansión en los tejidos del haz vascular por un aumento del tejido celular (Figura 1-4). En este estudio señalan que la aplicación de giberelinas afecta el tamaño en los tejidos de la corteza, xilema y floema, lo que indica que estos tejidos se expanden debido al tratamiento de la fitohormona aplicada de manera exógena, aunque todavía no se ha demostrado si la expansión de la corteza observada aumenta debido a la expansión celular o división celular, porque la significancia en el tamaño y número de células no se ha demostrado (Park 2017). Los principales efectos registrados en pedicelo de pera por medio de ensayo

histológico demuestran un aumento de la elongación celular, y en menor grado de la división como respuesta a la aplicación externa de giberelinas; de hecho, se ha propuesto que las GA_s preceden esta respuesta (Park 2017). El grado de elongación se ve influenciado por la extensión de la pared celular, causando un aumento de la extensibilidad mecánica y una relajación en células vivas (Park 2017). En el caso de la uva de mesa ocurriría algo similar a nivel celular, pero a diferencia de lo relatado anteriormente el tamaño final post-tratamiento difiere enormemente al del control (Kennedy 2002).

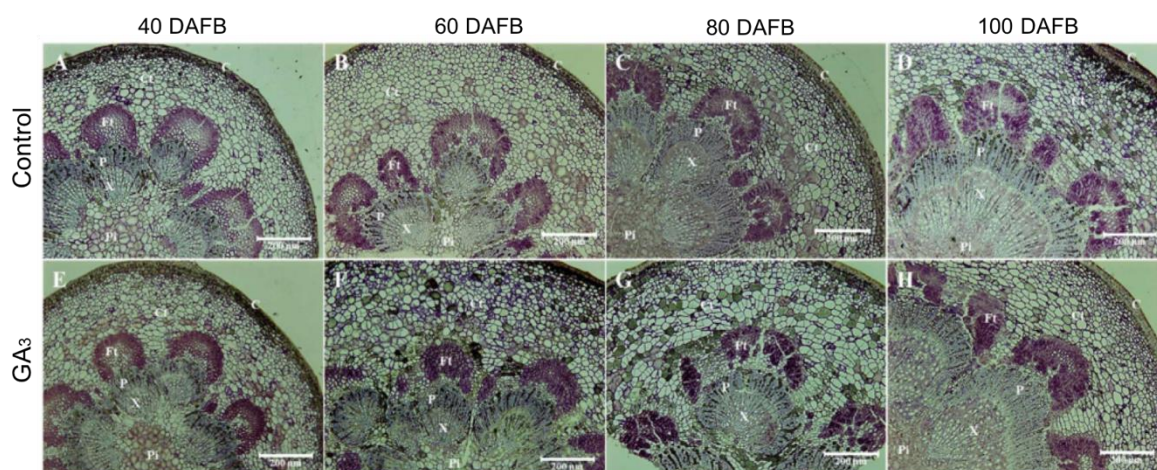


Figura 1-4. Desarrollo de pedicelos en pera oriental (*Pyrus pyrifolia*) sin tratar (A-D) y tratados con ácido giberélico (E-H) a diferentes intervalos de días posfloración (DAFB). La aplicación exógena de GA₃ se realizó 35 días posfloración. Obtenido desde Park 2017.

Al usar GA_s en pera, se aumenta la capacidad del pedicelo como sumidero de nutrientes por una mejora del flujo en el floema y del metabolismo de carbono en la fruta (Li *et al.*, 2015). Dicho aumento en la actividad del flujo aumentaría la concentración de nutrientes desde el pedicelo al fruto. Estos resultados también han

sido observados en distintos genotipos de uva de mesa, con variaciones en las fuerzas de separación del pedicelo con la baya (García-Rojas *et al.* 2018).

Durante la primera etapa de crecimiento, las bayas aumentan su tamaño varias veces y se establece el número de células casi final por baya (Ojeda *et al.*, 1999), por lo que el éxito de esta etapa es crítico para determinar el tamaño final y el número de bayas; a su vez hay que tomar en cuenta que esta etapa se ve afectada tanto por factores bióticos como abióticos (Vasconcelos *et al.*, 2009; Zinn *et al.*, 2010). Según estudios realizados por Douglas y Riggs (2005) en *Arabidopsis thaliana*, el pedicelo se desarrollaría un tanto diferente a la baya, alcanzando su máximo tamaño por división y elongación celular durante el envero y pudiendo dividir su desarrollo en tres etapas. Esto concuerda con caracterizaciones fisiológicas realizadas en pedicelo de 'Cabernet Sauvignon' hasta 90 días posfloración; en las que también se pudo clasificar la tasa de crecimiento en tres etapas (Knipfer *et al.*, 2015). En la figura 1-5 se puede apreciar la comparación entre las etapas determinadas tanto para baya como para pedicelo.

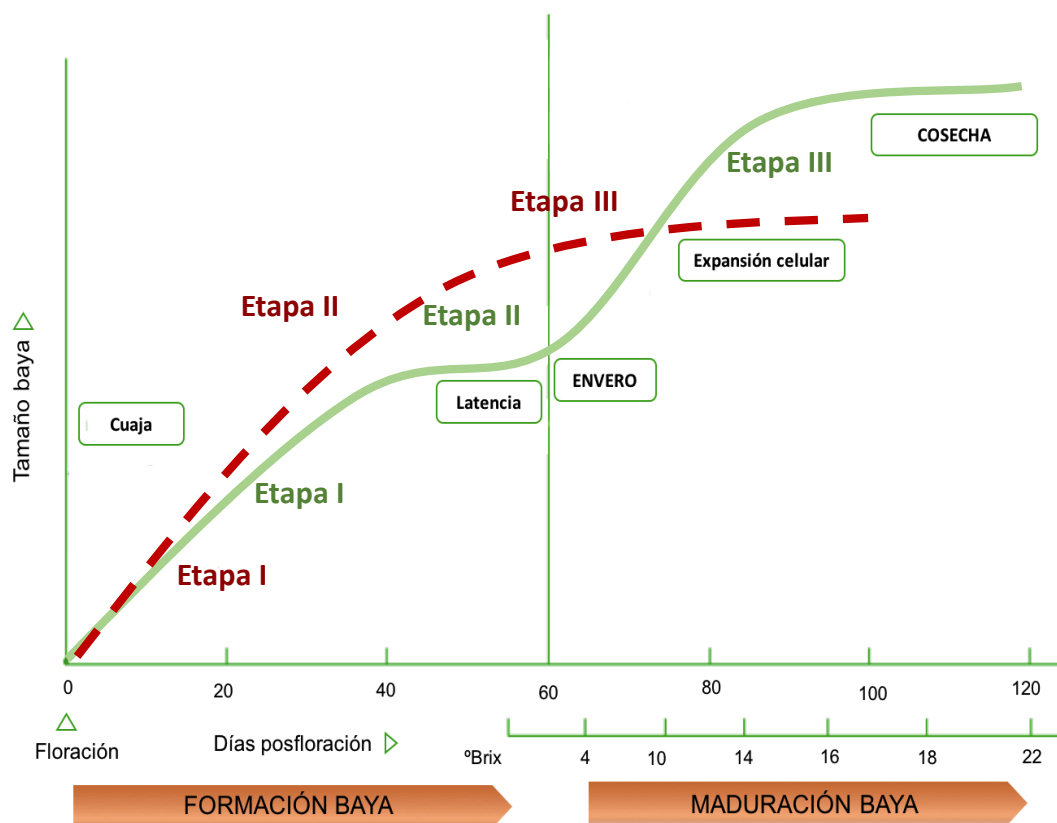


Figura 1-5. Crecimiento del tamaño relativo de baya (verde) y pedicelo (rojo) en intervalos de 10 días después de la floración, en conjunto se indican los niveles °Brix cuantificables en baya. Ilustración modificada desde Kennedy 2002.

1.6. Análisis transcriptómicos en uva de mesa

Los cambios fisiológicos y bioquímicos que producen el desgrane son el reflejo de una modulación en la expresión de muchos genes, pero se conoce muy poco acerca de los cambios transcripcionales y de su regulación (García-Rojas *et al.*, 2018). El acercamiento por medio de análisis ARN-Seq (Mortazavi *et al.*, 2008) produce millones de lecturas de ADNc cortos, los que son mapeados con un genoma de

referencia para obtener un mapa transcripcional a escala del genoma. Como resultado se generan mediciones absolutas que otorgan una mayor precisión y, por lo tanto, comprensión que otras técnicas empleadas hasta el momento, como los microarreglos (Hoen *et al.*, 2008).

El genoma secuenciado para vid (Jaillon *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2007) da cuenta de un modelo de cultivo de fruto leñoso en el que ocurre el proceso de abscisión en sus flores y también en la fruta. Esta versión del genoma se encuentra disponible en Genoscope (<http://www.genoscope.cns.fr/spip/>) con una cobertura de 12X, con un tamaño genómico aproximado de 500 Mbp y 26.500 genes.

Se han realizado diversos estudios moleculares por medio de la técnica ARN-Seq en vid con el fin de dilucidar diferentes mecanismos implicados en su desarrollo (Zenoni *et al.*, 2010; Correa *et al.*, 2014; Muñoz-Espinoza *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2019), algunos incluso centrándose en la respuesta de la baya a la aplicación externa de ácido giberélico (Chai *et al.*, 2014; Correa *et al.* 2015; Shiri *et al.*, 2019). Sin embargo, hasta la fecha ninguna de las investigaciones ha tomado en cuenta la importancia del pedicelo en este fenómeno a excepción de Meneses *et al.*, 2020 (Investigación del Laboratorio Poscosecha, INIA-La Platina).

El proceso de maduración de la fruta ha sido motivo de diversos estudios, siendo uno de los temas principales los factores genéticos asociados al control de este proceso (Ri *et al.*, 2010; Serrano *et al.*, 2017). Es necesario enfatizar la participación del pedicelo en el desgrane, al respecto, y tomando en cuenta la información

aportada por Douglas y Riggs (2005) en conjunto con lo descrito por Knipfer (2015), el estado fenológico de envero es de interés por ser la fase en la que el pedicelo alcanzaría su máximo tamaño y es un estadio próximo al tratamiento con ácido giberélico. Se busca la existencia de genes expresados en distintos estadios desde la aplicación de la hormona a días posteriores a su cosecha (almacenamiento en frío) que causarían cambios que afecten posteriormente el fenotipo de la vid en cosecha y poscosecha. Dichos cambios estarían desarrollándose a partir del momento del tratamiento con la fitohormona.

Los mecanismos que se relacionan a la respuesta a GA_s en la vid y su relación al desgrane en general siguen sin tener respuesta, y en general no se ha considerado en estudios previos al pedicelo. Tomando en cuenta el papel fundamental que tiene esta estructura en el soporte tanto mecánico como nutricional de la baya es imperativo elucidar los componentes de señalización que pudiesen aclarar de mejor manera este fenotipo.

A la fecha no existen estudios de análisis transcriptómico en pedicelo, menos aún ensayos que lo relacionen con la susceptibilidad al desgrane por aplicación de ácido giberélico en uva de mesa. Este trabajo tiene como fin evaluar a nivel molecular, en conjunto con datos fisiológicos, los cambios que ocurren a nivel transcripcional en genes seleccionados del pedicelo por medio de una cuantificación relativa de éstos. Lo anterior se sostiene mediante la base del análisis transcriptómico realizado en el estado fenológico de envero para la selección de uva de mesa Línea #23 tratada y no tratada con ácido giberélico. Esto debido a la importancia de este periodo en el

desarrollo de la estructura y la susceptibilidad de esta variedad al fenotipo en estudio, tomando como base (control basal) la expresión en dicha variedad y sin tratamiento. Por medio de los resultados obtenidos se analizaron los posibles cambios de expresión génica a lo largo de diferentes etapas del desarrollo del pedicelo, incluyendo poscosecha. Esto con el fin de poder identificar genes candidatos para el desarrollo de posibles marcadores moleculares que permitan predecir la ocurrencia (e intensidad) del fenómeno.

2. HIPÓTESIS

La susceptibilidad al desgrane está ligada al genotipo en uvas apirénicas y asociada a la expresión diferencial de genes relacionados a un mayor crecimiento y engrosamiento del pedicelo a partir del tratamiento con ácido giberélico durante su desarrollo fenológico generando una rigidización de la estructura a nivel celular permitiendo así una mayor tasa de desgrane.

3. OBJETIVOS

Objetivos generales

Caracterizar genes diferencialmente expresados en pedicelo de uva de mesa en genotipos susceptibles a desgrane por tratamiento con ácido giberélico.

Objetivos específicos

1. Caracterizar fisiológicamente el pedicelo en cepas susceptibles y no susceptibles a desgrane por tratamiento con ácido giberélico.
2. Identificar genes candidatos a partir de análisis transcriptómico en pedicelo de uva de mesa en genotipo susceptible al desgrane por tratamiento con ácido giberélico.
3. Validar la expresión de los genes seleccionados en los genotipos susceptibles y no susceptibles al desgrane con y sin tratamiento con ácido giberélico, en diferentes estados fenológicos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron dos genotipos apirénicos de uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) con respuestas contrastantes al desgrane tras el tratamiento con ácido giberélico (GA₃), ambas evaluadas al momento de cosecha y poscosecha (almacenamiento en frío). La primera es la variedad 'Thompson Seedless', la cual presenta una baja tendencia al desgrane. La segunda es la línea de selección #23 (producto de cruzamiento de 'Centennial Seedless' x 'Ruby Seedless') perteneciente al programa de fitomejoramiento de INIA - La Platina, la que presenta gran susceptibilidad al desgrane.

Se recolectaron 8 racimos para evaluar las muestras con y sin tratamiento de GA₃ para cada estado fenológico para posteriormente seleccionar un total de 30 bayas de todos los racimos (control y tratamiento por separado) con el fin de revisar los parámetros de madurez. Posteriormente se recolectaron los pedicelos separados de los racimos pertinentes a cada evaluación, los que se congelaron con nitrógeno líquido para ser almacenados a -80°C. Al momento de la cosecha se seleccionó un total de 64 racimos: 16 racimos tratados y 16 racimos no tratados con ácido giberélico para ambas variedades. La mitad de estos (32 racimos en total) fueron almacenados bajo condiciones comerciales para su posterior evaluación 30 días después de guarda en frío a 5°C.

Diseño experimental

El estudio se realizó con muestras de un ensayo de campo realizado en el valle central de Chile en la temporada 2016-2017 en el Centro de Investigación La Platina (33°34'20"S; 70°37'32"W; 630 m sobre el nivel del mar) perteneciente al Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Chile.

El ensayo se realizó bajo las mismas condiciones de manejo, tanto para los racimos sometidos a tratamiento con ácido giberélico como para los controles. Las evaluaciones se realizaron en los siguientes estados fenológicos: una semana post-aplicación de GA₃ (para la dosis final de la hormona); envero; una semana antes de cosecha; cosecha (madurez); y 30 días de almacenamiento en frío a 4°C (poscosecha). En cada estado fenológico se midió el contenido de sólidos solubles mediante el uso de un refractómetro, medida conocida como grados Brix. Esto permite estimar la acumulación de azúcares dentro de la baya y asociarla a parámetros de madurez, con el fin de inferir su estado fenológico (Amerine y Joslyn 1970). Para aquellas muestras correspondientes a una semana antes de cosecha se estima un valor alrededor de 16 °Brix, y para cosecha, ya sea para su estudio inmediato o posterior almacenamiento, se estima un valor de 17-18 °Brix como determinante de madurez. Para determinar el estado de envero, se considera el ablandamiento de la baya estimado en primer lugar al tacto y después verificado por medición de sólidos solubles. Los datos recolectados en todas las mediciones

fisiológicas y moleculares se analizaron mediante la prueba de Tukey (ANOVA doble varianza).

Tratamiento con regulador de crecimiento

Racimos de Thompson Seedless y de la Línea #23 fueron seleccionados aleatoriamente (N=8) para la aplicación de ácido giberélico (Pro-Gibb 40% Valent Biosciences Chile S.A., Santiago, Chile) por aspersión en ocasiones diferentes al mismo racimo.

Para Thompson Seedless se aplicaron 10 ppm en la etapa previa a la floración para generar la elongación del racimo, luego se aplicaron 15 ppm en plena floración para el raleo de frutos del racimo. Finalmente se aplicaron tres dosis en intervalos de siete días para un total de 200 ppm (40, 100 y 60 ppm, respectivamente); esto se realiza cuando las bayas miden aproximadamente 4-5 mm de diámetro ecuatorial, con el fin de aumentar el crecimiento de éstas. En la línea #23 se aplicaron tres dosis de 40 ppm de GA₃ (para un total de 120 ppm) con intervalos de siete días. El

Medición parámetros fisiológicos

El porcentaje de desgrane se cuantificó mediante agitación constante de los racimos seleccionados en cosecha y poscosecha previamente pesados (peso no mayor a 580 gramos). Se utilizó un vortex modificado con una plataforma y tenazas para

tomar los racimos y tener una medición estándar del porcentaje de desgrane. Sólo se pesaron aquellas bayas que se desprendieron del racimo por medio de su zona de abscisión con el pedicelo.

Se midió el largo y grosor del pedicelo al momento de su recolección al ser separado de la baya mediante un pie de metro (mm).

Por otra parte, se evaluó el contenido de sólidos solubles o grados Brix (% p/p de gramos de sacarosa por cada 100 g de solución) en el jugo de las bayas recolectadas para estimar el contenido de azúcares de la fruta con el fin de determinar una aproximación más exacta del estado fenológico y de su madurez. Esta cuantificación se realizó utilizando un refractómetro ATC-1E Atago™ (Tokyo, Japón).

Extracción de ácido ribonucleico (ARN) total desde pedicelo de uva de mesa

Para la extracción de ARN total de las muestras, previamente se realizó una homogeneización mediante la trituración de pedicelos recolectados en nitrógeno líquido, mediante la compresión de éstos entre dos placas de acero. Se prosiguió con la molienda de 1 gramo de tejido congelado utilizando el método *Hot Borate* (Gudenschwager *et al.*, 2013) modificando la cantidad de PVP utilizado y el tiempo de centrifugación para la extracción de ARN total. La pureza del ARN obtenido se comprobó midiendo la relación de absorbancia a 260/280nm utilizando el espectrofómetro Picodrop Microliter UV/Vis para ser cuantificado posteriormente

mediante fluorómetro Qubit® (Invitrogen™ by Life Technologies). Como paso final se observará mediante electroforesis en gel de agarosa-formaldehído (MOPS 400mM) al 2% la calidad del ARN extraído (degradación) al observar las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales mayor (28S) y menor (18S).

Síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario

A partir del ARN total se generó su ADNc mediante ensayo por reacción de transcripción reversa a partir de un templado de 2 µg correspondiente al ARN extraído. Se utilizó el kit MMLV-RT transcriptasa reversa (Promega, Madison, WI) y con cebadores oligo dT bajo el procedimiento estándar del fabricante en un termociclador MyCycler™ (Bio Rad Laboratories). La concentración y pureza obtenida se midió por espectrofotometría (260/280 y 260/230 nm). Seguidamente se generaron diluciones a 50 ng/µL para stock. Se descartó la degradación del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Las muestras fueron almacenadas a -80°C para ensayos posteriores.

Preparación librerías de ADNc

A partir del ARN total se realizaron 2 librerías de ADNc en duplicado (4 en total) correspondientes a muestras representativas del estado fenológico de envero en

pedicelo tratado con la ácido giberélico y su respectivo control (sin tratamiento). Para esto se enviaron las muestras de RNA total al Centro de Biotecnología Vegetal (Universidad Andrés Bello, Chile) para la síntesis de las librerías mediante el Kit TruSeq RNA Library Prep v2 (Illumina, Inc.) La calidad de las librerías fue medida mediante *Fragment Analyzer* (Agilent Technologies Inc.).

Selección de genes a partir de análisis transcriptómico

Las muestras fueron enviadas a Macrogen Inc. (Seúl, Corea) para realizar el análisis transcriptómico de secuenciación RNA-seq utilizando la plataforma HiSeq 3000 (Illumina Inc.). Las lecturas obtenidas fueron procesadas en el Laboratorio de Poscosecha, INIA-La Platina de acuerdo las rutas de análisis bioinformáticas y de metodología del ensayo (Figura 4-1 y 4-2).

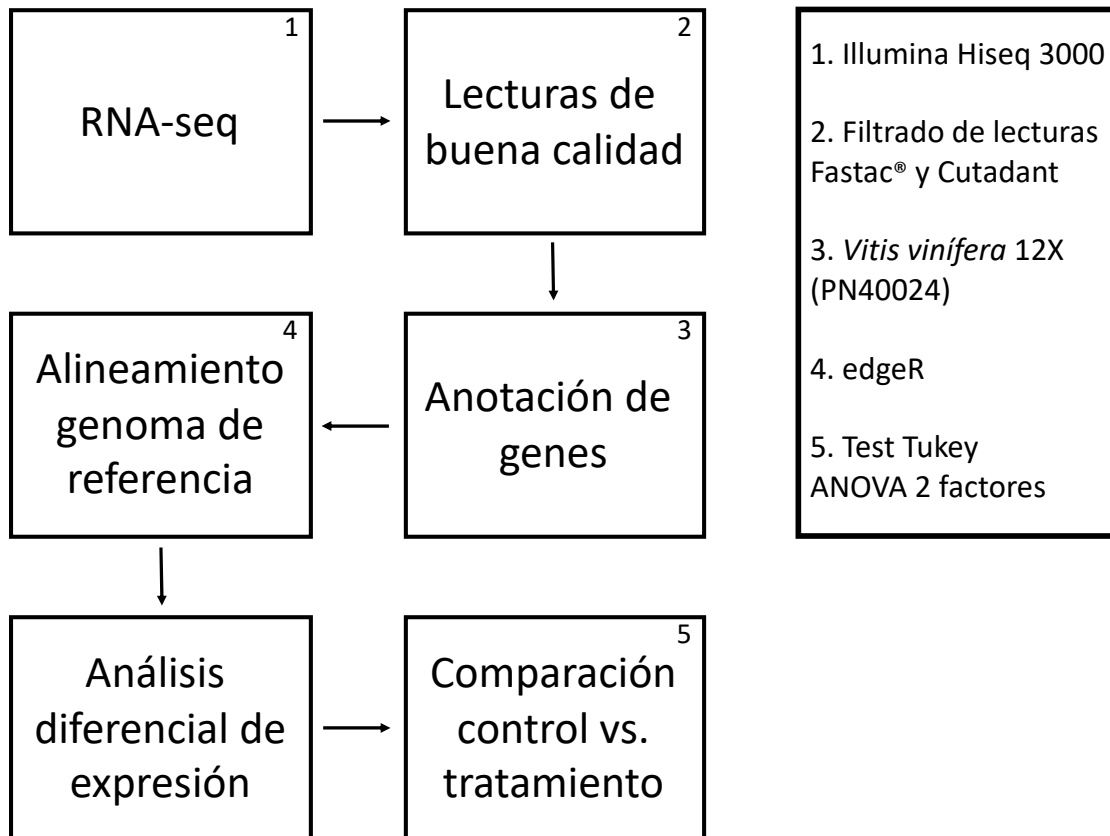


Figura 4-1. Ruta del análisis bioinformático para la selección de genes a partir del análisis transcriptómico (ARN-Seq) realizado en pedicelo de la selección línea #23 en el estado fenológico de envero (precosecha) de la temporada 2015/2016

Se realizó la selección de genes a partir de las librerías secuenciadas de genes obtenidos se utilizaron distintos parámetros de selección como: ClustalW para el alineamiento progresivo múltiple de secuencias de nucleótidos (Thompson y Higgins 1994); $\log_2FC$ o Logarithmic Fold Change (Love *et al.*, 2014) para comparar el número de lecturas entre tratamiento y control; FPKM o fragmentos por kilobase de exón por millón de lecturas mapeadas (Zhao *et al.*, 2021) para normalizar el número de lecturas por el largo y el total de lecturas y finalmente se filtrará de acuerdo a alguna función asociada. Lo anterior con el fin de obtener una lista final con genes candidatos para su posterior estudio

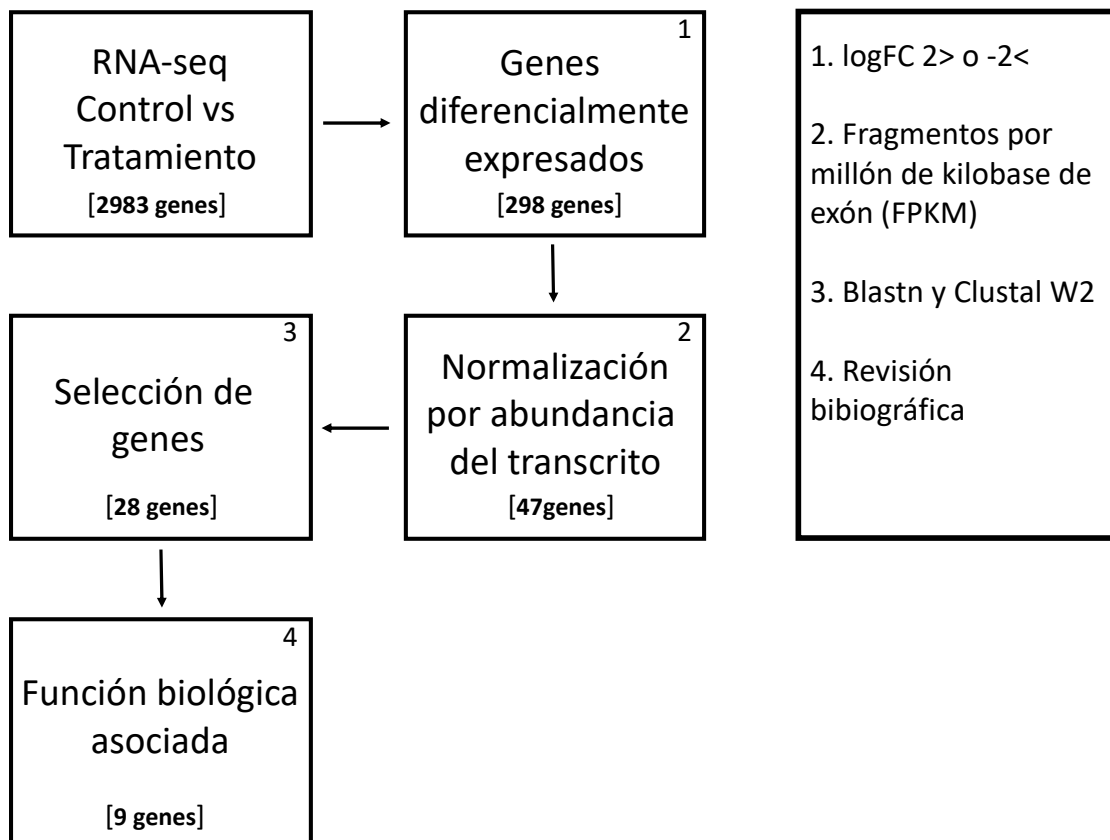


Figura 4-2. Ruta de la metodología utilizada para el análisis de las lecturas obtenidas a partir de la secuenciación de ARN total (ARN-Seq) realizado en pedicelo de la selección línea #23 en el estado fenológico de envero (precosecha) de la temporada 2015/2016.

Diseño de partidores

Los partidores se diseñaron específicamente para cada uno de los genes en estudio utilizando el programa Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) y fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies IDT (Coralville, Iowa, USA). Las secuencias nucleotídicas obtenidas se contrastaron con la base de datos privada mantenida en <http://vitisdb.cmm.uchile.cl/> y posteriormente se descargó el

formato FASTA desde la plataforma Blastn (Centro Nacional para la Información Biotecnológica, USA) para utilizar . Por otra parte, los partidores para el gen control de referencia VvTCPB (T-complex protein 1 subunit beta, GenBank XM 002285876) se obtuvieron de artículos publicados previamente (González-Agüero *et al.* 2013). Cada partidior liofilizado se resuspendió en agua libre de nucleasas a una concentración stock de 100 mM, de la cual se tomó una alícuota para llevarla a una concentración final de 10 mM para realizar los análisis moleculares posteriores.

Curva de calibración

La curva de calibración se generó utilizando el producto purificado con el Kit Wizard SV Gel and PCR Purification Clean-up System (Promega). Se realizaron diluciones seriadas a concentraciones determinadas para obtener una curva de calibración y determinar el límite mínimo de detección del gen usando el equipo LightCycler® 96 (Roche Systems). La reacción de amplificación se realizó con el Kit LightCycler® 480 SYBR® Green I Master (Roche Systems). A partir de este ensayo se obtuvo además la eficiencia de los partidores, su tasa de error y el coeficiente de posición en la curva.

Ensayo de PCR en tiempo real

Se realizaron ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para analizar la abundancia relativa de los transcritos seleccionados para todos los estados

fenológicos previamente señalados. El ensayo qPCR se llevó a cabo usando el equipo LightCycler® 96 (Roche Systems). La reacción de amplificación se realizó con el Kit LightCycler® 480 SYBR® Green I Master (Roche Systems) en un total de 20 µL conteniendo: 10 µL de Buffer, 1 µL de cada par de primers 10uM (sentido y antisentido), 7 µL de H₂O libre de nucleasas y 1 µL de DNA.

Para cada estado fenológico de cada variedad de planta y tomando en cuenta las condiciones control y tratamiento se utilizaron tres réplicas biológicas y dos réplicas técnicas.

Los valores obtenidos del ensayo de expresión relativa de cada gen se obtuvieron mediante el método $\Delta\Delta C_t$ (Livak y Schmittgen 2001). La normalización de los valores fue normalizada mediante el uso del gen control TCPB, el que codifica una proteína putativa, la subunidad β del complejo proteico T y a su vez se tomó el punto fenológico de envero control como referencia para una segunda normalización de la expresión relativa del gen.

Las condiciones para los ciclos son: desnaturalización a 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos con repetición de tres pasos: desnaturalización a 95°C durante 10 segundos, alineamiento de primers (62-68°C) por 15 segundos y extensión a 72°C durante 15 segundos. El paso final corresponde a la elaboración de la curva de denaturación a partir de un ciclo único que incluye: 5 segundos de denaturación

a 95°C, 15 a 60°C y a partir de este punto un aumento sostenido de 0.2°C hasta alcanzar los 98°C.

Los datos de fluorescencia fueron recolectados después de cada paso de extensión y las curvas de denaturación permitieron verificar peaks únicos para el producto amplificado. Los tamaños de los productos de amplificación fueron verificados por electroforesis en gel de agarosa 1.5% para asegurar la ausencia de productos inespecíficos. La fluorescencia fue analizada por medio del programa LightCycler™ (Roche Diagnostics) y se realizó un ajuste manual de la línea de base.

Análisis estadístico

Los datos recabados fueron sujetos a análisis estadístico de varianza multifactorial (tratamiento y estado fenológico) aplicando un Test de Tukey esto implica que se separaron mediante el test LSD a un 5% de los niveles de significancia (ANOVA > 0.05 p-value) usando RStudio™ (Fundación R para Computación Estadística, Viena, Austria) y los gráficos fueron realizados usando el paquete ggplot2 (Wickham 2016).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterización fisiológica del pedicelo en cepas susceptibles y no susceptibles a desgrane por tratamiento con ácido giberélico

El desarrollo fisiológico del pedicelo se evaluó en ambas variedades con la medición de su grosor y largo con el fin de observar y corroborar diferencias morfológicas en la respuesta a la aplicación de ácido giberélico. Para llevar a cabo estas mediciones comparativas se utilizaron en total 32 racimos para cada estado fenológico, correspondientes a 16 racimos por variedad de los cuales 8 fueron tratados con ácido giberélico y 8 no presentan tratamiento alguno (control).

En conjunto a las mediciones se realizó el seguimiento de otros parámetros (datos no presentados) como la acidez, la acumulación de azúcares (°Brix), la textura y firmeza con el fin de determinar correctamente un estado fenológico similar dentro del estudio.

Se puede observar en la Figura 5-1 y Figura 5-2 que tanto en Thompson Seedless como en la línea de selección #23 el pedicelo presentó un crecimiento tanto de largo como de grosor en ambas, confirmando el aumento de la estructura por el tratamiento con ácido giberélico. Los resultados observados a lo largo del desarrollo fisiológico de ambas variedades de uva de mesa muestran un crecimiento acorde a la aplicación del tratamiento con la fitohormona; si bien se observó una variación entre puntos del muestreo esto debe estar sujeto a la aleatoriedad de la colecta del

material vegetal. Al observar cada punto por separado se aprecia una significancia en cada punto control respecto al tratamiento tanto en grosor como largo.

La información obtenida señala que la Línea de selección #23 tiende a tener un menor grosor y un largo mayor al comparar con Thompson Seedless.

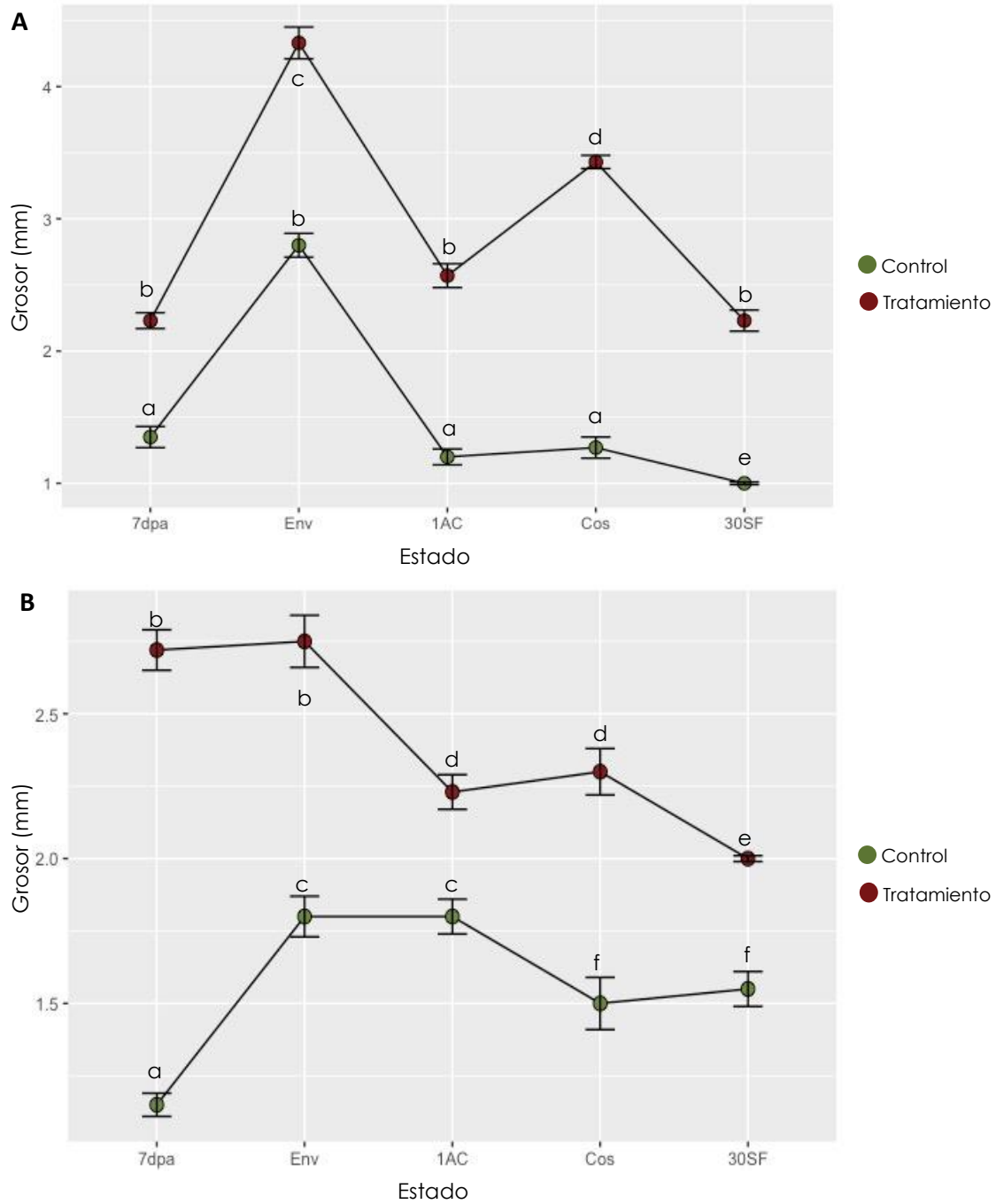


Figura 5-1. Medición del grosor del pedicelo en la cosecha 2016/2017 en la variedad de uva de mesa Thompson Seedless (A) y en la selección Línea 23 (B), ambos genotipos fueron tratados (GA_3) o no (Control) con ácido giberélico. Análisis realizado 7 días posaplicación de GA_3 (7dpa), envero (Env), 1 semana antes de cosecha (1AC), cosecha (Cos) y posteriormente a 30 días de guarda en frío (30SF). Diferentes letras entre el estado fenológico y tratamiento representan diferencias significativas con $p < 0.05$ por test de Tukey.

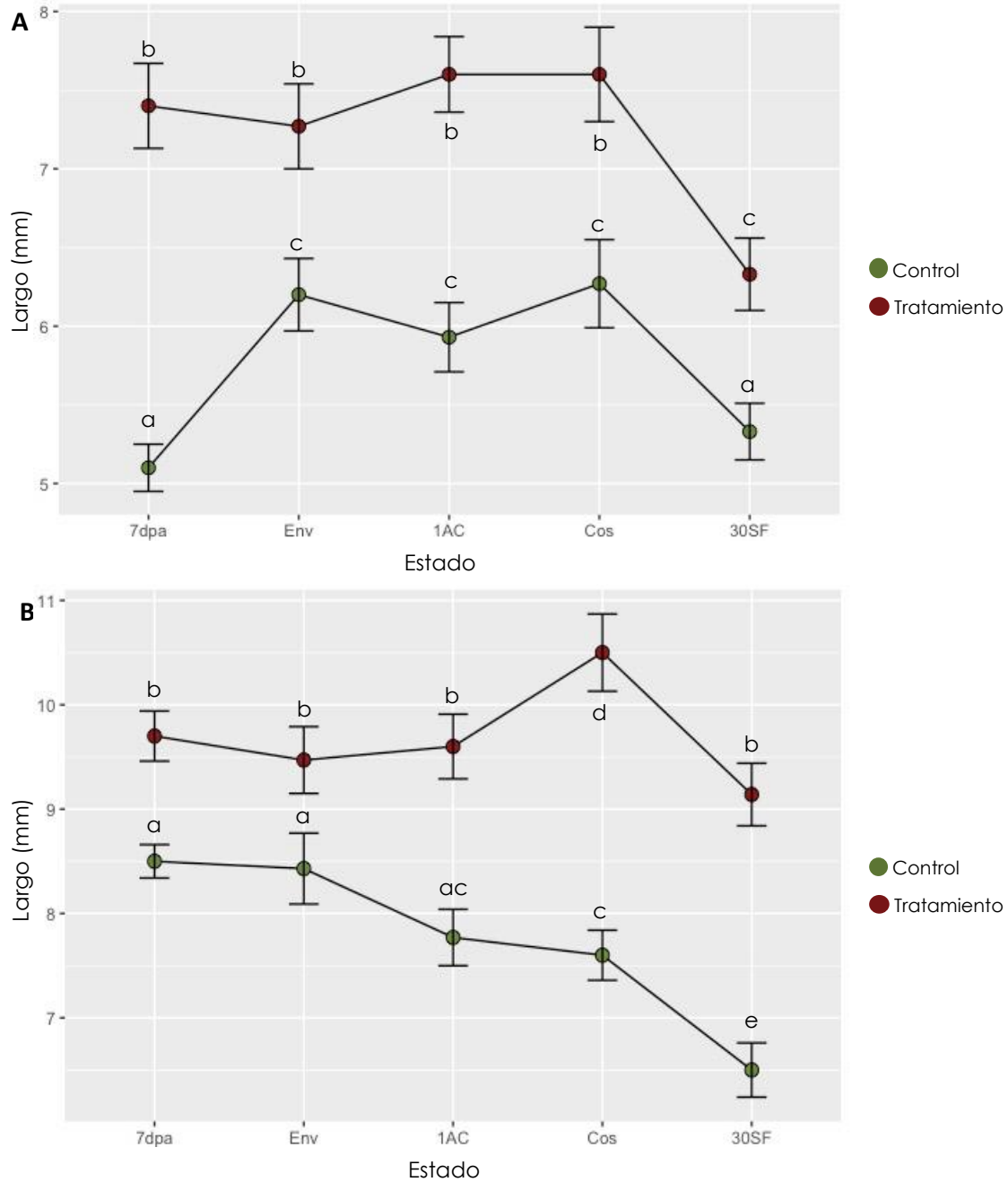


Figura 5-2. Medición del largo del pedicelo en la cosecha 2016/2017 en la variedad de uva de mesa Thompson Seedless (A) y en la selección Línea 23 (B), ambos genotipos fueron tratados (GA_3) o no (Control) con ácido giberélico. Análisis realizado 7 días posaplicación de GA_3 (7dpa), envero (Env), 1 semana antes de cosecha (1AC), cosecha (Cos) y posteriormente a 30 días de guarda en frío (30SF). Diferentes letras entre el estado fenológico y tratamiento representan diferencias significativas con $p < 0.05$ por test de Tukey.

Para la medición del porcentaje de desgrane los racimos fueron agitados durante 30 segundos a una fuerza constante y posteriormente se tomó el peso de las bayas desprendidas, esto se comparó con el peso total del racimo recolectado. Esto se realizó tanto en cosecha como después del periodo de almacenamiento en frío.

Se observó (Figura 5-3) que la selección Línea #23 es más propensa a presentar desgrane, pero sólo en respuesta a la aplicación de ácido giberélico y que el desgrane aumentó significativamente respecto al control y aún más después del almacenamiento en frío, éste tendría un mayor impacto en el porcentaje del fenómeno. Si bien Thompson Seedless también presentó una respuesta al tratamiento, la tasa de desgrane es mucho menor y se encuentra dentro de los límites comerciales aceptados: 5% sobre el total del peso de racimo.

Todos los parámetros fisiológicos: largo, grosor y porcentaje de desgrane se encuentran cuantificados en la Tabla 5-1 tomando en cuenta las respectivas variedades de plantas y su estado fenológico.

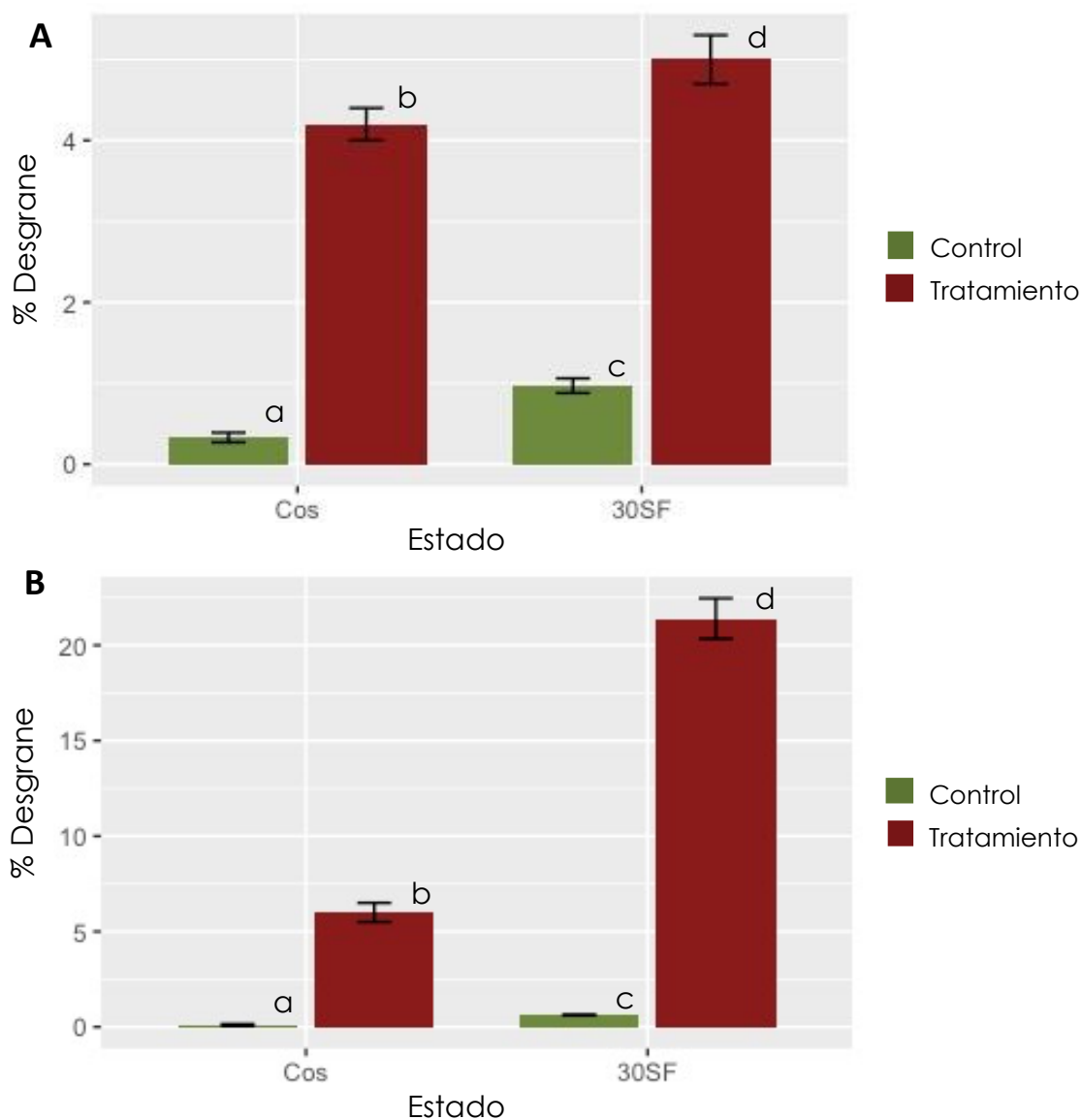


Figura 5-3. Medición en cosecha 2016/2017 del desgrane en la variedad de uva de mesa Thompson Seedless (A) y en la selección Línea 23 (B), ambos genotipos fueron tratados (GA_3) o no (Control) con ácido giberélico. Análisis realizado en cosecha (Cos) y posteriormente a 30 días de guarda en frío (30SF). Diferentes letras entre el estado fenológico y tratamiento representan diferencias significativas con $p < 0.05$ por test de Tukey.

Tabla 5-1. Datos recolectados a partir de caracterización fisiológica en pedicelo. Se describe los valores de grosor (mm), largo (mm) y desgrane (porcentaje) para los diferentes puntos de muestreo: 7 días posaplicación de GA₃ (7dpa), envero (Env), 1 semana antes de cosecha (1AC), cosecha (Cos) y posteriormente a 30 días de guarda en frío (30SF).

Variedad	Tratamiento	Punto de muestreo	Grosor (mm)	Largo (mm)	Desgrane (%)
Thompson Seedless	Control	7 dpa	1.4 ± 0.2	5.2 ± 0.6	-
		Env	2.8 ± 0.2	6.3 ± 0.9	-
		1AC	1.2 ± 0.1	5.9 ± 0.9	-
		Cos	1.3 ± 0.1	6.3 ± 1.1	0.3 ± 0.0
		30 SF	1.0 ± 0.0	5.4 ± 0.7	1.0 ± 0.1
	GA ₃	7 dpa	2.3 ± 0.1	7.4 ± 0.9	-
		Env	4.3 ± 0.4	7.3 ± 1.1	-
		1AC	2.6 ± 0.2	7.6 ± 0.9	-
		Cos	3.4 ± 0.1	7.6 ± 1.1	4.1 ± 0.3
		30 SF	2.3 ± 0.1	6.3 ± 1.0	4.5 ± 0.5
Línea #23	Control	7 dpa	0.8 ± 0.1	8.5 ± 0.2	-
		Env	1.8 ± 0.2	8.4 ± 0.7	-
		1AC	1.8 ± 0.2	7.8 ± 0.5	-
		Cos	1.5 ± 0.3	7.6 ± 0.4	0.4 ± 0.0
		30 SF	1.6 ± 0.2	6.5 ± 0.5	1.2 ± 0.1
	GA ₃	7 dpa	2.9 ± 0.3	9.6 ± 0.6	-
		Env	3.0 ± 0.4	9.5 ± 0.7	-
		1AC	2.2 ± 0.2	9.6 ± 0.6	-
		Cos	2.3 ± 0.3	10.5 ± 0.8	6.1 ± 1.2
		30 SF	2.0 ± 0.0	9.1 ± 0.7	21.6 ± 2.7

5.2. Identificación de genes candidatos a partir de análisis transcriptómico en pedicelo en genotipo susceptible al desgrane por tratamiento con ácido giberélico

Para realizar el análisis transcriptómico se utilizaron extractos de ARN total (método *Hot Borate*) a partir de material vegetal de la temporada 2015/2016 se envió a Macrogen Inc. (Corea del Sur) para su secuenciación masiva mediante el sistema Illumina HiSeq® 3000. La preparación de las librerías se realizó por fragmentación aleatoria de la muestra de ADNc en conjunto con la ligación de adaptadores 5' y 3' en un solo paso, lo que aumenta enormemente la eficiencia del proceso de preparación de las librerías y se utilizó el TruSeq RNA Sample Prep Kit v2. Los fragmentos ligados con adaptadores posteriormente son amplificados por PCR y purificados en gel.

Una vez realizada la secuenciación se asignó una puntuación Q de 30 (Q30) como base para lecturas de buena calidad, siendo esto equivalente a la probabilidad de 1 lectura de base incorrecta cada 1000bp; esto significa que la precisión de una base correcta corresponde al 99.9%. Cuando la calidad de la secuenciación llega a Q30, las lecturas serán fidedignas, con baja probabilidad de errores y ambigüedades, por lo que, el Q30 se considera un punto de referencia para la calidad en la secuenciación. Q20 da cuenta de un porcentaje más bajo de identidad (99% de precisión), por lo que no es considerado como referente (Wenger *et al.*, 2019).

Las puntuaciones de Q bajas pueden aumentar las llamadas variantes falsas positivas, lo que puede dar lugar a conclusiones inexactas y costos más altos para los experimentos de validación (Ewin 1998). En todas las muestras se obtuvo un valor cercano al 90% de puntuación en Q30 (Figura 5-4), corroborando una calidad adecuada de las lecturas para pasos posteriores.

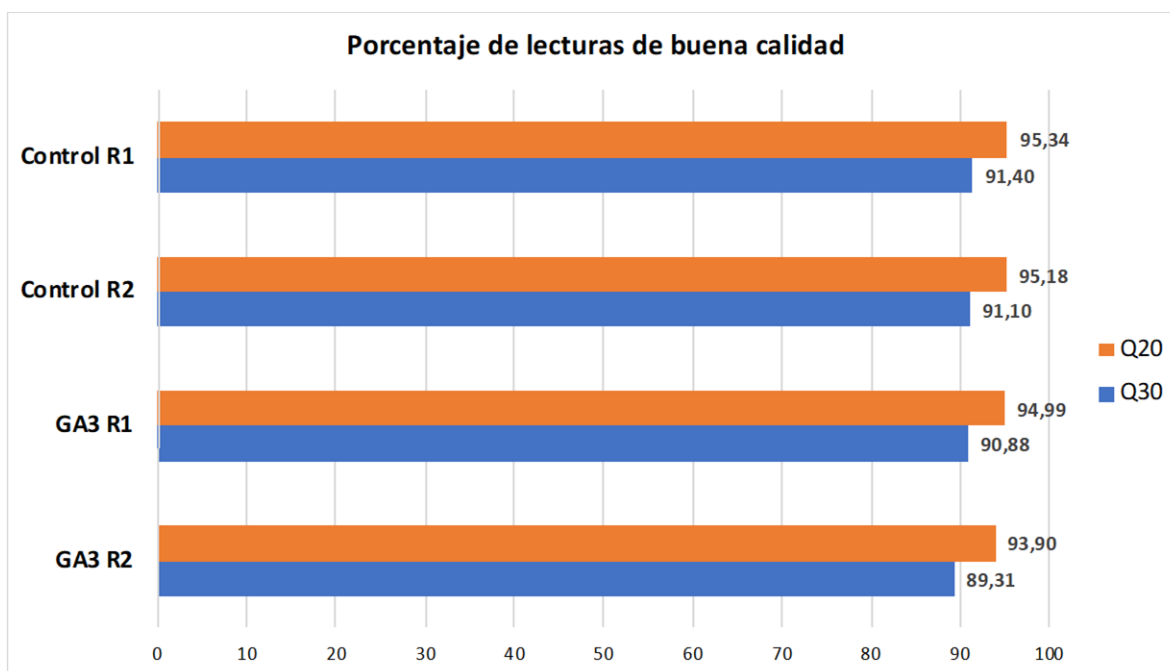


Figura 5-4. Puntuación Q20/Q30 a partir de lecturas crudas obtenidas en la secuenciación de las muestras del estado fenológico de Envero tanto para control (réplica 1 y 2) como para el tratamiento GA₃ (réplica 1 y 2).

Los datos recibidos fueron alineados al genoma de referencia de la secuenciación de *Vitis vinifera* realizada por medio de genotipificación casi homocigota de PN40024 creada por el INRA de Colmar por medio de secuenciación global (Whole Genome Shotgun) dando lugar a una cobertura mínima de 12 equivalentes del

genoma. Este genoma posee un tamaño estimado de 475Mb y se encuentra disponible en la plataforma de Genoscope.

Un total de 4 librerías fueron obtenidas a partir de las 2 réplicas biológicas obtenidas tanto para muestras de pedicelo en envero con y sin tratamiento (fitohormona). En los pedicelos no tratados con GA₃ (Control 1 y 2) se obtuvo una lectura total (bp) de $3.158.018 \pm 155.107.969$ pares de bases y en el caso del tratamiento con la hormona (GA₃ 1 y GA₃ 2) el total de lecturas fue de $3.344.826.933 \pm 90.189.635$ pares de bases con una longitud de las lecturas correspondiente a un largo de 126 pares de base. Las lecturas de buena calidad fueron evaluadas por medio del programa FastQC (Andrews 2010) con el objetivo de corroborar la calidad para análisis posteriores. En conjunto el programa Cutadapt (Martin 2010) encontró y eliminó las secuencias de adaptadores, cebadores, colas poli-A y otro tipo de secuencias no deseadas de las lecturas de la secuenciación.

Después de depurar las lecturas de mala calidad se observó una pérdida del 0.3% para el caso de Control 1, Control 2 y GA₃ 1 del total de las lecturas obtenidas y un 0.7% para el caso de GA₃ 2 (Tabla 5-2). Del total de todas estas lecturas alrededor de un 90% fueron mapeadas como únicas o múltiples (Tabla 5-3) y fueron utilizadas para identificar diversos genes a partir del genoma de referencia.

Tabla 5-2. Resumen de la calidad de lecturas tomando en cuenta el total de las 4 librerías.

Librería	Total lecturas (bp)	Total lecturas	Lecturas utilizables	%
Control 1	3.267.695.970	25.934.095	25.862.989	99.7
Control 2	3.048.340.176	24.193.176	24.129.470	99.7
GA ₃ 1	3.408.600.636	27.052.386	26.977.965	99.7
GA ₃ 2	3.727.462.284	29.583.034	29.373.730	99.3

Tabla 5-3. Resumen de la distribución de lecturas del mapeo considerando las lecturas utilizables.

Librería	Lecturas únicas	%	Lecturas multi-mapeo	%	Total lecturas mapeadas	%
Control 1	22.264.163	87.5	705.371	2.7	23.329.534	90.2
Control 2	21.171.568	87.7	659.400	2.7	21.830.968	90.5
GA ₃ 1	24.210.432	89.7	723.520	2.7	24.933.952	92.4
GA ₃ 2	26.161.941	89.1	788.997	2.7	26.950.938	91.8

Una vez alineadas las lecturas de buena calidad obtenidas del análisis transcriptómico con el genoma de referencia PN40024 se obtuvo un total de 2983 genes diferencialmente expresados (1602 sobreexpresados y 1381 reprimidos), posterior a esto se procedió a filtrar acorde a un logaritmo de tasa de veces de cambio (logarithmic fold change) de 2 para obtener genes que estuviesen significativamente diferenciados en su nivel de expresión; esta comparación se realizó tomando en cuenta la diferencia de dichos niveles entre control vs. tratamiento, es decir, observando que tan sobreexpresado o reprimido se encuentra

un gen por tratamiento respecto al control (sin tratamiento). Una vez filtrados se obtuvo un total de 298 genes (180 sobreexpresados y 118 reprimidos).

Los genes seleccionados fueron normalizados por los fragmentos por kilobase de millón de exón (FPKM) obteniéndose la abundancia relativa del transcrito al arrojar una variable cuantitativa entre librerías, tomando en cuenta el número de lecturas de exón por millón y el largo del transcrito. Se redujo la lista a 47 genes (25 sobreexpresados y 22 reprimidos). A partir de estos genes se realizó el alineamiento de secuencias de tipo local por medio de Blastn y Blastx (ADN y proteínas, respectivamente), comparando la secuencia problema (query) contra una gran cantidad de secuencias que se encuentran en la base de datos de GenBank, esto con el fin de obtener una mayor profundización en las secuencias previamente obtenidas mediante Genoscope, en conjunto se utilizó el programa de análisis en línea ClustalW2 para descartar secuencias de tamaño similar que pudiesen corresponder a un mismo gen. Con esto se generó una lista final con 20 posibles genes candidatos (11 sobreexpresados y 9 reprimidos) de los cuales se seleccionaron 10 en total acorde a su función biológica: 6 sobreexpresados y 3 reprimidos para su posterior caracterización mediante ensayo PCR en tiempo real (Tabla 5-4 y Tabla 5-5).

A partir de las lecturas obtenidas mediante el análisis bioinformático se diseñaron los partidores para el posterior análisis molecular tomando en cuenta las secuencias de ADN (formato FASTA) obtenidas a partir de la plataforma privada <http://vitisdb.cmm.uchile.cl/> (Centro de Modelamiento Matemático, Universidad de Chile). Seguidamente se corroboró un correcto alineamiento con su secuencia

target a partir de la plataforma del Centro Nacional para la información Biotecnológica (NCBI) utilizando Blast (Tabla 5-6).

Se utilizó el programa Primer Premier 5.0™ para diseñar la secuencia de oligonucleótidos que hibridasen con su cadena complementaria de ADNc y se descartó la posible formación de horquillas, monómeros y dímeros. Una vez realizado el análisis *in silico* se ordenaron los partidores a IDT (Integrated DNA Technologies, USA).

Tabla 5-4. Lista final de genes seleccionados mediante análisis bioinformático. Se seleccionó un total de 9 genes a partir de análisis transcriptómico en precosecha ($p < 0.05$), correspondiente al estado fenológico de envero.

Abreviación	Código Gene bank	Producto	logFC
VvPAL	XM_002281763.4	Fenilalanina amonioliasa	2,7
VvCCOMT	NM_001281118.1	Cafeoil-CoA O-metiltransferasa	2,5
VvRAP2-3	XM_002272390.3	Factor de transcripción sensible a etileno RAP 2-3	2,2
VvCCR1	XM_002273418.3	Cinamoil-CoA reductasa 1	2,4
VvMETK5	XM_002280070.3	S-adenosilmetionina sintasa 5	3,6
VvLAC12	XM_002273839.4	Lacasa 12	3,2
VvGA2ox8	XM_010646101.2	Giberelina 2-beta-dioxigenasa 8	-2,5
VvDCR	XM_002278765.4	BAHD aciltransferasa DCR	-2,1
VvJMT	XM_002281543.3	Jasmonato O-metiltransferasa	-2,0

Tabla 5-5. Relevancia de genes seleccionados mediante ensayo transcriptómico para la elaboración de perfiles de expresión génica en diferentes estados del desarrollo de uva de mesa, considerando la ruta metabólica y función biológica asociada en pedicelo su posible efecto en el desgrane.

Abreviación	Ruta metabólica	Función biológica asociada en pedicelo
VvPAL	Fenilpropanoides Precursor lignina	Crecimiento pared celular secundaria
VvCCOMT	Fenilpropanoides Precursor lignina	Crecimiento pared celular secundaria
VvRAP2-3	Factor transcripción Respuesta estrés	Inducción muerte celular
VvCCR1	Fenilpropanoides Precursor lignina	Crecimiento pared celular secundaria
VvMETK5	Metionina	Proliferación celular
VvLAC12	Fenilpropanoides Polímero lignina	Crecimiento pared celular secundaria
VvGA2ox8	Regulador crecimiento Inactivación GAs	Inactivación giberelinas biologicamente activas
VvDCR	Cutícula Pólimero cutina	Síntesis de cutina en epidermis de plantas
VvJMT	Regulador crecimiento	Regulación celular y respuesta de defensa

Tabla 5-6. Partidores para los genes previamente seleccionados y diseñados mediante el programa Primer Premier 5™

Abreviación	Secuencia partidores (5'-3')	Tm (°C)	Producto (bp)
VvPAL	s: AAGGTCAGGCAAGTTCTGGTAG a: CCTCTTTGGGCAAAAGGGCCT	66	128
VvCCOMT	s: ATCGGCTACGACAACACCCTCT a: CGTCACCAACCGGAAGCATACA	66	160
VvRAP2-3	s: AAGCAGCGAGCGAGTTGGAGTT a: GAGGGTGAGTGGAAGCAAGGTC	68	156
VvCCR1	s: ATTGGTATTGTTACGGAAAGGCG a: TGGATTGAAGCAATGGTCCTAG	64	120
VvMETK5	s: CATCTTCCATCTCAACCCATCA a: CCCAGCCACCGTAAGTGTCAA	64	104
VvLAC12	s: GCACCATTTGACAATACTACCAC a: CCGTGTCAATTGAAAGCAGGCAA	66	121
VvGA2ox8	s: CGTGGATGAATGTGAACTACCG a: CTCACGATGAATCCTGGACAAA	64	169
VvDCR	s: CCACAATTGCTTCAAACAGTTCT a: TCCGTCTGCGAGTTCCGTGA	64	103
VvJMT	s: CTCCATACTATGCACCAAGTCC a: CCATCACCTCCATCCCAATCTA	62	112

Se utilizó templado de pedicelos recolectados en el estado fenológico de envero para confirmar la presencia del gen en estudio y su correcta temperatura de alineamiento. Se realizó una PCR convencional a distintas temperaturas y el amplicón obtenido se observó posteriormente en un gel de agarosa al 1,5%; en la Figura 5-5 se observa la amplificación de los genes analizados durante este estudio.

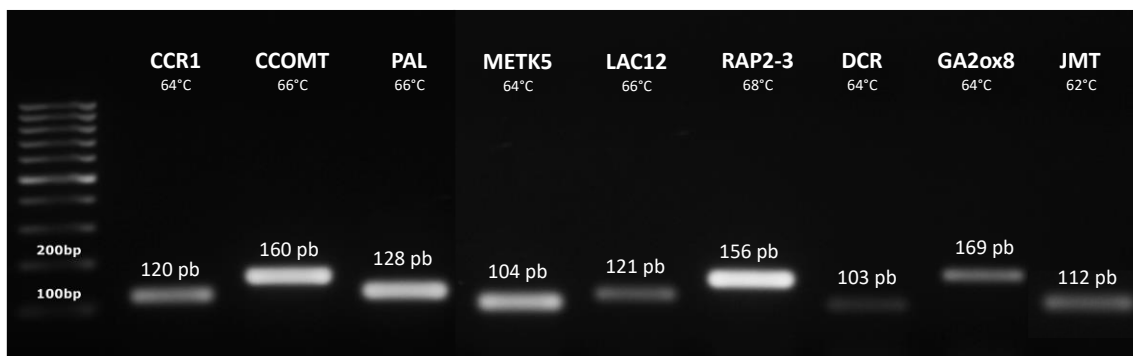


Figura 5-5. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para comprobar por medio de PCR convencional la presencia y correcta temperatura de alineamiento de los partidores en muestras de pedicelo correspondientes al estado fenológico de envero.

En paralelo al estudio bioinformático se realizó la extracción del ARN total por triplicado (método *Hot Borate* modificado) a partir de pedicelo para los distintos estados fenológicos de la temporada 2017/2018. La calidad del ARN total se observó por medio del espectrofotómetro Picodrop™ y fue cuantificado con fluorómetro Qubit® 2.0 mediante el Kit RNA BR Assay para realizar diluciones y obtener ADNc. Así mismo se observó la integridad del ARN total en gel denaturante agarosa-formaldehído al 1,5%.

Se comprobó una alta efectividad del protocolo de extracción con altas concentraciones de ARN total (1000 – 2000 ng/uL) y alta pureza ($A_{260/280}$ 1,8 – 2,0). Esto se condice con la información obtenida a partir de electrofóresis del gel denaturante de agarosa (Figura 5-6) en el que se puede apreciar la integridad de las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 18S y 28S.

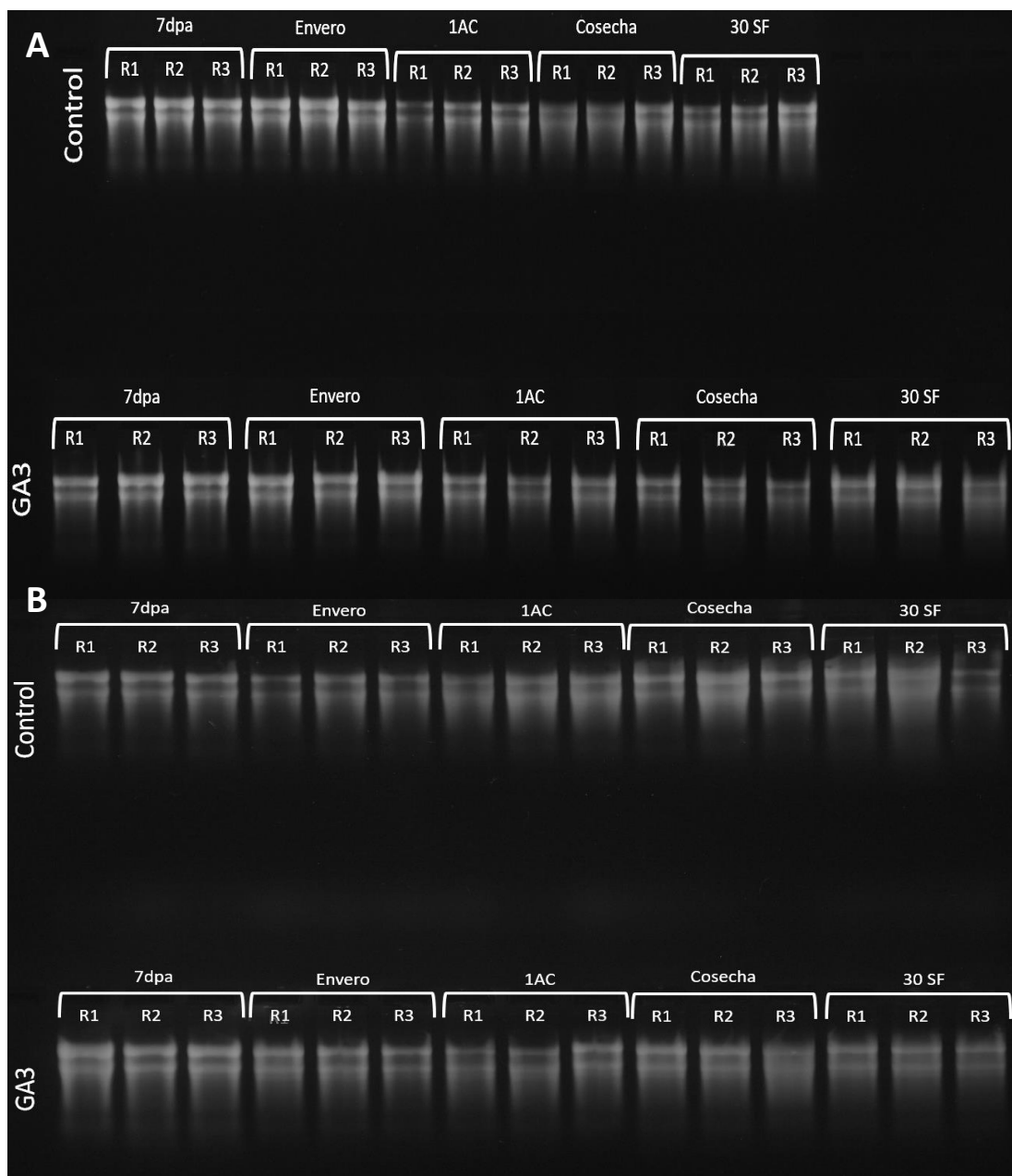


Figura 5-6. Electroforesis en gel denaturante de agarosa al 1,5% para comprobar la correcta extracción del ARN total a partir de la integridad de las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 18S y 28S. El ARN fue obtenido a partir de pedicelos de la variedad de uva de mesa Thompson Seedless (A) y en la selección Línea 23 (B).

Una vez confirmada la calidad y concentración del ARN total obtenido se generó una dilución de aproximadamente 50 ng/uL para posteriores aplicaciones y el resto

fue almacenado a -80°C . En las diluciones obtenidas se realizó un ensayo de PCR mediante transcriptasa inversa (RT-PCR) para la obtención de ADN complementario (ADNc) por la amplificación de ARNm al utilizar partidores oligo (dT) que se alinean a la cola poli A de manera general. Una vez finalizado se comprobó la concentración obtenida y los parámetros de pureza de la misma forma descrita para el ARN, además se corrió un gel de agarosa (Figura 5-7) para observar el ADN amplificado.

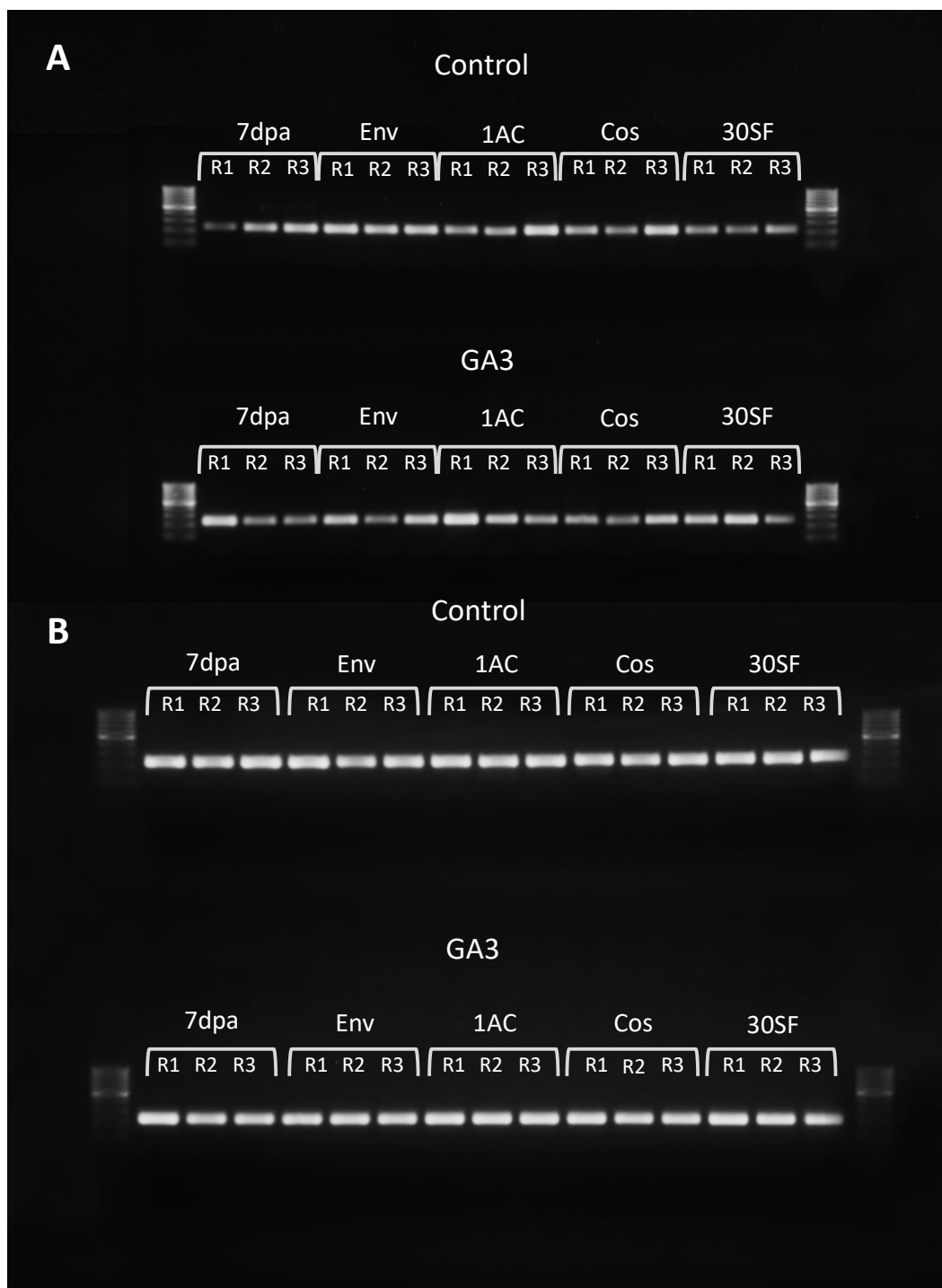


Figura 5-7. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para comprobar la correcta obtención ADNc de a partir de RT-PCR. El ADNc fue obtenido a partir del ARN total extraído de pedicelos de la variedad de uva de mesa Thompson Seedless (A) y en la selección Línea 23 (B).

5.3. Validación de la expresión en genes seleccionados en genotipos susceptibles al desgrane por tratamiento con ácido giberélico en su desarrollo fenológico

Para la validación de los 9 genes restantes se estudiaron los niveles de expresión en diferentes estados fenológicos (7 días post-aplicación de hormona, envero, 1 semana antes de cosecha, cosecha y 30 días después del almacenamiento en frío), utilizando la variedad Thompson Seedless y la línea de selección #23.

A partir del ADNc obtenido por RT-PCR se prosiguió a cuantificar mediante PCR en tiempo real con el software LightCycler Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) usando SYBR Green™ como colorante fluorescente. Para este ensayo se utilizaron 3 réplicas biológicas con una réplica técnica como duplicado (N=6).

Los niveles de expresión de cada gen y para todas las muestras fueron evaluados por el número de ciclos de umbral (Ct) necesarios para que la fluorescencia relacionada con la amplificación alcance un umbral de detección específico. El punto de cruce para cada reacción se determinó usando el algoritmo de la segunda derivada y con el ajuste manual de la línea base y los valores de Ct se transformaron en cantidades utilizando una curva estándar. Dicha curva se generó utilizando el producto amplificado en cada gen, el que fue purificado con el QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN N.V., Hilden, Germany); a partir de este ensayo se obtuvo

además eficiencia de los partidores, su tasa de error y el coeficiente de determinación de la curva (Tabla 5-7).

La normalización de los niveles de expresión en todos los experimentos se realizó contrastando la expresión del gen en estudio con el gen de referencia vVTCBP y posteriormente contrastándolo con el valor de envero-control para tener como referencia la expresión relativa del gen. Los datos de la fluorescencia fueron recolectados para cada paso de la amplificación y para corroborar la especificidad del producto final obtenido se realizó una curva de melting en todas las muestras.

Tabla 5-7. Eficiencia de los partidores, tasa de error y coeficiente de determinación (R^2) obtenidos a partir de la curva de calibración generada para cada gen por ensayo PCR en tiempo real.

TS	Eficiencia	Error	R^2
PAL	1,84	0,13	1,00
CCOAMT	1,79	0,22	1,00
RAP 2-3	1,75	0,33	1,00
CCR1	1,79	0,38	1,00
METK5	1,80	0,33	1,00
LAC 12	1,88	0,20	1,00
GA2ox8	1,86	0,15	1,00
DCR	1,71	0,22	1,00
JMT	2,04	0,38	0,99
L#23	Eficiencia	Error	R^2
PAL	1,73	0,34	0,99
CCOAMT	1,77	0,30	1,00
RAP 2-3	1,77	0,27	1,00
CCR1	1,91	0,10	1,00
METK5	1,71	0,26	1,00
LAC 12	1,89	0,25	1,00
GA2ox8	1,68	0,37	1,00
DCR	1,88	0,15	1,00
JMT	2,04	0,38	0,99

Los niveles cuantificados se ven reflejados para todo el desarrollo fenológico, los que corresponden a: 7 días posaplicación del regulador de crecimiento (7dpa), envero (Env), 1 semana antes de cosecha (1AC), cosecha (Cos) y 30 días de salida en guarda de frío (30SF). Esto se realizó tanto en Thompson Seedless como en la Línea de selección 23 , así como control y tratamiento (GA).

El gen PAL codificante para la fenilalanina amonioliase (Figura 5-8) muestra un patrón de expresión con un aumento significativo en el período de poscosecha tanto en Thompson Seedless como Línea #23, pero no se aprecia una tasa de veces de cambio distintiva entre ambas variedades. Es más, se observa una similitud en el seguimiento de la expresión a lo largo de todo el desarrollo fenológico.

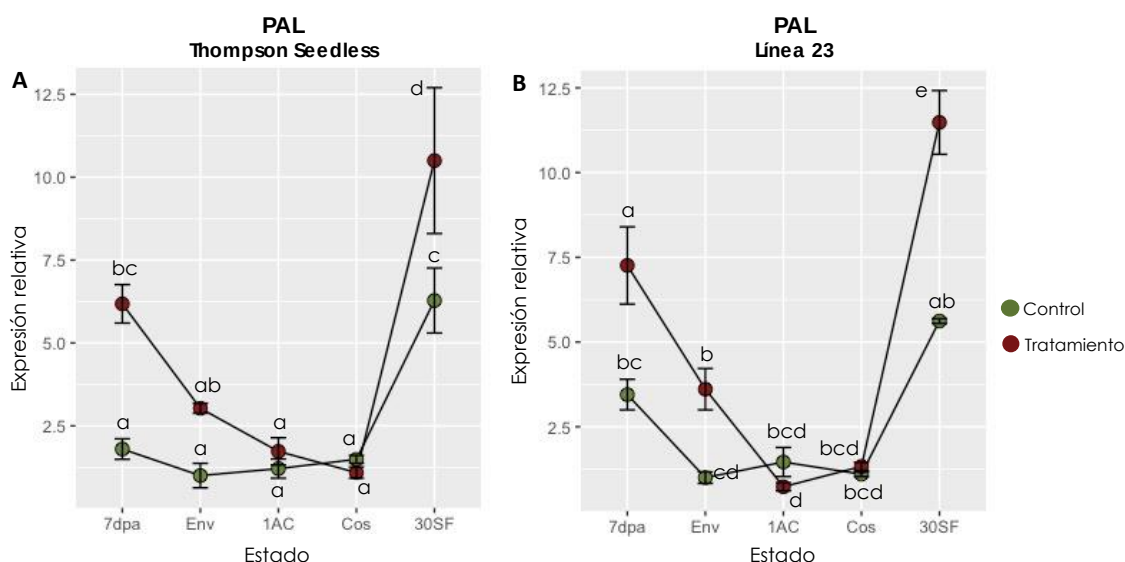


Figura 5-8. Expresión relativa en Thompson Seedless (A) y Línea 23 (B) del gen Fenilalanina amonioliase (PAL). La expresión fue normalizada por medio del gen TCPB y posteriormente contrastada con la expresión del punto envero control. Diferentes letras entre el estado fenológico y tratamiento representan diferencias significativas con $p < 0.05$ por test de Tukey.

El gen CCOMT codificante para la cafeoil-CoA O-metiltransferasa (Figura 5-9) muestra un patrón de expresión similar a lo largo de su desarrollo fenológico en ambas variedades. Sin embargo, se observa una alza mayor en la expresión del gen por tratamiento en la línea de selección 23 a los 7 días posaplicación y 30 días de salida en frío. Por otra parte, se observa una sobreexpresión distintiva del gen en envero tratado con la fitohormona en Thompson Seedless.

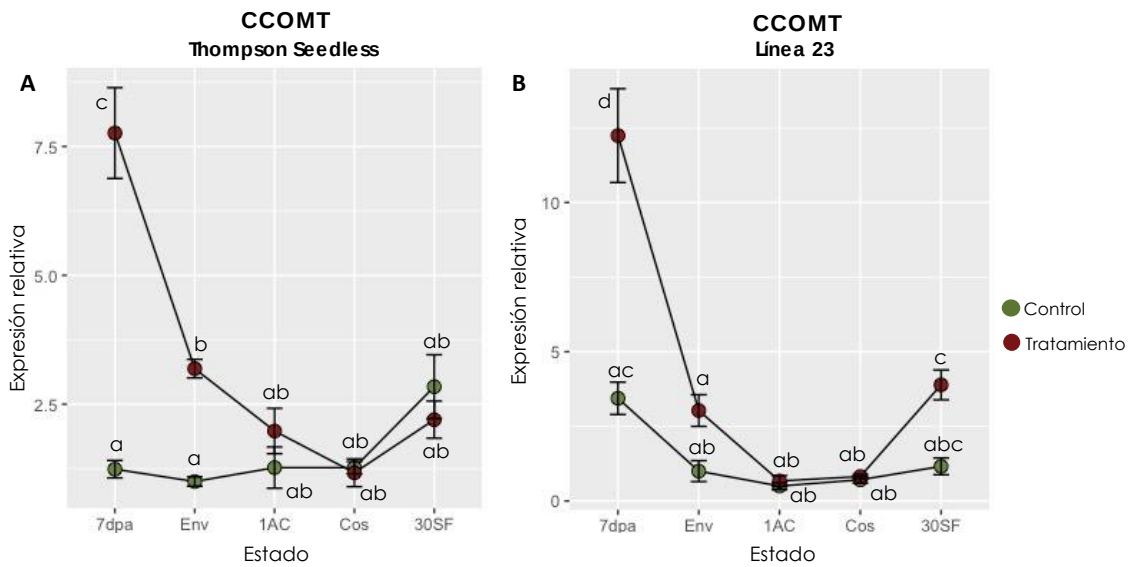


Figura 5-9. Expresión relativa en Thompson Seedless (A) y Línea 23 (B) del gen Cafeoil-CoA O-metiltransferasa (CCOMT). La expresión fue normalizada por medio del gen TCPB y posteriormente contrastada con la expresión del punto envero control. Diferentes letras entre el estado fenológico y tratamiento representan diferencias significativas con $p < 0.05$ por test de Tukey.

El gen RAP2-3 codificante para el factor de transcripción sensible a etileno RAP2-3 (Figura 5-10) muestra una sobreexpresión singular en Thompson Seedless durante las primeras fases de su desarrollo fenológico (7dpa, Env y 1AC) distintivamente en comparación con la línea de selección 23, la que no presenta diferencias significativas en sus niveles de expresión a lo largo de su desarrollo.

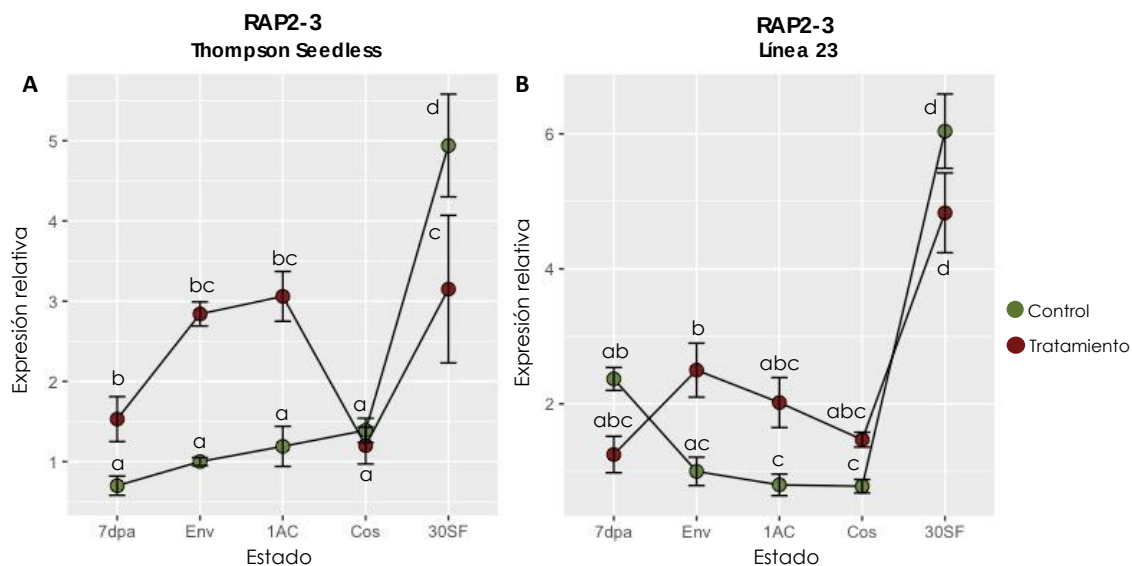


Figura 5-10. Expresión relativa en Thompson Seedless (A) y Línea 23 (B) del gen Factor de transcripción sensible a etileno RAP2-3 (RAP2-3). La expresión fue normalizada por medio del gen TCPB y posteriormente contrastada con la expresión del punto envero control. Diferentes letras entre el estado fenológico y tratamiento representan diferencias significativas con $p < 0.05$ por test de Tukey.

El gen CCR1 codificante para la cinamoil-CoA reductasa 1 (Figura 5-11) si bien simula patrones distintos entre ambas variedades, en realidad el análisis estadístico señala que dichos patrones se asemejan en la mayoría de los estados fenológicos. Se aprecia una sobreexpresión significativa y distintiva entre ambas variedades a los 7 días posaplicación para la línea de selección 23.

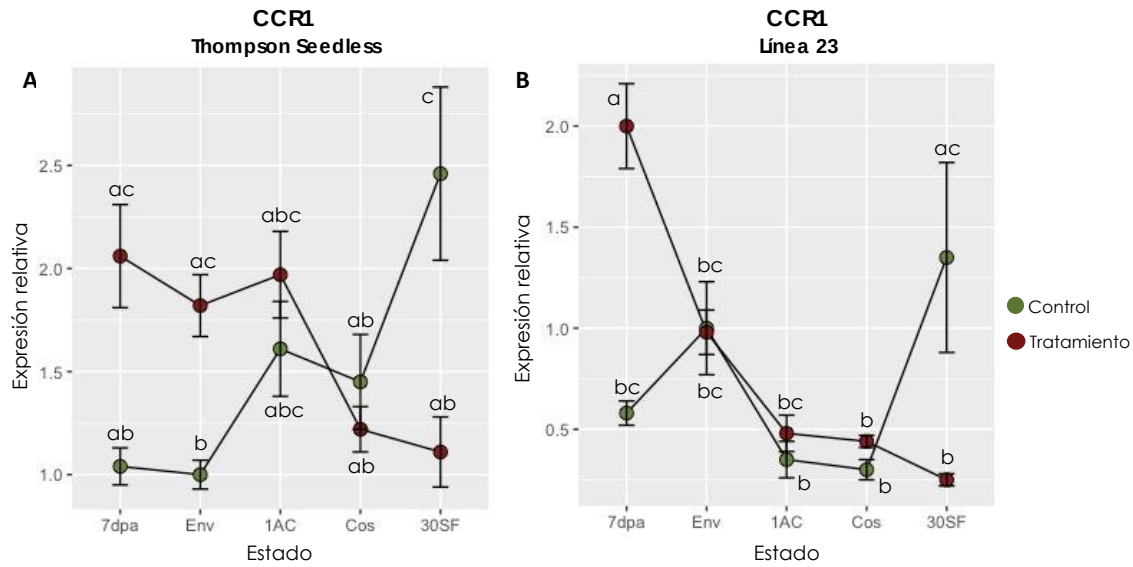


Figura 5-11. Expresión relativa en Thompson Seedless (A) y Línea 23 (B) del gen Cinamoil-CoA reductasa 1 (CCR1). La expresión fue normalizada por medio del gen TCPB y posteriormente contrastada con la expresión del punto envero control. Diferentes letras entre el estado fenológico y tratamiento representan diferencias significativas con $p < 0.05$ por test de Tukey.

El gen METK5 codificante para la S-adenosil sintasa 5 (Figura 5-12) muestra una sobreexpresión inicial a los 7 días posaplicación en ambas variedades, sin embargo se observa un alza mayor en la línea de selección 23, luego de este aumento los niveles de expresión se mantienen constantes. 30 días después del almacenamiento en frío se observa una represión del gen significativa en la variedad Thompson Seedless.

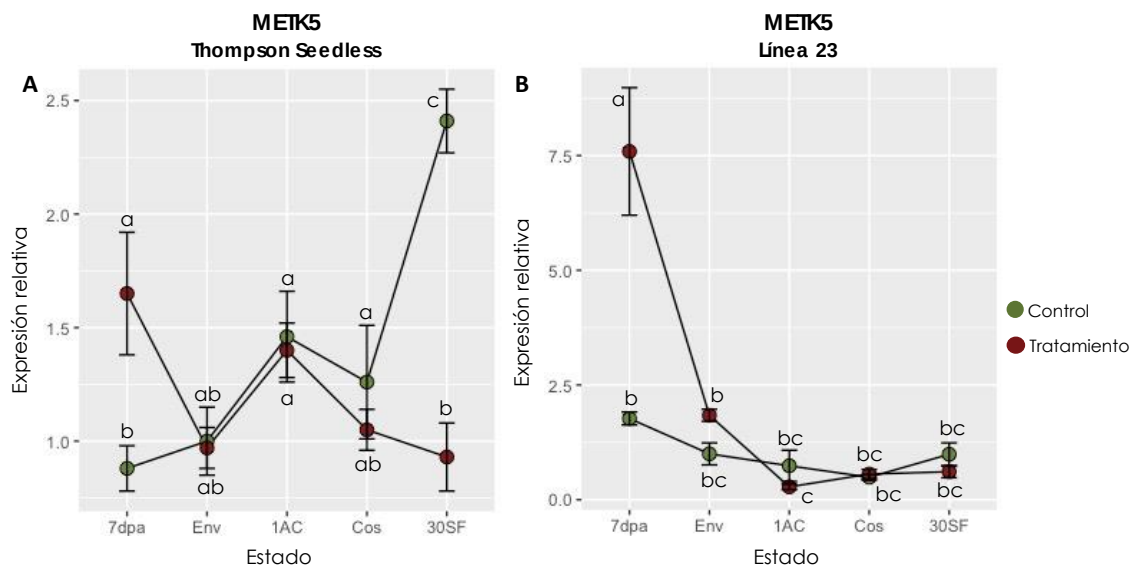


Figura 5-12. Expresión relativa en Thompson Seedless (A) y Línea 23 (B) del gen S-adenosil sintasa 5 (METK5). La expresión fue normalizada por medio del gen TCPB y posteriormente contrastada con la expresión del punto envero control. Diferentes letras entre el estado fenológico y tratamiento representan diferencias significativas con $p < 0.05$ por test de Tukey.

El gen LAC12 codificante para Lacasa 2 (Figura 5-13) muestra un patrón de expresión casi igual en ambas variedades, la principal diferencia radica en una leve tendencia a la sobreexpresión por tratamiento y en control en la línea de selección 23 respecto a Thompson Seedless.

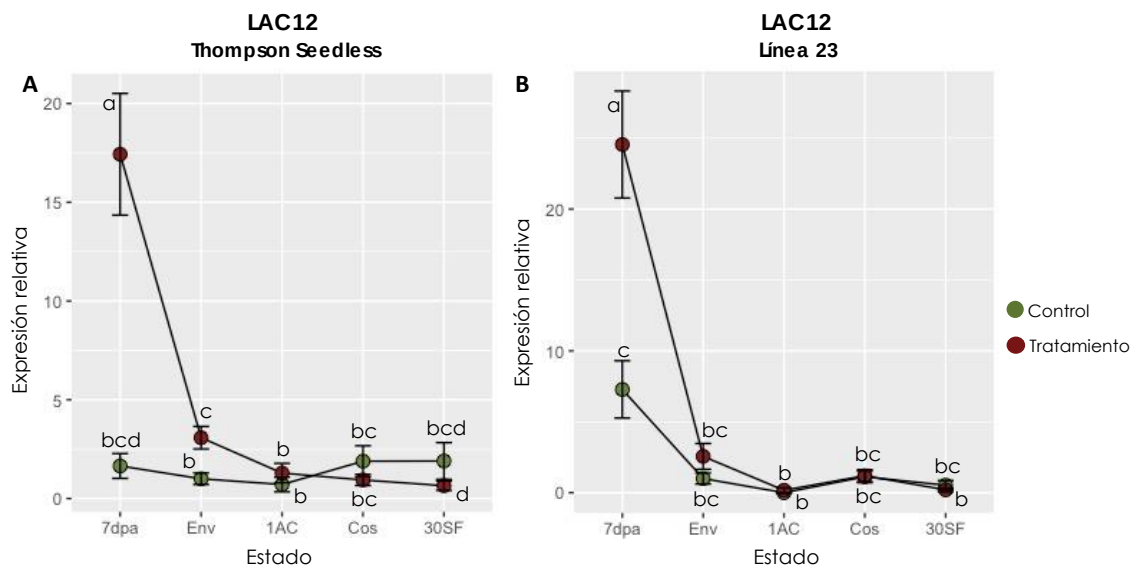


Figura 5-13. Expresión relativa en Thompson Seedless (A) y Línea 23 (B) del gen Lacasa 12 (LAC12). La expresión fue normalizada por medio del gen TCPB y posteriormente contrastada con la expresión del punto envero control. Diferentes letras entre el estado fenológico y tratamiento representan diferencias significativas con $p < 0.05$ por test de Tukey.

El gen GA2ox8 codificante para giberelina 2-beta-dioxigenasa (Figura 5-14) presenta un patrón de expresión con un punto distintivo (1 semana antes de cosecha) en donde el gen reprime su expresión en comparación al control en Thompson Seedless. En la línea de selección 23 se observa un estado sostenido de represión en el gen en tratamiento, en cambio en control se observa una clara diferencia en los estados de cosecha y exacerbándose 30 días posterior al almacenamiento en frío.

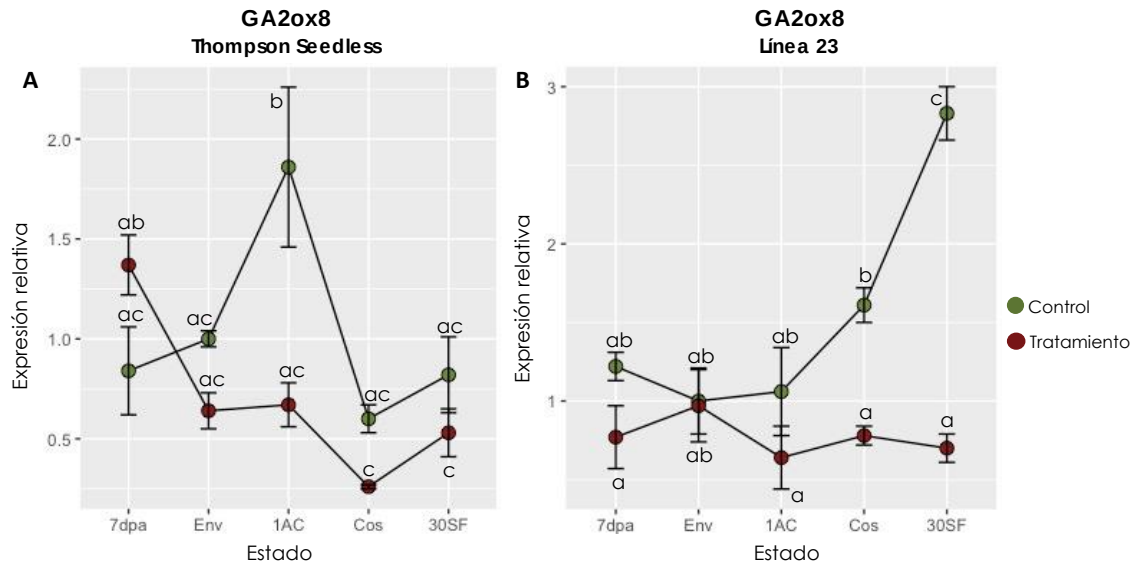


Figura 5-14. Expresión relativa en Thompson Seedless (A) y Línea 23 (B) del gen Giberelina 2-beta-dioxigenasa (GA2ox8). La expresión fue normalizada por medio del gen TCPB y posteriormente contrastada con la expresión del punto envero control. Diferentes letras entre el estado fenológico y tratamiento representan diferencias significativas con $p < 0.05$ por test de Tukey.

El gen DCR codificante para la BAHD aciltransferasa DCR (Figura 5-15) presenta 1 punto significativamente diferenciado en cada una de las variedades de uva. En primer lugar se observa en Thompson Seedless una represión en la expresión del gen a causa del tratamiento a 30 días de salida en frío y en segundo lugar la línea de selección #23 presenta un punto distintivo tras la aplicación de la horma (7 días posterior) en donde el gen se encuentra reprimido.

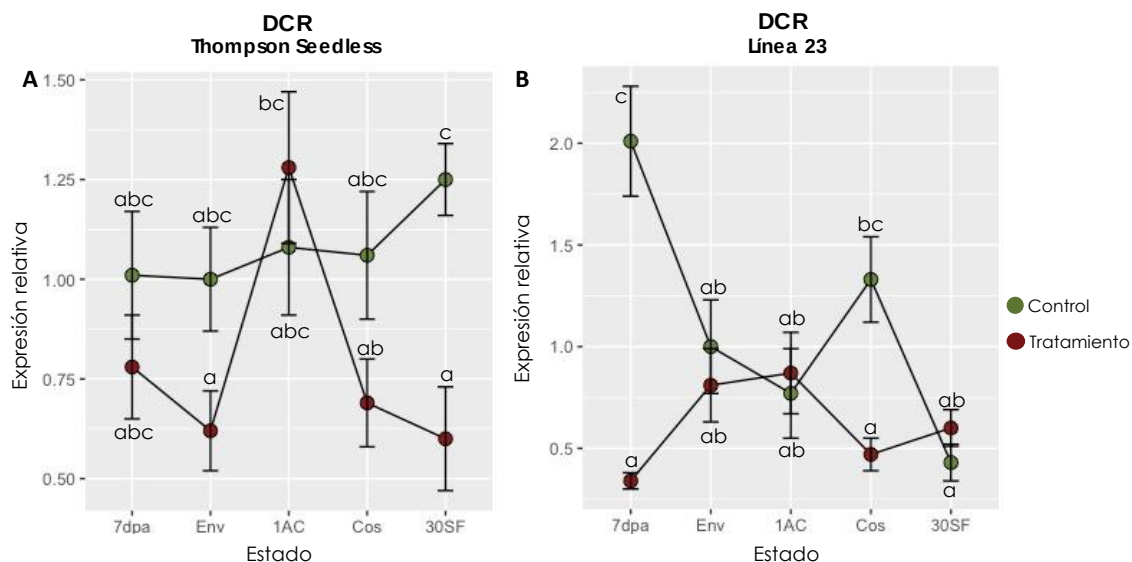


Figura 5-15. Expresión relativa en Thompson Seedless (A) y Línea 23 (B) del gen BAHD aciltransferasa DCR (DCR). La expresión fue normalizada por medio del gen TCPB y posteriormente contrastada con la expresión del punto envero control. Diferentes letras entre el estado fenológico y tratamiento representan diferencias significativas con $p < 0.05$ por test de Tukey.

El gen JMT codificante para la Jasmonato O-metiltransferasa (Figura 5-16) presenta una tendencia a su represión con un patrón muy parecido al tratamiento en Thompson Seedless, se observa además que los niveles de expresión comienzan a decaer tanto en ambos ensayos al llegar a los 30 días de salida en frío. En la línea de selección 23 el patrón se mantiene constante tanto en el control como en tratamiento, pero ocurre una represión significativa posterior a la guarda de 30 días en frío. El punto distintivo entre ambas variedades se presenta a los 30 días salida en frío observándose un mayor nivel de expresión del gen en control L#23 respecto a su tratamiento que en el caso de Thompson Seedless.

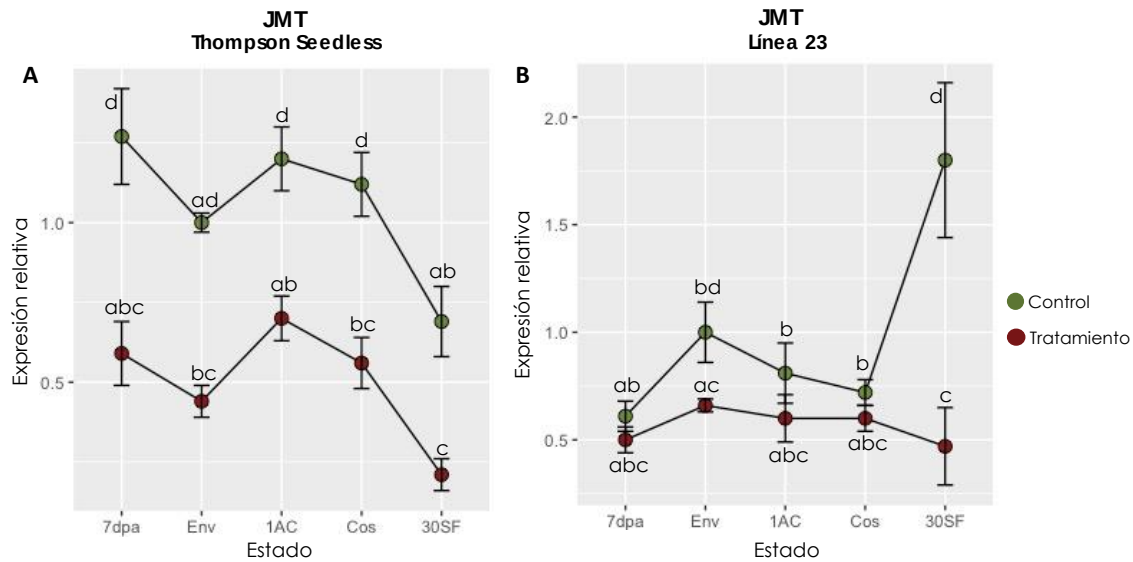


Figura 5-16. Expresión relativa en Thompson Seedless (A) y Línea 23 (B) del gen Jasmonato O-metiltransferasa (JMT). La expresión fue normalizada por medio del gen TCPB y posteriormente contrastada con la expresión del punto envero control. Diferentes letras entre el estado fenológico y tratamiento representan diferencias significativas con $p < 0.05$ por test de Tukey.

La Tabla 5-8 presenta un resumen general de los puntos en los que se observa algún grado de represión y/o sobreexpresión en las distintas variedades y a lo largo de los diferentes estados fenológicos. En el resumen se toma en cuenta la tasa de veces de cambio en la expresión del gen normalizado y respecto al punto de envero en uva de mesa sin tratar con la fitohormona, considerando que éste representa la base para el ensayo transcriptómico y posteriores análisis moleculares.

Tabla 5-8. Resumen de los niveles de expresión relativa en Thompson Seedless (TS) y Línea de Selección #23 (L#23) en todos los genes estudiados. La expresión fue normalizada por medio del gen TCPB y posteriormente contrastada con la expresión del punto envero control. ($p < 0.05$ test de Tukey).

TS	7dpa	Envero	1AC	Cosecha	30SF
PAL	↑↑	↑	–	–	↑↑
CCOMT	↑↑	↑	–	–	–
RAP 2-3	↑	↑	↑	–	↓
CCR1	↑	↑↑	–	–	↓
METK5	↑	–	–	–	↓↓
LAC12	↑↑	↑		–	–
GA2ox8	–	–	↑	–	–
DCR	–	–	–	–	↓
JMT	↓	↓	↓	↓	↓
L#23	7dpa	Envero	1AC	Cosecha	30SF
PAL	↑↑	↑	–	–	↑↑
CCOMT	↑↑	–	–	–	↑
RAP 2-3	–	↑	–	–	–
CCR1	↑↑	–	–	–	↓
METK5	↑↑	–	–	–	–
LAC12	↑↑	–	–	–	–
GA2ox8	–	–	–	↓	↓↓
DCR	↓↓	–	–	↓	–
JMT	–	↓	–	–	↓

↑↑ : Sobreexpresado (Fold Change ≥ 4)

↑ : Sobreexpresado (Fold Change 2 - 4)

– : Sin diferencia (Fold Change ≤ 2)

↓ : Reprimido (Fold Change 2 - 4)

↓↓ : Reprimido (Fold Change ≥ 4)

6. DISCUSIÓN

6.1. Caracterización fisiológica del pedicelo en cepas susceptibles y no susceptibles a desgrane por tratamiento con ácido giberélico

Hoy en día, el análisis ARN-Seq ha ayudado a incrementar la información que se puede obtener a partir de estudios transcriptómicos tanto en cantidad como precisión gracias a su mayor sensibilidad, un rango dinámico alto, menor variación de la técnica y grandes niveles de reproducibilidad (Wang *et al.*, 2008). En este estudio esta técnica fue utilizada para obtener la totalidad de genes que muestran una expresión diferencial al utilizar el tratamiento de la fitohormona ácido giberélico (GA_3); y así, poder seleccionar genes que pudiesen estar directa o indirectamente ligados al fenotipo de desgrane. Así mismo, la viabilidad de este estudio se basó en la disponibilidad de segregantes sin semillas mantenidas bajo las mismas condiciones agroclimáticas ofreciendo una oportunidad única para analizar cambios en el transcriptómico asociado al desgrane, ya que la única varianza establecida a lo largo del ensayo fue el tratamiento (o no tratamiento) con ácido giberélico.

Los resultados observados a lo largo del desarrollo fisiológico de ambas variedades de uva de mesa muestran que el tratamiento con GA_3 genera un crecimiento diferencial en la línea de selección #23 al desarrollar un largo mayor y un grosor menor del pedicelo respecto a la variedad Thompson Seedless. Tomando en cuenta esta tendencia en L#23 tratado con la fitohormona y tomando en cuenta lo que Retamales y Cooper 1993 plantearon respecto a que la rigidización de la estructura

por el tratamiento podría estar involucrada en el desgrane se puede concluir que al presentar una forma más larga y con menor grosor, la resistencia a las fuerzas mecánicas por manipulación podrían influenciar aún más respecto a otras variedades como Thompson Seedless; esto también coincide con la exacerbación del desgrane a la salida de guarda de 30 días en frío, ya que una menor temperatura aumentaría la rigidización de la estructura. En cuanto al porcentaje de desgrane observado durante el ensayo, tanto el punto de medición en cosecha como salida después de 30 días de guarda en frío se comportaron de manera similar ocurriendo un aumento en ambas variedades de uva de mesa al momento de ser tratadas con la fitohormona. Sin embargo, se aprecia en la línea de selección 23 que el fenotipo es notoriamente mayor debido al tratamiento con la fitohormona respecto a su control, presentándose diferencias significativas con la variante menos susceptible al desgrane. En comparación a Thompson Seedless en el punto de cosecha L#23 presenta una tendencia a un mayor porcentaje de desgrane (superando el 5% permitido comercialmente) en cosecha y siendo alrededor de 4 veces mayor al momento de su salida en guarda de frío (21.6%). En conjunto estos resultados corroboran que la línea de selección 23 presenta fenotípicamente una mayor susceptibilidad al desgrane en comparación a otras variedades como en este caso es la contrastante Thompson Seedless, y que una respuesta genotípica podría estar ligada a dicha respuesta. La información condice con una de las publicaciones más recientes de García-Rojas *et al.* (2018) respecto a estudios fisiológicos en pedicelos, en los que se confirma que además de afectar el grosor y largo de la estructura, la aplicación de la fitohormona aumenta la firmeza y rigidez. Dentro de ese estudio se confirmó además que el aumento de la fuerza es mayor posterior a la guarda en frío

posiblemente debido a la pérdida de agua generando una disminución en la flexibilidad del raquis confirmando lo que en un inicio Nakamura y Hori 1981 postularon y es que, la dureza del raquis se asocia a la caída de las bayas en cosecha y poscosecha e intensificándose con el tratamiento de GA₃.

6.2. Identificación de genes candidatos a partir de análisis transcriptómico en pedicelo en genotipo susceptible al desgrane por tratamiento con ácido giberélico

El conjunto de muestras de ARNm aisladas en ambos genotipos (por duplicado) fueron secuenciados independientemente en la etapa seleccionada correspondiente a la fase final (fase III) del desarrollo y crecimiento del pedicelo (estado fenológico de envero), esto es cuando la estructura ha alcanzado su máximo tamaño tanto a nivel morfológico como celular según Douglas y Riggs 2005, por lo que todo tipo de gen que se expresó diferencialmente durante este período representa el efecto particular de la aplicación de la fitohormona.

Los análisis transcriptómicos realizados mediante ensayo ARN-Seq incrementan considerablemente la precisión de la información obtenida entre el gran número de genes que presentaron una expresión diferencial tras el tratamiento con ácido giberélico y permitieron la búsqueda de genes candidatos y la evaluación de sus perfiles de expresión a lo largo del ensayo.

La secuenciación en pares o paired-end permitió secuenciar ambos extremos de un fragmento y generar datos de secuencia alineables de alta calidad. La

secuenciación en pares facilita la detección de reordenamientos genómicos y elementos de secuencia repetitivos, así como fusiones de genes y transcripciones novedosas (Nakato *et al.* 2010). Además de producir el doble de lecturas por el mismo tiempo y esfuerzo en la preparación de la biblioteca, las secuencias alineadas como pares de lectura permiten una alineación de lecturas más precisa y la capacidad de detectar variantes de inserción-eliminación (Nakato *et al.* 2010). Las librerías que se generaron permiten un flujo de trabajo simple gracias a su rango único de tamaño de inserto permitiendo ensamblajes de alta calidad con librerías de inserto cortos, además el sistema HiSeq 3000 aporta un mayor rendimiento en las lecturas obtenidas con una puntuación de Q30 aproximada al 90%, disminuyendo la probabilidad de errores en análisis posteriores y para la validación de los genes (Ye 2016).

La información del estudio del genoma presente en las muestras derivó al análisis comparativo entre los niveles de expresión utilizando los valores de RPKM y la tasa de cambio a escala logarítmica, lo que resultó en la selección de 20 genes diferencialmente expresados. Sin embargo, para la escala de este estudio se utilizaron aquellos que presentaron una relación en su expresión directa o indirectamente relacionada con el crecimiento de estructuras y/o componentes que formen parte del pedicelo en la fase de envero.

El conjunto de las rutas metabólicas que se vieron afectadas están relacionadas a cambios en la conformación y/o composición del pedicelo. De los 9 genes seleccionados y asociados a diferentes vías del metabolismo relacionadas con el

crecimiento y regulación de la estructura del pedicelo mostraron diferentes comportamientos en su expresión de perfil a lo largo del desarrollo fenológico de la vid.

6.3. Validación de la expresión en genes seleccionados en genotipos susceptibles al desgrane por tratamiento con ácido giberélico en su desarrollo fenológico

El gen codificante para la fenilalanina amonioliasa (PAL) es la primera enzima participante en la ruta de los fenilpropanoides y ha demostrado ser una de las principales enzimas que participan en la formación de polímeros de lignina (Feduraev *et al.*, 2021). Ésta muestra un comportamiento casi idéntico en magnitud en ambos fenotipos demostrando cambios de expresión en relación a uva de mesa no tratada corroborando que el tratamiento con la fitohormona afecta la expresión del gen en un inicio y al final del ensayo. Este aumento de la expresión inicial se condice con el aumento documentado en estudios anteriores (Cheng y Marsh 1968) que relacionan un aumento de la actividad de la enzima PAL con un aumento en la lignificación de plantas al aplicar la fitohormona en etapas tempranas (dependiente a la concentración); la sobreexpresión del gen en etapas tardías se podría relacionar a la influencia dependiente a una menor temperatura con el daño causado en la piel de frutas (LaFuente *et al.*, 2001), en este caso en la superficie del pedicelo. Durante el periodo del estudio, este gen no mostró una diferencia distintiva cierta a un fenotipo con mayor tendencia al desgrane.

Se ha demostrado que el gen codificante para CCOMT tiene una participación activa y esencial en la biosíntesis de lignina (Zhong *et al.*, 2000); este efecto se ve reflejado en la sobreexpresión del gen por tratamiento, al estar recién aplicada la fitohormona observándose aún más en la Línea de Selección #23, esto se puede traducir en un aumento de la rigidización desde etapas más tempranas para esta variedad de uva. A esto se le suma un aumento en la expresión del gen para la variedad más susceptible a desgrane en el periodo posterior a su almacenamiento en condiciones frías, como se ha documentado en bayas (Haider *et al.*, 2017) que dichos cambios se relacionarían a una resistencia por deshidratación, esta respuesta podría aumentar la lignificación en el interior del pedicelo haciéndolo en combinación con lo descrito anteriormente aún más propenso al desgrane.

El gen RAP2-3 pertenece a la familia de factores de transcripción sensibles a etileno (Giuntoli y Perata 2018), que conlleva a una gran cantidad de respuestas a nivel hormonal en plantas, entre la más importante, la maduración de la fruta (BTtcher *et al.*, 2013), y aunque las uvas son clasificadas como frutas no climatéricas se ha demostrado por Chervin *et al.* (2005) que la producción interna de etileno se produce principalmente antes de envero para el aumento del tamaño de la baya y permite la acumulación de compuestos asociados a la maduración a partir de la ruta de los fenilpropanoides (antocianinos en general). También se ha descrito en *Arabidopsis thaliana* una relación en la conversión de señales que surgen de la producción de etileno en tejidos tratados con giberelinas (van der Veen *et al.*, 2013) otorgando protección contra radicales libres y deshidratación (Bailey-Serres *et al.*, 2012) asegurando una correcta respuesta de la planta frente a este estrés. Tomando en

cuenta lo anterior, y observando el perfil de expresión de este gen, se observa por parte de ambos fenotipos una sobreexpresión del gen a lo largo del tiempo hasta cosecha, pero en Thompson Seedless se denota respecto al control; esto podría traducirse en una mayor resistencia por parte de la planta a daño por el sol y por deshidratación. Esto no tendría un efecto que se vea reflejado al momento de cosecha, pero podría proteger al pedicelo durante su almacenamiento para soportar de mejor manera el estrés por las condiciones de guarda respecto a la línea de selección #23. Aún así es necesario esclarecer más el rol directo que involucra a este gen con el desgrane.

El gen CCR1 es uno de los principales encargados de la síntesis del polímero de lignina y en el ensamblaje de la pared celular (Tamasloukht *et al.*, 2011), la importancia en plantas de este gen se ha verificado en ensayos en *Arabidopsis thaliana*, en los que este gen ha sido reprimido completamente, generando plantas enanas debido al colapso del xilema por bajas concentraciones y condensación de lignina, lo que puede traducirse en una problema en el ensamblaje de la pared secundaria (Ruel *et al.*, 2009). Tomando en cuenta la importancia de este gen y su patrón de expresión durante el desarrollo fenológico de ambos fenotipos se puede apreciar que ocurre un peak en la sobreexpresión a una semana de la aplicación del ácido giberélico relacionándose posiblemente con un aumento en la tasa de lignificación y estructuración de ésta. Sin embargo, durante el periodo de almacenamiento en frío, los niveles del gen bajan en comparación del grupo control, esto podría significar una pérdida en la estructuración del polímero y desestabilización del xilema (o pared celular) en el pedicelo haciéndolo más

susceptible al desgrane (Ployet *et al.*, 2018). La línea de selección #23 podría ser más susceptible en este aspecto debido a que podría darse un menor orden en la estructura en comparación a Thompson Seedless.

El gen METK5 codificante para la isoforma de la enzima S-adenosilmetionina sintasa 5 ayuda en la síntesis de precursores de poliaminas (Guo *et al.*, 2014), las que están involucradas en la respuesta contra estrés abiótico, sobretodo en situaciones de sequía y alta salinidad (Guo *et al.*, 2014). Algunas isoformas de esta enzima han sido descritas como las encargadas de ofrecer una alta tasa de resistencia al estar sobreexpresadas al preservar los nutrientes de la planta (Zhu y Gong 2014) y protegiendo los tejidos del ataque de radicales libres (Ma *et al.*, 2017). Tomando en cuenta lo anterior, se podría relacionar en ambos fenotipos un efecto protector extra al inicio del ensayo posaplicación de la fitohormona para el periodo inicial; sin embargo, dicha protección se pierde en etapas posteriores al desarrollo fenológico; incluso se ve una represión de la expresión en Thomas Seedless tras su almacenamiento en frío (Seong *et al.*, 2018). Tomando en cuenta que este fenotipo no sufre desgrane elevado se puede inferir que la enzima estaría más relacionada a la protección en uva de mesa en una etapa anterior a la cosecha y que no guarda una relación mayor al frío.

El gen LAC12 codificante para la enzima Lacasa es un gen que ha sido correlacionado principalmente en la germinación, elongación de raíces y degradación de lignina en *Arabidopsis thaliana* (gen homólogo TT10) teniendo un rol principal en la ruta de su degradación (Pourcel *et al.*, 2005), esto puede conllevar

a variaciones en la condensación del contenido de lignina (Pourcel *et al.*, 2005). La regulación positiva que se da en ambos fenotipos al día 7 después de la aplicación de la fitohormona, en especial en la línea de selección #23 podría ser una respuesta fisiológica al aumento del contenido de lignina en el pedicelo como un mecanismo antagónico, o bien, significar un aumento de precursores de este polímero, lo que podrían acumularse durante el resto del desarrollo fenológico.

Las proteínas de clase giberelina 2- β -dioxigenasas son las responsables de la 2 β -hidroxilación e inactivación de la forma bioactiva del ácido giberélico (Schomburg *et al.*, 2003). Perteneciente a este grupo se encuentra el gen GA2ox8 que ha sido descrito como uno de los principales reguladores de la vía biosintética para la activación de la hormona (Middleton *et al.*, 2012) y teniendo un efecto comprobado la adecuada formación de tejido maderoso, gracias a su activación continua y restringida a la zona de expansión del xilema (Israelsson *et al.*, 2005). Estudios en uva han corroborado una complejidad similar a la de otras plantas de este grupo de genes (Han y Zhu, 2011); sin embargo, estudios transcriptómicos no se han desarrollado más allá del estado fenológico de envero (Giacomelli *et al.*, 2013). A lo largo del ensayo la Línea de selección #23 se observa que a partir de envero ocurre un aumento sostenido de la expresión del gen, siendo éste aún mayor luego del periodo de almacenamiento en frío. Esto podría significar una inactivación de la hormona y ralentización del metabolismo dentro del pedicelo que conlleva a un cambio de textura y lesiones como se ha demostrado en otros alimentos al ser

almacenados en frío, relacionándose estrechamente con una menor expresión en genes categóricos a muerte celular y respuesta inmune (Pegoraro *et al.*, 2015).

La cutícula está formada principalmente por cutina y es de vital importancia para el desarrollo y sobrevivencia de la planta (Heredia 2003; Chen *et al.*, 2011; Ziv *et al.*, 2018) . La enzima BAHD aciltransferasa DCR es una de las principales encargadas de mediar la síntesis del polímero (Panikashvili *et al.*, 2009), a tal punto, que plantas con baja expresión presentan deficiencia en su cutícula haciéndolas más susceptibles a estrés salino, osmótico y deshidratación (Panikashvili *et al.*, 2009); comprobándose recientemente su importancia en bayas de uva frente a este tipo de estrés en poscosecha (Dimopoulos *et al.*, 2020). Como se aprecia en los resultados y tomando en cuenta que la cutícula se desarrolla principalmente en los primeros estadios del desarrollo fenológico, la Línea de selección #23 se vería afectada inmediatamente tras la aplicación de la hormona, predisponiéndola a una barrera física más endeble contra la manipulación y tolerancia al frío. Así mismo esto podría ocurrir con Thompson Seedless al estar almacenado en frío haciéndola más susceptible al desgrane respecto a su control.

El gen JMT codificante para enzima Jasmonato O-Metiltransferasa es vital para la síntesis de metiljasmonato y a su vez importante para la regulación celular de varios procesos relacionados en procesos de desarrollo y respuesta de defensa (Seo *et al.*, 2001); esto se ha demostrado en *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan la enzima confiriéndole mayor resistencia a estrés hídrico (Seo *et al.*, 2001). Estudios realizados en *Carica papaya* por Rivera-Domínguez *et al.*, 2012 demuestran una

relación directa entre el aumento del gen y una mejor respuesta ante estrés en plantas durante su almacenamiento a 5°C por periodos de 5 días, sobre todo en tejido de piel (cutícula) de las frutas contra posibles daño abióticos (abscisión). Tomando en cuenta estos factores, se observa una tendencia a lo largo del tiempo para Thompson Seedles en la que el tratamiento reprime en un bajo grado la expresión del gen, siendo constante a lo largo del tiempo. Sin embargo y a pesar de que el comportamiento en el perfil de expresión del gen en la Línea #23 es similar a lo largo de todo el desarrollo fenológico, se observa una gran diferencia entre el control y tratamiento (gen reprimido) durante el período posterior al almacenamiento en frío. Lo anterior podría conllevar un debilitamiento en la cutícula y respuesta contra estrés hídrico a bajas temperaturas a casusa del tratamiento con la fitohormona; traduciéndose en una mayor susceptibilidad al desgrane (Garcia-Rojas *et al.*, 2018).

Tomando en cuenta la suma de todos los genes se podría relacionar los efectos mencionados anterioremente por un cambio en sus niveles de expresión, estas condiciones podrían ser acumulativas y tener una incidencia en el desgrane de la línea de selección #23, ya que muchos de estos genes están directamente o indirectamente relacionados con procesos de rigidización del pedicelo, asociados a defensa contra estrés hídrico/oxidativo y factores de crecimiento (Zhong *et al.*, 2000; Tamasloukht *et al.*, 2011; Meneses *et al.*, 2020; Feduraev *et al.*, 2021). En efecto se ha demostrado que la lignificación, desarrollo de la pared celular y proliferación celular son procesos ontológicamente relacionados con la arquitectura del xilema y conformación de la planta (Li *et al.*, 2005).

Entre los genes que representan de mejor manera una expresión diferencial sustancial y que podrían ser utilizados como marcadores destacan los que presentan una expresión característica como: CCOMT y CCR1 durante los primeros 7 días post aplicación de la hormona y 30 días después de su salida de guarda en frío; METK5 y DCR también durante los primeros días de aplicación de la fitohormona y JMT al final del proceso luego de su guarda en frío por 30 días. Todos estos genes marcan una expresión que permite diferenciarlas del tratamiento y de variedades que no presentan el fenotipo (desgrane) fácilmente.

7. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio permiten aceptar la hipótesis que señala que “La susceptibilidad al desgrane está ligada al genotipo en uvas apirénicas y asociada a la expresión diferencial de genes relacionados a un mayor crecimiento y engrosamiento del pedicelo a partir del tratamiento con ácido giberélico durante su desarrollo fenológico generando una rigidización de la estructura a nivel celular permitiendo así una mayor tasa de desgrane”. Los genes seleccionados para este ensayo se relacionaron con rutas metabólicas ligadas a la producción de lignina, cutina, defensa contra estrés hídrico/oxidativo y factores de crecimiento; en conjunto todo conlleva a un mayor engrosamiento y a la vez debilitamiento de la estructura del pedicelo, junto a ello, y tomando en cuenta la rigidización de la estructura, aumentaría la susceptibilidad al desgrane en las variantes que presentan estos cambios en la expresión de los estos genes.

Si bien los resultados son consistentes, se requiere validar la información con datos de otras variedades de uvas de mesa y a la vez en distintas temporadas para esclarecer el uso de estos genes como posibles marcadores.

Una posible forma de utilizar los genes de estudio sería la aplicación de microarreglos para la detección temprana y/o intermedia de una posible susceptibilidad al desgrane por parte de la variedad de uva de mesa a exportar.

Esto permitiría dirigir o redirigir la carga a mercados de interés tomando las precauciones debidas para su manejo.

8. REFERENCIAS

Agüero C, Vigliocco A, Abdala G, Tizio R. (2000). Effect of gibberellic acid and uniconazol on embryo abortion in the stenospermocarpic grape cultivars Emperatriz and Perlon. *Plant Growth Regulation* 30, 9–16.

Amerine, M.A., Berg, H. W., and Cruess, W. V. (1972). The Technology of Wine Making. Avi Publishing Co., Westport, Connecticut.

Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

Bailey-Serres J., Lee S.C and Brinton E. (2012). Waterproofing Crops: Effective Flooding Survival Strategies. *Plant Physiology* 160 (4) 1698-1709.

Ben-Tal, Y. (1990). Effects of gibberellin treatments on ripening and berry drop from Thompson Seedless grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(2), 142-146.

B Ttcher, C., Harvey, K. E., Boss, P. K., & Davies, C. (2013). Ripening of grape berries can be advanced or delayed by reagents that either reduce or increase ethylene levels. *Functional plant biology: FPB*, 40(6), 566–581.

Chai, L., Li, Y., Chen, S., Perl, A., Zhao, F., & Ma, H. (2014). RNA sequencing reveals high resolution expression change of major plant hormone pathway genes after young seedless grape berries treated with gibberellin. *Plant Science*, 229, 215-224.

Chasan, R. (1995) GA biosynthesis: A glimpse at the genes. *Plant Cell* 7: 141-143.

Chen, G., Komatsuda, T., Ma, J. F., Li, C., Yamaji, N., & Nevo, E. (2011). A functional cutin matrix is required for plant protection against water loss. *Plant signaling & behavior*, 6(9), 1297–1299.

Cheng CKC, Marsch HV (1968). Gibberellic acid-promoted lignification and phenylalanine ammonia-lyase activity in a dwarf pea (*Pisum Sativum*). *Plant Physiol.* 43: 1755-1759.

Cheng, C., Xu, X., Singer, S. D., Li, J., Zhang, H., Gao, M., Wang, L., Song, J., & Wang, X. (2013). Effect of GA3 treatment on seed development and seed-related gene expression in grape. *PLoS one*, 8(11), e80044.

Chervin, Christian & Tira-Umphon, Arak & Roustan, Jean-Paul & Lamon, Julien & Latché, Alain & Bouzayen, Mondher & El-kereamy, Ashraf & Kanellis, Angelos. (2005). Ethylene is required for the ripening of grape. *Acta Hort.* 689.

Chundawat BS, Takahashi E, Nagasawa K. (1971). Effect of gibberellic acid, B-nine and keratin on fruit set, parthenocarpy and quality of kyoho grapes. *Journal of Japanese Society of Horticultural Sciences* 40, 5–9.

Conde C, Silva P, Fontes N, Dias ACP, Tavares RM, Sousa MJ, Agasse A, Delrot S, Geros H. (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food* 1, 1-22.

Coombe, B.G., and Hale, C.R. (1973). The hormone content of ripening grape berries and the effect of growth substances treatments. *Plant Physiol.* 51, 629- 634.

Coombe, B.G. (1992). Research on development and ripening of the grape berry. *Am. J. Enol. Vitic.* 43:101-110.

Coombe, B.G., (1960). Relationship of growth and development to changes in sugars, auxins and gibberellins in fruit of seeded and seedless varieties of *Vitis vinifera*. *Plant Physiol.* 35,241-250.

Correa, J., Mamani, M., Muñoz-Espinoza, C., Laborie, D., Muñoz, C., Pinto, M. and Hinrichsen, P. (2014) Heritability and identification of QTLs and underlying candidate genes associated with the architecture of the grape- vine cluster (*Vitis vinifera* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 27, 1143– 1162

Correa, J., Ravest, G., Laborie, D., Mamani, M., Torres, E., Muñoz, C., Pinto M. & Hinrichsen, P. (2015). Quantitative trait loci for the response to gibberellic acid of

berry size and seed mass in tablegrape (*Vitis vinifera* L.). *Australian journal of grape and wine research*, 21(3), 496-507.

Dennis Jr FG, Nitsch JP. (1966). Identification of gibberellins A4 and A7 in immature apple seeds. *Nature* 211, 781–782.

Dimopoulos N., Tindjau R., Wong D., Matzat T., Haslam T., Song C., Gambetta G.A., Kunst L., Castellarin S.D. (2020). Drought stress modulates cuticular wax composition of the grape berry. *Journal of Experimental Botany* 71(10), 3126–314.

Douglas, S. J., & Riggs, C. D. (2005). Pedicel development in *Arabidopsis thaliana*: contribution of vascular positioning and the role of the BREVIPEDICELLUS and ERECTA genes. *Developmental biology*, 284(2), 451-463.

Ewing B, Green P. (1998): Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8(3), 186–194.

FAO 2018. Food and Agriculture Organization of United Nations. Statistics Division. <http://faostat3.fao.org>.

Feduraev, P., Riabova, A., Skrypnik, L., Pungin, A., Tokupova, E., Maslennikov, P., & Chupakhina, G. (2021). Assessment of the Role of PAL in Lignin Accumulation in Wheat (*Triticum aestivum* L.) at the Early Stage of Ontogenesis. *International journal of molecular sciences*, 22(18), 9848.

Gao, X. T., Wu, M. H., Sun, D., Li, H. Q., Chen, W. K., Yang, H. Y., Liu, F. Q., Wang, Q. C., Wang, Y. Y., Wang, J., & He, F. (2020). Effects of gibberellic acid (GA₃) application before anthesis on rachis elongation and berry quality and aroma and flavour compounds in *Vitis vinifera* L. 'Cabernet Franc' and 'Cabernet Sauvignon' grapes. *Journal of the science of food and agriculture*, 100(9), 3729–3740.

Garcia-Rojas M., Meneses M., Oviedo K., Carrasco C., Defilippi B., Gonzalez-Aguero M., Leon G., Hinrichsen P. (2018). Exogenous gibberellic acid application induces the overexpression of key genes for pedicel lignification and an increase in berry drop in table grape. *Plant Physiology and Biochemistry*, 126, 32-38.

Giacomelli L., Rota-Stabelli O., Masuero D., Acheampong A.K., Moretto M., Caputi L., Vrhovsek U., Moser C (2013). Gibberellin metabolism in *Vitis vinifera* L. during bloom and fruit-set: functional characterization and evolution of grapevine gibberellin oxidases, *Journal of Experimental Botany*, 64, 4403–4419.

Giuntoli, B., & Perata, P. (2018). Group VII Ethylene Response Factors in *Arabidopsis*: Regulation and Physiological Roles. *Plant physiology*, 176(2), 1143–1155.

González-Carranza, Z. H., Lozoya-Gloria, E., & Roberts, J. A. (1998). Recent developments in abscission: shedding light on the shedding process. *Trends in Plant Science*, 3(1), 10-14.

Guo, W. L., Chen, R. G., Du, X. H., Zhang, Z., Yin, Y. X., Gong, Z. H., & Wang, G. Y. (2014). Reduced tolerance to abiotic stress in transgenic *Arabidopsis* overexpressing a *Capsicum annuum* multiprotein bridging factor 1. *BMC plant biology*, 14, 138.

Guo, Da-Long & Li, Qiong & Ji, Xiao-Ru & Wang, Zhen-Guang & Yu, Yi-He. (2019). Transcriptome profiling of 'Kyoho' grape at different stages of berry development following 5-azaC treatment. *BMC Genomics*, 20, 825

Haider, M.S., Zhang, C., Kurjogi, Mahantesh M. Kurjogi, Tariq Pervaiz, Ting Zheng, Chaobo Zhang, Chen Lide, Lingfie Shangguan & Jinggui Fang (2017). Insights into grapevine defense response against drought as revealed by biochemical, physiological, and RNA-Seq analysis. *Sci Rep* 7, 13134.

Han F. and Zhu B. (2011). Evolutionary analysis of three gibberellin oxidase genes in rice, *Arabidopsis*, and soybean. *Gene* 473, 23–35.

Hedden P, Phillips AL (2000). Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci.*, 12, 523-30.

Heredia, Antonio. (2003). Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochimica et biophysica acta*. 1620. 1-7.

Hoën P.A., Ariyurek Y., Thygesen H.H., Vreugdenhil E., Vossen R.H., de Menezes R.X., Boer J.M., van Ommen G.J., den Dunnen J.T. (2008). Deep sequencing-based expression analysis shows major advances in robustness, resolution and inter-lab portability over five microarray platforms. *Nucleic acids research*, 36(21), 141.

Israelsson, M., Sundberg, B. and Moritz, T. (2005) Tissue-specific localization of gibberellins and expression of gibberellin-biosynthetic and signaling genes in wood-forming tissues in aspen. *Plant J.*, 44, 494–504.

Iwahori S, Weaver RJ, Pool RM. (1967). Gibberellin-like Activity in Berries of Seeded and Seedless Tokay Grapes. *Plant Physiology*, 43, 333–337.

Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, et al (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449, 463–467.

Jensen F. and Bettiga L. (1983). The effects of growth regulators on table thompson seedless fruit set, fruit characteristics and shatter. *A Report of the Kearney Research Station*, 6, 1-3.

Kaneko M, Itoh H, Inukai Y, Sakamoto T, Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Matsuoka M. (2003). Where do gibberellin biosynthesis and gibberellin signaling occur in rice plants? *The Plant Journal*, 35, 104–115.

Kennedy, J. (2002). Understanding grape berry development. *Practical winery & vineyard*, 4, 1-5.

Knipfer, T., Fei, J., Gambetta, G. A., McElrone, A. J., Shackel, K. A., & Matthews, M. A. (2015). Water transport properties of the grape pedicel during fruit development: insights into xylem anatomy and function using microtomography. *Plant physiology*, 168(4), 1590-1602.

Lafuente, M.T. & Zacarías, Lorenzo & Martínez-Téllez, Miguel & Sanchez-Ballesta, M. & Dupille, Eve. (2002). Phenylalanine Ammonia-lyase As Related to Ethylene in the Development of Chilling Symptoms during Cold Storage of Citrus Fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(12), 6020–6025.

Li, J., Yu, X., Lou, Y., Wang, L., Slovin, J.P., Xu, W., Wang, S., Zhang, C., (2015). Proteomic analysis of the effects of gibberellin on increased fruit sink strength in Asian pear (*Pyrus pyrifolia*). *Sci. Hortic.*, 195, 25–36.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408.

Lv, C.W., Xiu, D.R., Ma, Y.S., (1994). Countermeasure and analysis of obstacle to storage of 'Kyoho' grapes. *Tianjian Agric. Sci.*, 3, 8–11.

Lynn, C. D., and F. L. Jensen (1966) Thinning effects of bloomtime gibberellin spray on Thompson Seedless table grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, 17, 286- 9.

Ma, C., Wang, Y., Gu, D., Nan, J., Chen, S., & Li, H. (2017). Overexpression of S-Adenosyl-I-Methionine Synthetase 2 from Sugar Beet M14 Increased Arabidopsis Tolerance to Salt and Oxidative Stress. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 847.

MacMillan J. (2001). Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20, 387–442.

Mariette, G., (2007). Guidelines for Preparing Export Table Grapes. Capespan, 77 pp. Marois, J., Bledsoe, A., Bettiga, L., 1992. Bunch rots. In: Grape pest management, 2nd ed. Univ. Calif. Div. Agric. Nat. Resour. Publ. 3343.

Martin, Marcel. (2011). CUTADAPT removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*. 17

Mazzeo M, Dichio B, Clearwater MJ, Montanaro G, Xiloyannis C (2013) Hydraulic resistance of developing Actinidia fruit. *Ann Bot (Lond)* 112: 197–205.

Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*, 5, 621–628.

Meneses, M., García-Rojas, M., Muñoz-Espinoza, C. et al (2020). Transcriptomic study of pedicels from GA3-treated table grape genotypes with different

susceptibility to berry drop reveals responses elicited in cell wall yield, primary growth and phenylpropanoids synthesis. *BMC Plant Biol.*, 20, 66.

Middleton, Alistair & Úbeda-Tomás, Susana & Griffiths, Jayne & Holman, Tara & Hedden, Peter & Thomas, Stephen & Phillips, Andrew & Holdsworth, Michael & Bennett, Malcolm & King, John & Owen, Markus. (2012). Mathematical modeling elucidates the role of transcriptional feedback in gibberellin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 109. 7571-6.

Mullins MG, Bouquet A, Williams LE. (1992). Biology of the grapevine. Cambridge University Press. Cambridge. 239 Páginas.

Muñoz-Espinoza C., Di Genova A., Correa J., Silva R., Maass A., González-Agüero M., Orellana A. And Hinrichsen P. (2016). Transcriptome profiling of grapevine seedless segregants during berry development reveals candidate genes associated with berry weight. *BMC plant biology*, 16(1), 104.

Nakato R. & Gotoh O. (2010). Fast and space-efficient whole-genome alignment. *BM Bioinform* 11, 214.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 6466, Gibberellic acid. Retrieved April 19, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gibberellic-acid>.

Nijjar GS, Bhatia GG. (1969). Effect of gibberellic acid and para-chlorophenoxyacetic acid on cropping and quality of Anab-e-Shahi grapes. *Journal of Horticultural Sciences and Biotechnology* 44, 91–95.

ODEPA 2019. Informe de estadísticas productivas. Catastro Superficie Plantada Nacional Web 2018-2019. <https://www.odepa.gob.cl>

OIV 2016. Organización Internacional de Viñas y Vinos. <http://www.oiv.int/es/statistiques/recherche>

Ojeda H, Deloire A, Carbonneau A, Ageorges A and Romieu C. (1999). Berry development of grapevines: Relations between the growth of berries and their DNA content indicate cell multiplication and enlargement. *Vitis.*, 38, 145-150.

Panikashvili D., Shi, J.X., Schreiber L., Aharoni A. (2009). The Arabidopsis DCR Encoding a Soluble BAHD Acyltransferase Is Required for Cutin Polyester Formation and Seed Hydration Properties. *Plant Physiology*, 151(4), 1773-1789.

Park, Y., & Park, H. S. (2017). Microstructural changes in the fruit and pedicel of 'Wonhwang' oriental pear induced by exogenous gibberellins. *Scientia Horticulturae*, 222, 1-6.

Pegoraro, C., Tadiello, A., Girardi, C. L., Chaves, F. C., Quecini, V., de Oliveira, A. C., Trainotti, L., & Rombaldi, C. V. (2015). Transcriptional regulatory networks controlling woolliness in peach in response to preharvest gibberellin application and cold storage. *BMC plant biology*, 15, 279.

Pérez, F.J., Viani, C. and Retamales, J. (2000) Bioactive gibberellins in seeded and seedless grapes: identification and changes in content during berry development. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 315–318.

Pérez, H., (1994). Table grape production in Chile. In: International Symposium on Table Grape Production, Anaheim, CA. *Am. Soc. Enol. Viticul*, 1–7.

Piva, C. R. (2001). Modelo de evaluación de la Calidad y de las Preferencias del Consumidor para la uva de mesa (Doctoral dissertation, Universidad Politécnica de Madrid).

Ployet, R., Soler, M., Carocha, V., Ladouce, N., Alves, A., Rodrigues, J. C., Harvengt, L., Marque, C., Teulières, C., Grima-Pettenati, J., & Mounet, F. (2018). Long cold exposure induces transcriptional and biochemical remodelling of xylem secondary cell wall in Eucalyptus. *Tree physiology*, 38(3), 409–422.

Pourcel L., Routaboul J.M., Kerhoas L., Caboche M., Lepiniec L., Debeaujon I. (2005). Transparent TESTA 10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerisation of flavonoids in Arabidopsis seed coat. *Plant Cell.*, 17, 2966-2980.

Retamales, J., & Cooper, T. (1993). Berry drop and fruit removal forces as related with GA3 applications in table grapes. *Acta Horticulturae*, 81.

Ri, A. & Pilati, Stefania & Velasco, Riccardo & Moser, Claudio & Boschetti, A. & Costa, Guglielmo. (2010). Ethylene production during grape berry development and

expression of genes involved in ethylene biosynthesis and response. *Acta Horticulturae*. 884. 73-80.

Rivera-Dominguez, Marisela; Astorga-Cienfuegos, Karen Rosalinda; Tiznado-Hernandez, Martin Ernesto y Gonzalez-Aguilar, Gustavo Adolfo (2012). Induction of the expression of defence genes in *Carica papaya* fruit by methyl jasmonate and low temperature treatments. *Electron. J. Biotechnol.*, 15 (5), 6.

Ruel K., Berrio-Sierra J., M.D. Mohammad., Pollet B., Thévenin J., Lapierre C., Jouanin L., and Joseleau J.P (2009). Impact of CCR1 silencing on the assembly of lignified secondary walls in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 184, 99-113.

Sachs RM and Weaver RJ (1968) Gibberellin and auxin induced berry enlargement in *Vitis vinifera*. *Hortic Sci* 43: 185–195

Schomburg, F. M., Bizzell, C. M., Lee, D. J., Zeevaart, J. A., & Amasino, R. M. (2003). Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *The Plant cell*, 15(1), 151–163.

Seo, Hong & Song, Jong & Cheong, J.J. & Lee, Young Ho & Lee, Theresa & Hwang, Ingyu & Lee, Joon & Choi, Yang. (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98(8), 4788–4793.

Seong, E.S., Jeon, M.R., Choi, J.H. *et al*. Overexpression of S-Adenosylmethionine Synthetase Enhances Tolerance to Cold Stress in Tobacco. *Russ J Plant Physiol*, 67, 242–249 (2020).

Serrano, A., Espinoza, C., Armijo, G., Inostroza-Blancheteau, C., Poblete, E., Meyer-Regueiro, C., Arce, A., Parada, F., Santibáñez, C., & Arce-Johnson, P. (2017). Omics Approaches for Understanding Grapevine Berry Development: Regulatory Networks Associated with Endogenous Processes and Environmental Responses. *Frontiers in plant science*, 8, 1486.

Shiri Y, Solouki M, Ebrahimie E, Emamjomeh A, Zahiri J. (2020) Gibberellin causes wide transcriptional modifications in the early stage of grape cluster development. *Genomics*, 112(1), 820-830.

Tamasloukht B, Wong Quai Lam MS, Martinez Y, Tozo K, Barbier O, Jourda C, Jauneau A, Borderies G, Balzergue S, Renou JP, Huguet S, Martinant JP, Tatout C, Lapierre C, Barrière Y, Goffner D, Pichon M. (2011). Characterization of a cinnamoyl-CoA reductase 1 (CCR1) mutant in maize: effects on lignification, fibre development, and global gene expression. *J. Exp Bot.*, 62(11), 3837-48.

Taylor, J.E., Whitelaw, C.A., (2001). Signals in abscission. *New Phytol.*, 151, 323–339.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673–4680.

Trindade, J.L.F. & Oliveira, B.H. & Canteri, Maria & Pereira, T.L.. (2015). Production and Biological Activity of Gibberellins Obtained by Biotransformation. *Espacios*, 36(24), 21.

Vasconcelos, M.C., Greven, M., Winefield, C.S., Trought, M.C.T., Raw, V., (2009). The flowering process of *Vitis vinifera*: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 60, 411–434.

van Veen H, Mustroph A, Barding GA, Vergeer-van Eijk M, Welschen-Evertman RAM, Pedersen O, Visser EJW, Larive CK, Pierik R, Bailey-Serres J, et al. (2013) Two *Rumex* species from contrasting hydrological niches regulate flooding tolerance through distinct mechanisms. *Plant Cell*, 25, 4691–4707

Velasco, R., Zharkikh, A., Troggio, M., Cartwright, D. A., Cestaro, A., Pruss, D., Pindo, M., Fitzgerald, L. M., Vezzulli, S., Reid, J., Malacarne, G., Iliev, D., Coppola, G., Wardell, B., Micheletti, D., Macalma, T., Facci, M., Mitchell, J. T., Perazzolli, M., Eldredge, G., Viola, R. (2007). A high-quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PloS one*, 2(12), 1326.

Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews. Genetics*, 10(1), 57–63.

Walker, R. R., Blackmore, D. H., Clingefeller, P. R., Kerridge, G. H., Rühl, E. H. and Nicholas, P. R. (2005), Shiraz berry size in relation to seed number and implications for juice and wine composition. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 2–8.

Weaver, R.J. (1958) Effect of gibberellic acid on fruit set and berry enlargement in seedless grapes of *Vitis vinifera*. *Nature* 181, 851–852.

Wenger, A.M., Peluso, P., Rowell, W.J. *et al.* (2019) Accurate circular consensus long-read sequencing improves variant detection and assembly of a human genome. *Nat Biotechnol.*, 37, 1155–1162

Wickham, H. (2016) *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. 2nd Edition, Springer, New York. 182 páginas.

Williams, L. E. (1987). Growth of Thompson Seedless grapevines: I. Leaf area development and dry weight distribution. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 112, 325- 30.

Wolf, E. E. H., & Loubser, J. T. (1992). Gibberellic acid levels and quality effects of gibberellic acid in treated table grapes. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 13(2), 57-63.

Yamaguchi S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual review of plantbiology*, 59,225–251.

Ye Shui Qing (2016). Big data Analysis for Bioinformatics and Biomedical Discoveries. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton FL. (Chapter 5, Pag 79 – 97)

Zenoni, S., Ferrarini, A., Giacomelli, E., Xumerle, L., Fasoli, M., Malerba, G., ... & Delledonne, M. (2010). Characterization of transcriptional complexity during berry development in *Vitis vinifera* using RNA-Seq. *Plant physiology*, 152(4), 1787-1795.

Zinn KE, Tunc-Ozdemir M and Harper JF. 2010. Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. *J. Exp. Bot.*, 61, 1959–1968.

Ziv, C., Zhao, Z., Gao, Y. G., & Xia, Y. (2018). Multifunctional Roles of Plant Cuticle During Plant-Pathogen Interactions. *Frontiers in plant science*, 9, 1088.

Zhao, Y., Li, MC., Konaté, M.M. *et al.* (2021) TPM, FPKM, or Normalized Counts? A Comparative Study of Quantification Measures for the Analysis of RNA-seq Data from the NCI Patient-Derived Models Repository. *J Transl Med* 19, 269.

Zhong R., W. Herbert Morrison, David S. Himmelsbach, Farris L. Poole, Zheng-Hua Ye (2000). Essential Role of Caffeoyl Coenzyme A O-Methyltransferase in Lignin Biosynthesis in Woody Poplar Plants. *Plant Physiology*, 124(2), 563-578.

Zhu, Y. X., and Gong, H. J. (2014). Beneficial effects of silicon on salt and drought tolerance in plants. *Agron. Sustain. Dev.*, 34, 455–472.

Zoffoli, J.P., Latorre, B.A., and Naranjo, P. (2009), 'Preharvest applications of growth regulators and their effect on postharvest quality of table grapes during cold storage. *Postharvest Biol. Technol.*, 51, 183 – 192.